



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE, HIPOGLICEMIANTE E
HIPOLIPEMIANTE *in vitro* DE LIPOPÉPTIDOS PRODUCIDOS
POR *Bacillus amyloliquefaciens***

Por:

IBQ. Itzel Fernanda Parra Aguilar

TESIS APROBADA POR

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

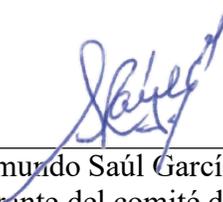
Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Itzel Fernanda Parra Aguilar la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. José Basilio Heredia
Director de tesis



MC. Laura Aracely Contreras Angulo
Integrante del comité de tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Angel Angulo Escalante
Integrante del comité de tesis

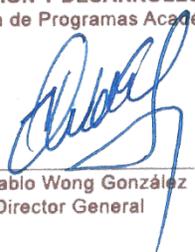
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Potencial Antioxidante, Hipoglicemiante e Hipolipemiante *In vitro* de Lipopéptidos Producidos por *Bacillus amyloliquefaciens*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Itzel Fernanda Parra Aguilar, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca económica otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Culiacán por la oportunidad de ingresar a la institución para realizar mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis Dr. José Basilio Heredia, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Gracias por su paciencia, apoyo, disponibilidad y sus consejos acertados.

A mi comité de tesis: Dr. Raymundo Saúl García Estrada, MC. Laura Aracely Contreras Angulo, Dr. Miguel Angel Ângulo Escalante, por las sugerencias y observaciones acertadas e interesantes que siempre son de utilidad para tener otra perspectiva.

A los miembros del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, así como a los miembros del Laboratorio de Fitopatología, y Plaguicidas. En especial a la MC. Nancy Ley López, MC. Isidro Márquez Zequera, MC. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas, MC. Alexis Emus Medina y Dr. Erick Paul Gutiérrez Grijalva por la amabilidad y apoyo con técnicas o uso equipos para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de generación. Mucho éxito en todo lo que se propongan.

A la MC. Melissa García Carrasco, por la gran amistad, la ayuda brindada y compartirme sus experiencias.

A mis padres Ofelia Aguilar Carlos y Juan Martin Parra Delgado, por ser mis maestros de vida, por los consejos e impulsarme a seguir mis metas y sueños ante cualquier situación. Gracias por siempre creer en mí.

A mis Hermanos Martin Eduardo y Valeria Anahy por todo el apoyo y cariño, además de brindarme grandes enseñanzas.

A Benjamin Saez Ceniceros por estar siempre presente, brindarme el cariño y la motivación. Te amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Síndrome Metabólico.....	14
2.1.1. Diabetes Mellitus Tipo 2.....	16
2.1.1.1. Intervención Farmacológica en la Diabetes.....	18
2.1.1.2. Inhibidores Enzimáticos.....	19
2.1.2. Obesidad.....	21
2.1.2.1. Intervención Farmacológica en la Obesidad.....	22
2.1.2.2. Inhibidores de Lipasa Pancreática.....	24
2.2. Estrés Oxidativo y el Síndrome Metabólico.....	26
2.2.1. Estrés Oxidativo en la Diabetes.....	27
2.2.2. Estrés Oxidativo en la Obesidad.....	29
2.3. Funcionalidad Biológica de los Antioxidantes.....	30
2.3.1. Antioxidantes como Inhibidores Enzimáticos.....	31
2.3.1.1. Compuestos Bioactivos Inhibidores de α -Amilasa y α -Glucosidasa.....	31
2.3.1.2. Compuestos Bioactivos Inhibidores de Lipasa Pancreática.....	33
2.4. <i>Bacillus</i> en la Producción de Metabolitos Secundarios.....	33
2.4.1. Importancia de los Lipopéptidos.....	34
2.5. Generalidades de Lipopéptidos Cíclicos.....	35
2.5.1. Surfactina.....	36
2.5.2. Fengicina.....	37
2.5.3. Iturina.....	37
2.6. Propiedades Antioxidantes de Lipopéptidos.....	38
2.7. Propiedades Biológicas de Lipopéptidos.....	40
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	43
5. HIPÓTESIS	44
6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	45
7. OBJETIVOS	46

CONTENIDO (continuación)

7.1. Objetivo General.....	46
7.2. Objetivos Específicos.....	46
8. JUSTIFICACIÓN.....	47
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
9.1. Cepa de <i>B. amyloliquefaciens</i>	48
9.2. Obtención del Extracto de Lipopéptidos.....	48
9.2.1. Producción de Lipopéptidos.....	48
9.2.2. Extracción de Lipopéptidos.....	48
9.2.3. Ultrafiltración de Lipopéptidos.....	49
9.3. Métodos de Capacidad Antioxidante.....	50
9.3.1. Capacidad Reductora Total por Folin-Ciocalteu.....	50
9.3.2. Capacidad Antioxidante por ORAC.....	50
9.3.3. Inhibición de la Absorbancia del Radical ABTS.....	51
9.4. Potencial Hipoglicemiante e Hipolipemiante.....	51
9.4.1. Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.....	51
9.4.2. Inhibición de la Enzima α -Amilasa.....	52
9.4.3. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática.....	53
9.5. Diseño Experimental.....	53
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
10.1. Capacidad Antioxidante.....	55
10.1.1 Capacidad Reductora Total.....	55
10.1.2. Capacidad Antioxidante por ORAC.....	56
10.1.3. Inhibición del Radical ABTS.....	57
10.2. Potencial Hipoglicemiante.....	58
10.3. Inhibición de la Actividad de Lipasa Pancreática por Efecto de Lipopéptidos.....	62
11. CONCLUSIONES.....	64
12. RECOMENDACIONES.....	65
13. REFERENCIAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Criterios del síndrome metabólico.....	14
2. Desarrollo de hiperglucemia en diabetes mellitus tipo 2.	17
3. La inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa disminuye la hiperglucemia posprandial en DM2	20
4. Vías metabólicas de los lípidos en el cuerpo humano.....	25
5. Causas, objetivos, órganos afectados y antioxidantes que combaten el estrés oxidativo. .	27
6. Factores que conllevan a complicaciones de la diabetes.....	28
7. Estructura de los lipopéptidos cíclicos a) Surfactina b) Fengicina c) Iturina.....	36
8. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición del radical ABTS.	58
9. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición de la enzima α -glucosidasa.	60
10. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición de la enzima lipasa pancreática.	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tipo, medicamentos, modo de acción, sitio de acción y efectos secundarios para el tratamiento de hiperglucemia en DM2.....	19
2. Resumen de medicamentos contra la obesidad para uso a largo plazo.....	23
3. Inhibición de radicales DPPH por efecto de lipopéptidos.....	39
4. Capacidad reductora total de extracto de lipopéptidos y otras fuentes de péptidos.....	56

RESUMEN

Los lipopéptidos son metabolitos secundarios que están compuestos de 7 a 25 aminoácidos, unidos a los ácidos grasos β -hidroxi o β -amino, por lo general se encuentran de manera cíclica. Estos a su vez se agrupan en tres familias: surfactina, iturina y fengicina. Las bacterias del género *Bacillus* producen mayor cantidad de lipopéptidos. Dichas moléculas presentan diferentes propiedades biológicas como antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas e inmunomoduladoras contra la aterosclerosis. Los compuestos bioactivos tienen la facultad de combatir el síndrome metabólico (SM) al regular la condición hiperglucémica y la obesidad, actuando como inhibidores de enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos (α -glucosidasa y α -amilasa) y lípidos (lipasa pancreática). El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antioxidante, potencial hipoglicemiante e hipolipemiante (anti-obesidad) *in vitro* de lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens*. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para la concentración media inhibitoria se realizó mediante un análisis de regresión lineal y/o logarítmico. En la producción y extracción de lipopéptidos (LPs), se utilizó la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* (KX953161.1) que fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del CIAD A.C. Unidad Culiacán. A los LPs se les determinó la capacidad reductora y la capacidad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC, los valores obtenidos fueron de 75.80 mg EAG/g, IC_{50} 652 μ g/mL y 207.98 μ mol ET/g, respectivamente. Por otra parte, los lipopéptidos purificados fueron utilizados para determinar la inhibición enzimática de α -glucosidasa y se registró un IC_{50} de 33.87 mg/mL, mientras que para α -amilasa no se obtuvo inhibición. En cuanto a la inhibición de lipasa pancreática, se registró un IC_{50} de 4.69 μ g/mL. Los resultados de capacidad antioxidante e inhibición enzimática podrían atribuirse a los aminoácidos presentes en la región peptídica de los lipopéptidos, así como al efecto antagónico y/o sinérgico de la mezcla del extracto de lipopéptidos. Por lo anterior, los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* tienen potencial para inhibir enzimas involucradas en la patogénesis del síndrome metabólico y podrían ser candidatos para estudios posteriores.

Palabras clave: *Bacillus*, lipopéptidos, síndrome metabólico, antioxidante, hipoglicemiante, anti-obesidad.

ABSTRACT

Lipopeptides are secondary metabolites that are composed of 7 to 25 amino acids, linked to β -hydroxy or β -amino fatty acids, generally found in a cyclical manner. These in turn are grouped into three families: surfactin, iturin and fengycin. Bacteria of the genus *Bacillus* produce higher amounts of lipopeptides, which present different biological properties such as antioxidants, antimicrobial, antiviral, anticancer and immunomodulatory against atherosclerosis. Bioactive compounds have the ability to combat metabolic syndrome (SM) by regulating the hyperglycemic condition and obesity, acting as inhibitors of key enzymes in the metabolism of carbohydrates (α -glucosidase and α -amylase) and lipids (lipase pancreatic). The objective of this research was to evaluate the antioxidant capacity, hypoglycemic and hypolipidemic potential (anti-obesity) in vitro of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. The obtained data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) and the mean comparisons were carried out with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The mean inhibitory concentration was used a linear and / or logarithmic regression analysis. For the production and extraction of lipopeptides (LPs), the strain *Bacillus amyloliquefaciens* (KX953161.1) was used, which was provided by the Phytopathology Laboratory of CIAD A.C Unit Culiacán. The reducing capacity and antioxidant capacity were determined for the LPs by the ABTS and ORAC methods, the values obtained were 75.80 mg EAG/g, IC_{50} 652 μ g/mL and 207.98 μ mol ET/g, respectively. On the other hand, the purified lipopeptides were used for the enzymatic inhibition of α -glucosidase and an IC_{50} of 33.87 mg/mL was recorded, while for α -amylase no inhibition was obtained. Regarding the inhibition of pancreatic lipase, an IC_{50} of 4.69 μ g/mL was registered. The results of antioxidant capacity and enzyme inhibition could be attributed to the amino acids present in the peptide region of the lipopeptides, as well as to the antagonistic and/or synergistic effect of the mixture of the lipopeptide extract. Therefore, the lipopeptides produced by *B. amyloliquefaciens* have the potential to inhibit enzymes involved in the pathogenesis of metabolic syndrome and are strongly suggested to be used for further studies.

Key words: *Bacillus*, lipopeptides, metabolic syndrome, antioxidant, hypoglycemic, anti-obesity.

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de condiciones perjudiciales interconectadas que conducen a la diabetes y enfermedades cardiovasculares (ECV) (Alberti *et al.*, 2009; Huang, 2009). Estas afecciones incluyen disglucemia, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), obesidad (especialmente grasa corporal central), triglicéridos (TG) elevados e hipertensión (Alberti *et al.*, 2009; Kaur, 2014). El síndrome metabólico está muy extendido tanto en países desarrollados como en desarrollo (Saklayen, 2018); la prevalencia de SM en nuestro país entre mujeres y hombres es del 38% y 39%, respectivamente (Gutiérrez-Solis *et al.*, 2018). Además, según estadísticas de WHO (2018), en México se estima que las enfermedades no transmisibles (ENT) representan el 80% de todas las muertes. Siendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras, la causa de mortalidad en un 24%, 15% y 22%, respectivamente. El manejo clínico del SM es difícil porque no existe un método reconocido para prevenir o mejorar todo el síndrome (Carvajal-Carvajal, 2017). Por lo tanto, la mayoría de los médicos tratan cada componente de SM por separado (Kaur, 2014). Entre los medicamentos más comunes para tratar hiperglucemia en diabetes y obesidad, se encuentra la acarbosa y el orlistat. Sin embargo, ambos medicamentos provocan efectos adversos a largo plazo (Kim *et al.*, 2014; Mhatre *et al.*, 2016). Por otro lado, las alternativas terapéuticas más comunes para tratar el síndrome metabólico consisten en la reducción de la hiperglucemia posprandial mediante la inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos (α -glucosidasa y α -amilasa) y la inhibición de enzimas lipolíticas, incluida la lipasa, así como la inhibición del estrés oxidativo (Costamagna *et al.*, 2016). La inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa ayuda a reducir la digestión de carbohidratos, por lo tanto, se disminuyen los niveles de glucosa en suero y la absorción de glucosa (Bidon-Chanal *et al.*, 2013). Mientras que la inhibición de la lipasa pancreática, enzima responsable de la digestión de la grasa de la dieta, se retarda la deposición de grasa en el tejido adiposo y se suprime el aumento de peso, por lo que tiene efectos beneficiosos para el sobrepeso y la obesidad (Podsdek *et al.*, 2014; Dechakhamphu *et al.*, 2015). Por ende, los inhibidores enzimáticos pueden ser candidatos potenciales para el tratamiento de la DM2 (Diabetes mellitus tipo 2) y obesidad (Nasab *et al.*, 2020; Anigboro *et al.*, 2021). En este sentido, se ha reportado que fuentes naturales tales como algas, plantas, insectos y hongos producen metabolitos secundarios con capacidad antioxidante y potencial para inhibir enzimas

clave en el metabolismo de glucosa y lípidos (Nwosu *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2019; Si *et al.*, 2020; Zielinska *et al.*, 2020). Asimismo, se ha reportado que la bacteria *B. amyloliquefaciens*, produce compuestos que van desde enzimas hidrolíticas, compuestos volátiles y metabolitos secundarios (Chen *et al.*, 2007a). Dentro de los metabolitos secundarios se han estudiados los lipopéptidos, los cuales presentan propiedades biológicas antifúngicas, anticancerígenas e inmunomoduladoras contra la aterosclerosis (Gan *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019). No obstante, existen pocos estudios *in vitro* acerca del extracto de lipopéptidos como alternativa para el control del síndrome metabólico. Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó la capacidad antioxidante, potencial hipoglicemiante e hipolipemiante (anti-obesidad) *in vitro* de lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico (SM) es una condición patológica que, según los criterios de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) (Hui *et al.*, 2010; Beck-Nielsen, 2013), se caracteriza por obesidad, dislipidemia, hiperglucemia e hipertensión arterial. El SM consta de la combinación de tres o más de estos criterios como se muestra en la **Figura 1** (Rosas-Guzmán *et al.*, 2010; Biesinger *et al.*, 2016).

El síndrome metabólico está muy extendido tanto en países desarrollados como en desarrollo (Saklayen, 2018). Por ejemplo, en los EEUU este síndrome se presenta en el 33% de la población adulta (Aguilar *et al.*, 2015). En Alemania, se presenta en el 19.4% de las mujeres y el 30.2% de los hombres (Block *et al.*, 2016). En Rusia, la incidencia de SM en los hombres es del 23% y en las mujeres del 32.4% (Mitrofanov *et al.*, 2012).

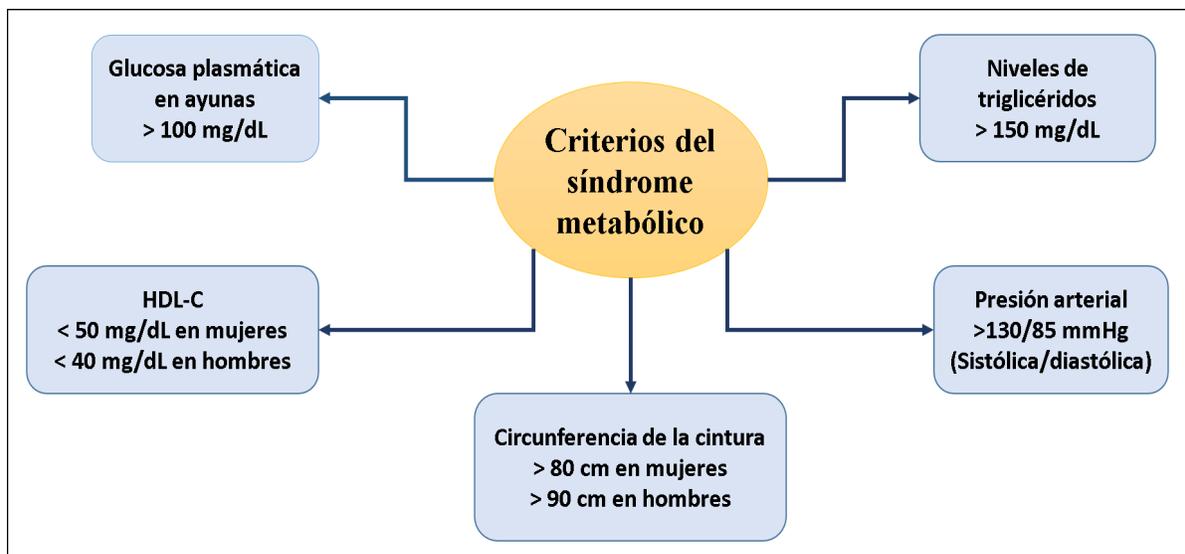


Figura 1. Criterios del síndrome metabólico. Modificado de Eisvand *et al.* (2020).

Mientras que, en países de América Latina, la prevalencia general del síndrome metabólico es de 24.9% (rango 18.8-43.3%), y es ligeramente más frecuente en mujeres (25.3%) que en hombres (23.2%), siendo el grupo de mayores de 50 años edad el de mayor prevalencia. El incremento paralelo de la frecuencia de la obesidad y del síndrome metabólico es un fenómeno mundial y México no es la excepción (García-García *et al.*, 2009; Márquez-Sandoval *et al.*, 2011). La prevalencia de SM en nuestro país entre mujeres y hombres es del 38% y 39%, respectivamente (Gutiérrez-Solis *et al.*, 2018).

Además, según estadísticas de WHO (2018), se estima que las enfermedades no transmisibles (ENT) representan el 80% de todas las muertes. Siendo enfermedades cardiovasculares, diabetes y otras ENT causas de mortalidad en un 24%, 15% y 22%, respectivamente. Además, entre los principales factores de riesgos destacan obesidad, incremento de la presión arterial, uso de tabaco e inactividad física.

Según los datos de ENSANUT (2018), en México, 8.6 millones de personas adultas mayores de 20 años padecen diabetes. De los cuales, el 11.4% y 9.1% son mujeres y hombres, respectivamente. Además, la visión disminuida es la complicación mayormente reportada por los diabéticos en México.

En tanto, a nivel nacional, en 2018, el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad); presentando mayor porcentaje de obesidad las mujeres con 40.2% y los hombres el 30.5%. Las cifras de sobrepeso fueron de 36.6% y 42.5% en hombres y mujeres (ENSANUT, 2018). Por otro lado, la distribución porcentual con colesterol y triglicéridos altos es de 19.5% (21% mujeres y 17.7% hombres) (ENSANUT, 2018).

En el caso de hipertensión, 15.2 millones de personas padecen esta enfermedad, lo cual corresponde al 18.4% de la población (20.9% mujeres y 15.3% hombres). Conforme se incrementa la edad, crece el porcentaje de población con diagnóstico previo de hipertensión, principalmente a partir de los 50 años, llegando al 26.7% en el grupo de 70 a 79 años en 2018 (ENSANUT, 2018).

2.1.1. Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por elevados niveles de azúcar en sangre, es decir hiperglucemia crónica (Zheng *et al.*, 2018) . Además, la forma más común es la diabetes mellitus tipo II (DM2) y por ello las padece el 90% de las personas con este problema metabólico (Kitabchi *et al.*, 2009).

En 2017 se estimó que 451 millones de personas padecían DM y se espera que esta cifra se incremente a 693 millones en 2045 (Cho *et al.*, 2018). En el caso de México, este ocupa el quinto lugar con más afectados de diabetes a nivel mundial (IDF, 2017). Por otro lado, estadísticas de la Federación Mexicana de Diabetes e Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) informaron que esta es la segunda causa de fallecimientos por enfermedades no transmisibles con 15.7%, seguida de causas cardíaca (FMD, 2018; INEGI, 2020).

La DM2 se ha definido como un trastorno metabólico crónico asociado con la hiperglucemia, es decir nivel alto de azúcar en sangre, la cual es causada por la secreción de insulina alterada y la resistencia a la insulina (DeFronzo *et al.*, 2015). El diagnóstico depende principalmente de los niveles de glucosa sérica. Personas con niveles de glucosa en ayunas de más >126 mg por dL padecen DM2. También se han añadido como criterio de diagnóstico niveles de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) de $\geq 6.5\%$ (DeFronzo *et al.*, 2015).

En la DM2 los dos principales defectos patológicos son la secreción de insulina alterada por una disfunción de las células β pancreáticas y la acción alterada de la insulina por resistencia a la insulina (ADA, 2010). De manera general, en la **Figura 2** se muestra un esquema sobre el desarrollo de la DM2. La insulina es una hormona pancreática que tiene como función mantener la homeostasis al estimular la conversión de glucosa en glucógeno (Twyman, 2009). Cuando se padece DM2, las células de tejidos periféricos como son los adipocitos, los hepatocitos y las células musculares no responden de manera correcta a dicha insulina (endógena y exógena), lo cual se denomina resistencia a la insulina (Massó, 2014; FMD, 2015). Como resultado el azúcar no puede entrar en las células donde sería almacenada para transformarla en energía, sino que se acumula un

nivel alto en la sangre y se genera hiperglucemia, también se genera una reabsorción excesiva de glucosa por el riñón y un aumento de la gluconeogénesis, lo que contribuye a la hiperglucemia (DeFronzo *et al.*, 2015; FMD, 2015).

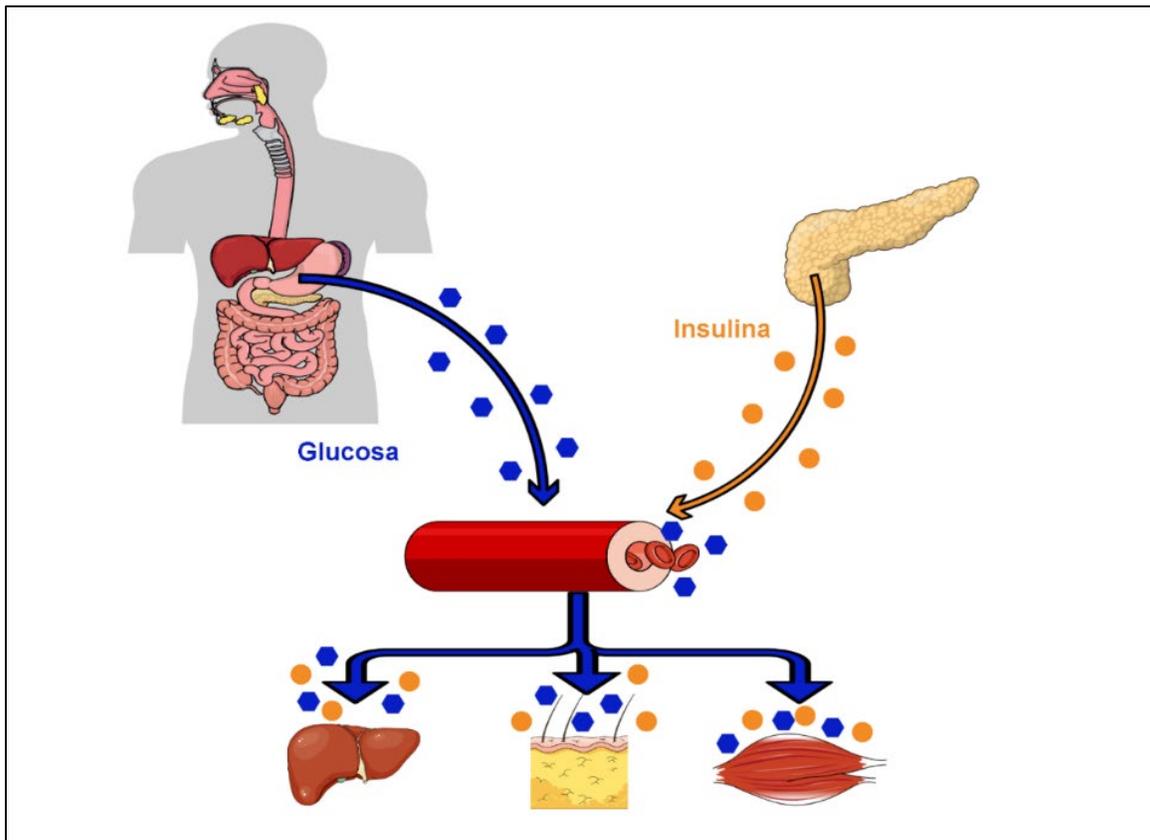


Figura 2. Desarrollo de hiperglucemia en diabetes mellitus tipo 2. Modificado de Baynes (2015).

Además de lo anterior, es importante mencionar que las células β se encuentran en los islotes de Langerhans, dispersos dentro del páncreas exocrino (Saisho, 2015). Dichas células tienen la capacidad de detectar cambios en los niveles de glucosa en sangre, de forma que cuando aumenta la glucosa, estas células incrementan la producción de insulina (Weir *et al.*, 2004; FMD, 2015). Pero durante el desarrollo de la enfermedad el defecto de las células β va progresando, los niveles de glucemia en sangre se mantienen constantemente aumentados, y actúan como un tóxico para el páncreas, destruyendo la insulina que las células β tienen almacenada en su interior, agravando por tanto la hiperglucemia (Weir *et al.*, 2004; FMD, 2015).

Así mismo, algunos estudios han demostrado que la apoptosis de células β aumenta en pacientes con DM2, mientras que ni la replicación de células β ni la neogénesis disminuyen, lo que sugiere que el aumento de la pérdida de células β es la principal causa de la reducción de la masa de células β en DM2 (Butler *et al.*, 2003; Saisho, 2015). Si bien parte de la disfunción de las células β pancreáticas se incrementa por glucotoxicidad, también puede deberse a lipotoxicidad y la resistencia a las incretinas (hormonas intestinales que estimulan la secreción de insulina) (DeFronzo *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha descrito que, al modificar la dieta, el estilo de vida y tomar medicamentos antidiabéticos orales, se puede controlar la DM2. Sin embargo, incluso con las terapias existentes y bien establecidas para controlar la enfermedad, dicha patología sigue siendo un peligro importante para la salud pública y es responsable de problemas a largo plazo como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía (Sun *et al.*, 2012).

2.1.1.1. Intervención Farmacológica en la Diabetes. Las estrategias terapéuticas para controlar la diabetes abarcan una variedad de medicamentos, los agentes hipoglucemiantes orales comercializados comúnmente utilizados para DM2 son biguanidas, sulfonilureas, tiazolidinedionas, meglitinidas e inhibidores de la α -glucosidasa (Quianzon *et al.*, 2012; White, 2014). En el **Cuadro 1** se muestran algunos de los medicamentos, así como efectos secundarios y modos de acción para disminuir hiperglucemia en DM2.

Las biguanidas son recetadas como primera línea de medicamentos, para disminuir la producción de glucosa en el hígado. Además, las sulfonilureas estimulan las células β pancreáticas para la liberación de insulina (Gupta *et al.*, 2016). Otra de las opciones terapéuticas es el empleo de inhibidores enzimáticos orales, entre los cuales se encuentran los fármacos acarbosa, voglibosa, miglitol (Sugihara *et al.*, 2014; Sigalapalli *et al.*, 2020). Dichos medicamentos actúan inhibiendo α -glucosidasa, de tal manera logran retrasar la digestión de los carbohidratos de la dieta para mantener los niveles normales de glucosa posprandial (Krentz *et al.*, 2005; Derosa *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Tipo, medicamentos, modo de acción, sitio de acción y efectos secundarios para el tratamiento de hiperglucemia en DM2. Modificado de Rosak *et al.* (2012); DeFronzo *et al.* (2015); Proença *et al.* (2019).

Tipo	Medicamentos	Modo de acción	Sitio de acción	Efectos secundarios
Antidiabéticos de sulfonilurea de segunda generación	<ul style="list-style-type: none"> •Glibenclamida (gliburida) •Gliclazida •Glimepirida •Glipizida 	↑↑Secreción de insulina	Células beta	Hipoglucemia
Antidiabéticos con biguanida	<ul style="list-style-type: none"> •Metformina 	↓↓HGP	Hígado y tejidos periféricos	Acidosis gastrointestinal y láctica
TZDs	<ul style="list-style-type: none"> •Pioglitazona 	↑↑Sensibilidad a la insulina ↑↑función de las células β	Receptor PPAR-gamma y núcleo celular	Retención de líquidos Fracturas de hueso
Inhibidores de α-amilasa y α-glucosidasa	<ul style="list-style-type: none"> •Acarbosa •Miglitol •Voglibose 	↓Absorción de carbohidratos	Enzimas digestivas del intestino delgado	Gastrointestinal
Inhibidores de DPP4	<ul style="list-style-type: none"> •Alogliptina •Linagliptina •Saxagliptina •Sitagliptina •Vildagliptina 	↓Secreción de glucagón ↑Secreción de insulina (débil)	Plasma, tejidos periféricos	Ninguna
Inhibidores de SGLT2	<ul style="list-style-type: none"> •Canagliflozina •Dapagliflozina 	↓↓Glucosuria ↓↓Glucotoxicidad	Riñón	Infecciones micóticas genitales

HGP, producción de glucosa hepática; TZD, tiazolidinedionas; PPAR, receptor activado por proliferador de peroxisomas; DPP4, dipeptidil peptidasa 4; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa tipo 2.

2.1.1.2. Inhibidores Enzimáticos. Los fármacos inhibidores de la α-glucosidasa son agentes antidiabéticos orales que suprimen la hiperglucemia posprandial bloqueando la actividad de la α – glucosidasa, que es responsable de la degradación de los carbohidratos (Li *et al.*, 2008). Entre los más utilizados se encuentra la acarbosa, fármaco que actúa inhibiendo α- amilasa y α- glucosidasa, ambas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de carbohidratos (Obih *et al.*, 2016; Proença *et al.*, 2019).

De manera general, a continuación, se describen las etapas para la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa (**Figura 3**).

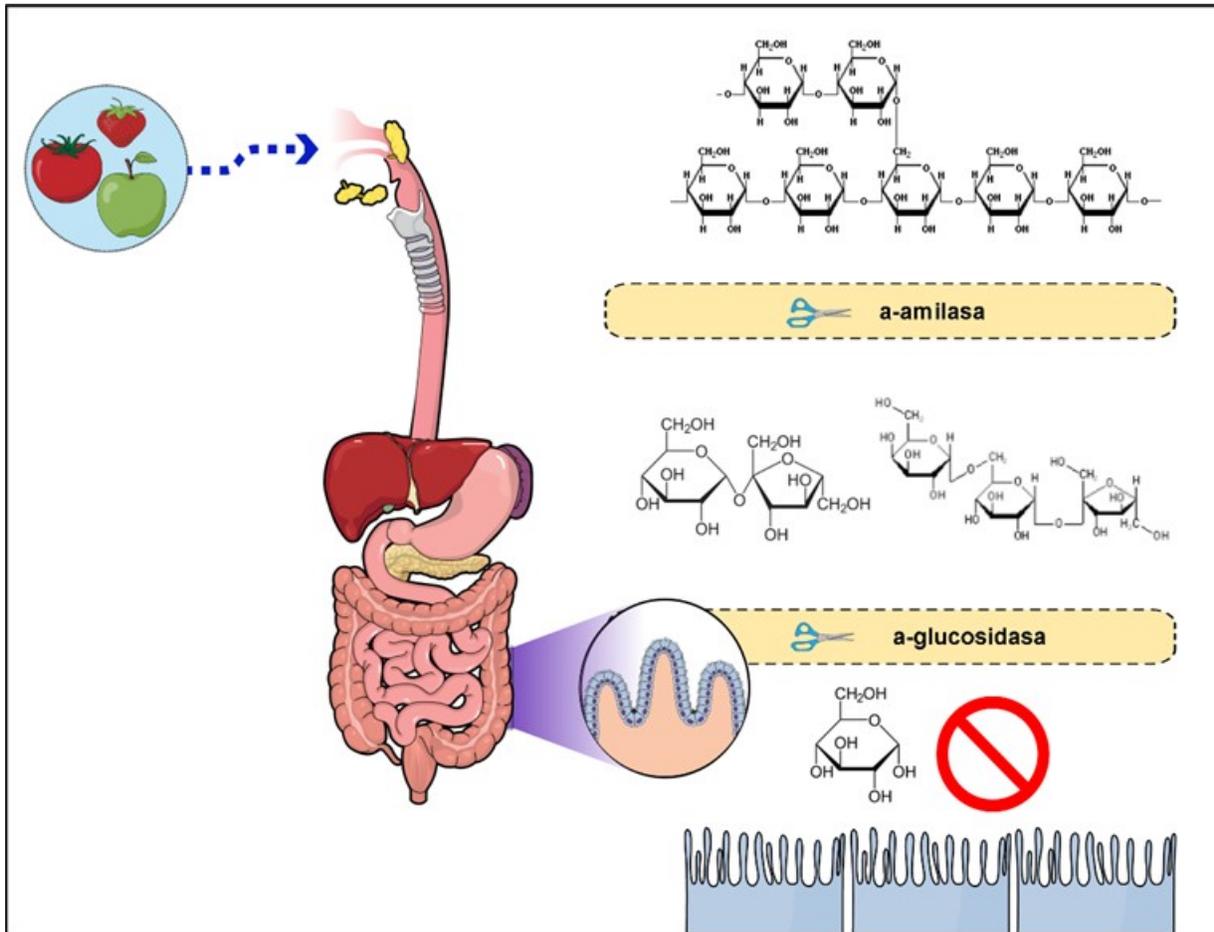


Figura 3. La inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa disminuye la hiperglucemia posprandial en DM2. Modificado de Nasab *et al.* (2020).

La absorción intestinal de carbohidratos se realiza en forma de monosacáridos tales como glucosa, fructosa y galactosa. Los alimentos se componen principalmente de hidratos de carbono complejos (Massó *et al.*, 2009). Para su absorción tienen que ser hidrolizados por α -amilasa salival y pancreática en oligosacáridos y disacáridos (Ademiluyi *et al.*, 2013), los cuales adicionalmente son hidrolizados por α -glucosidasa para dar lugar a monosacáridos; dicha hidrólisis tiene lugar en el borde del cepillo perteneciente a la mucosa intestinal del duodeno y la primera porción del yeyuno (Pacheco-Leal, 2004).

Los inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa bloquean la hidrólisis de carbohidratos complejos, por lo tanto, la inhibición de ambas enzimas la disminuye la velocidad de digestión de carbohidratos y como resultado se absorbe y transporta menos glucosa a la circulación sanguínea (Tarling *et al.*, 2008).

La acarbosa actúa como un inhibidor enzimático, por lo tanto, facilita el control del nivel de azúcar en la sangre y asegura el retraso en el aumento del estado hiperglucémico postprandial después de una comida (Baron, 1998; Chiasson *et al.*, 2002; Hakamata *et al.*, 2009). Aunque, la acarbosa es una opción terapéutica prometedora para los diabéticos, se ha demostrado que la ingesta continua de acarbosa y medicamentos similares exhiben efectos secundarios como flatulencia, diarrea, trastornos abdominales y hepáticos (Godbout *et al.*, 2007).

Por lo anterior, es importante la búsqueda de nuevos inhibidores de la α -glucosidasa y/o α -amilasa con menores efectos no deseados o ausentes para el tratamiento de la DM2. Recientemente, se descubrió que los productos naturales son una fuente prometedora de inhibidores de la α -glucosidasa y/o de la α -amilasa (Brown *et al.*, 2017), lo que trae consigo la búsqueda y estudio de nuevos agentes antidiabéticos.

2.1.2. Obesidad

La obesidad es un problema de salud común con el rasgo característico de la deposición excesiva de grasa en los tejidos adiposos. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que alrededor del 50% de la población mundial tiene sobrepeso [índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 kg / m²] y es obesa (IMC ≥ 30 kg / m²) (Qasim *et al.*, 2018; Bonaventura *et al.*, 2020).

La incidencia de la obesidad ha aumentado con rapidez en todo el mundo, lo que convierte a dicha enfermedad en un grave problema de salud pública del siglo XXI. La obesidad se ha definido como una enfermedad compleja y multifactorial que surge de la interacción de la ingesta calórica excesiva, el sedentarismo, el trastorno metabólico y la predisposición genética (GBD, 2017;

Saunders *et al.*, 2018). Además, la obesidad es un factor que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades degenerativas como la DM2, enfermedades cardiovasculares (hiperlipidemia, arteriosclerosis e hipertensión), osteoartritis, esteatosis hepática y varios tipos de cáncer (Chaput *et al.*, 2007; Seravalle *et al.*, 2017; Vecchié *et al.*, 2018). La incidencia de tumores sistémicos y gastrointestinales, como cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de colon, síndrome de ovario poliquístico, infertilidad, también está significativamente elevada en pacientes con obesidad (Latino-Martel *et al.*, 2016). Por tanto, la prevención y el tratamiento de la obesidad resulta clave para reducir la prevalencia y la mortalidad de las enfermedades metabólicas crónicas (Park *et al.*, 2015).

Las modificaciones en la dieta y el estilo de vida, como la restricción de calorías y los ejercicios físicos, son las estrategias habituales que se adoptan para controlar el peso corporal; pero, estos métodos tienen efectos limitados contra la obesidad (Wolfenden *et al.*, 2020). Otras de las estrategias utilizadas comprenden la prescripción de medicamentos y la cirugía (Mhatre *et al.*, 2016). Sin embargo, la liposucción a veces hace que la distribución de la grasa sea desigual. Así mismo, los científicos han descubierto que la liposucción tiene poco efecto sobre la grasa subcutánea e incluso no tiene ningún efecto al exponer a los pacientes a ciertos riesgos. La mayoría de los tratamientos actuales utilizan algún tratamiento farmacológico a corto plazo más seguro, combinado con una dieta a largo plazo y más ejercicio para lograr la pérdida de peso (Park *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020).

2.1.2.1. Intervención Farmacológica en la Obesidad. La eficacia de algunos fármacos contra la obesidad se ha visto limitada por efectos adversos, incluidos trastornos gastrointestinales, alto riesgo de cáncer y efectos perjudiciales del uso a largo plazo en algunos órganos como el hígado, el riñón y el páncreas (Chaput *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2013). En el **Cuadro 2** se muestran algunos de los medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y/o la Agencia Médica Europea (EMA), también se exponen algunos de los efectos secundarios y modos de acción de medicamentos para el tratamiento de obesidad. De igual manera, se ha documentado el retiro comercial de algunos fármacos empleados en el tratamiento de la obesidad debido a sus efectos adversos, entre ellos sibutramina, el rimonabant, la fenfluramina y

la dexfenfluramina, entre otros (Cheung *et al.*, 2013). Por lo anterior, existe la necesidad de una terapia alternativa segura pero eficaz contra la enfermedad.

Cuadro 2. Resumen de medicamentos contra la obesidad para uso a largo plazo. Modificado de (Tak *et al.*, 2021)

Fármaco	Mecanismo de acción	Principales efectos adversos	Contraindicaciones
Orlistat	Inhibidor de la lipasa gastrointestinal y pancreática; disminuir la absorción de lípidos	Heces aceitosas, manchado aceitoso, urgencia fecal, incontinencia fecal, hiperdefecación, flatos con secreción, deficiencia de vitaminas A, D, E y K	Embarazo, colestasis, malabsorción
Fentermina / topiramato	Agonista de NE / agonista de GABA, antagonista de glutamato; suprimir el apetito	Parestesia, sequedad de boca, estreñimiento, insomnio, disgeusia, ansiedad, depresión	Embarazo, HTA no controlada, ECV, ERC, glaucoma, hipertiroidismo en pacientes con IMAO
Naltrexona / bupropión	Antagonista del receptor de opioides / -agonista de la dopamina e inhibidor de la recaptación de NE; aumentar la saciedad, suprimir el apetito	Náuseas, dolor de cabeza, estreñimiento, mareos, vómitos, sequedad de boca	Embarazo, HTA no controlada, convulsiones, anorexia o bulimia nerviosa, interrupción brusca del alcohol, benzodiazepinas, barbitúricos o fármacos antiepilépticos, otros fármacos que contienen bupropión, opioides o agonistas de opiáceos, IMAO
Liraglutida	Agonistas del receptor de GLP-1; vaciamiento gástrico lento, aumenta la saciedad, disminuye la recompensa alimentaria	Náuseas, diarrea, estreñimiento, vómitos, dispepsia.	Embarazo, antecedentes personales o familiares de carcinoma medular de tiroides o MEN tipo 2

ERC, enfermedad renal crónica; ECV, enfermedad cardiovascular, GABA, ácido gamma-aminobutírico; HTA: hipertensión; IMAO, inhibidores de la monoaminoxidasa; MEN, neoplasia endocrina múltiple; NE, norepinefrina; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1.

2.1.2.2. Inhibidores de Lipasa Pancreática. Aunque existen varias estrategias profilácticas y terapéuticas contra la obesidad, la opción más eficaz y ampliamente utilizada implica el uso de fármacos como el orlistat, el cual inhibe la actividad de lipasas gastrointestinales y pancreáticas, bloqueando así la hidrólisis de triglicéridos y la absorción de ácidos grasos llevada a cabo en el endotelio intestinal (Mukherjee, 2003; Birari *et al.*, 2007; Tak *et al.*, 2021). Además inhibe la absorción de aproximadamente el 30% de la grasa de la dieta (Kim *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de orlistat se considera adecuado para quienes tienden a comer alimentos grasos y se espera que tenga mayores efectos de pérdida de peso que en aquellos con hábitos de consumo de alimentos no grasos (Tak *et al.*, 2021). De manera general, en la (**Figura 4**) se describe la vía metabólica de los lípidos en el cuerpo humano y el mecanismo de inhibición de lipasa.

Cuando el cuerpo humano ingiere el alimento que contiene grasa, el lípido a base de triglicéridos primero se hidroliza por la lipasa a monoglicérido, éster de glicerilo y ácido graso libre, siendo mayor el contenido de los productos 1,2-glicólido y ácidos grasos. La degradación de la grasa por la lipasa lingual es muy pequeña, pero puede degradar del 50% al 70% de la ingesta de grasa de los bebés y niños pequeños (Liu *et al.*, 2020).

Después de que se hidrolizan los triglicéridos en ácidos grasos libres y monoacilglicerol por la lipasa gástrica (10% al 30% de descomposición) y la lipasa pancreática (50% al 70% de descomposición) en el tracto gastrointestinal y el intestino delgado (Liu *et al.*, 2020), los monoglicéridos y los ácidos grasos libres se trasladan posteriormente a los enterocitos, las células que recubren los intestinos, donde son absorbidos (Lowe, 1997; Lowe, 2002). Después se forma colesterol y lipoproteína en el intestino delgado. Las partículas mixtas de lípidos, como los ácidos biliares, son absorbidas por el intestino delgado, dando lugar a la resíntesis de triacilglicerol para el almacenamiento de energía en forma de tejido adiposo (Liu *et al.*, 2020).

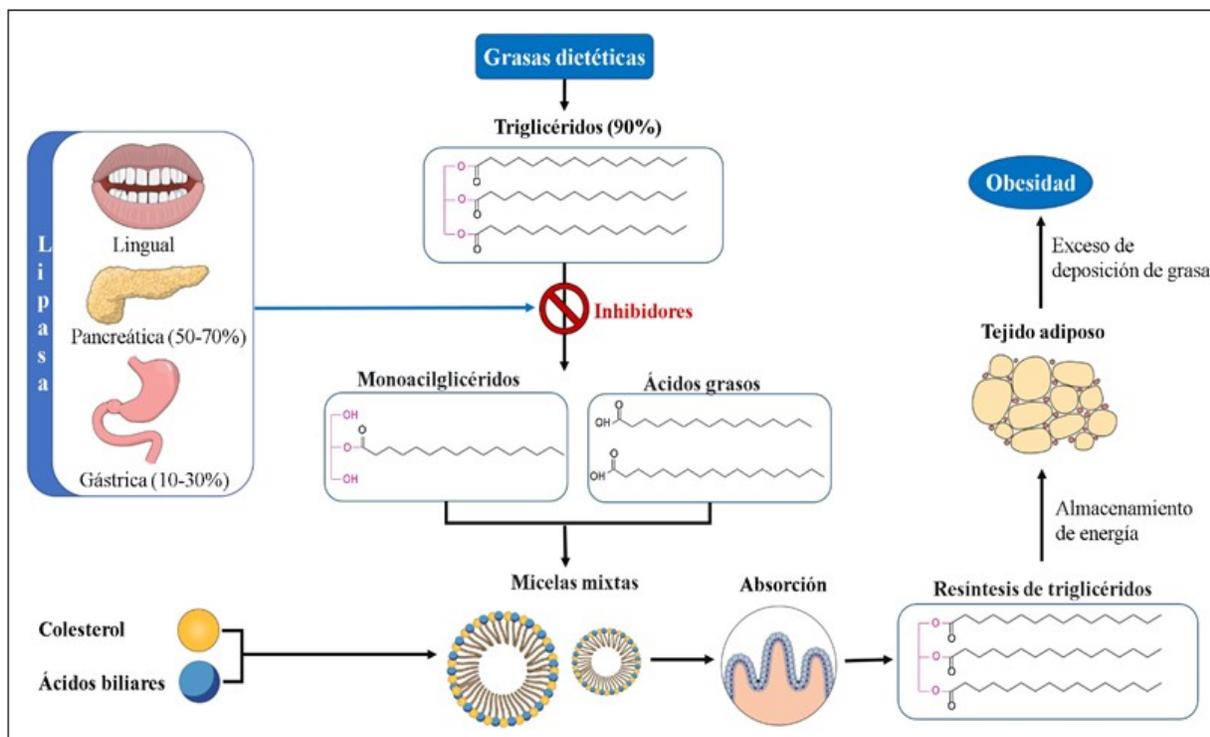


Figura 4. Vías metabólicas de los lípidos en el cuerpo humano. Modificado de Liu *et al.* (2020).

Contrario a lo anterior, el mecanismo de inhibición de lipasa consiste en lo siguiente. El desarrollo de la obesidad está estrechamente relacionado con el metabolismo de la grasa corporal. La dieta principal está compuesta por triglicéridos mixtos (90%). Sin embargo, la grasa exógena no puede ser utilizada directamente por el cuerpo humano, por lo que es hidrolizada para su absorción. Las lipasas presentes en el sistema digestivo incluyen la lipasa lingual, la lipasa gástrica y la lipasa pancreática. A menudo se considera que la lipasa gástrica es un factor importante que regula la secreción de lipasa pancreática y desempeña un papel auxiliar en la lipólisis (Basque *et al.*, 2000; Aloulou *et al.*, 2008). No obstante, el factor principal lo desarrolla la lipasa pancreática, debido a que afecta directamente la absorción de ácidos grasos en el intestino (Liu *et al.*, 2020). Por lo general, la triacilglicerol lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) es la principal lipasa secretada por el páncreas, actúa en el duodeno y cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles (sustratos) mediante la escisión de los enlaces éster sn-1 y sn-3, lo que produce sn-2-monoacilgliceroles y ácidos grasos libres (Mhatre *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2020; Moreno-Córdova *et al.*, 2020).

Mientras que los inhibidores de la lipasa, al combinarse con la parte activa de la lipasa del estómago

y el intestino delgado inhiben la actividad catalítica y, por lo tanto, se conduce a un retraso deseable en la degradación de los triacilgliceroles, así como a la reabsorción diferida concomitante de sus productos catabólicos (Moreno-Córdova *et al.*, 2020). El retraso en la hidrólisis y reabsorción de grasas conduce a una reducción de la acumulación de tejido adiposo y consigue el efecto de controlar y tratar la obesidad; además, hay una pérdida de la mayoría de las grasas de la dieta a través de las heces (Sánchez *et al.*, 2008; Moreno-Córdova *et al.*, 2020). Después de que actúa el inhibidor de la lipasa, generalmente se excreta junto con la lipasa a la que se une. Por tanto, no provoca efectos a largo plazo en el cuerpo humano (Liu *et al.*, 2020). Este mecanismo bloquea la absorción de aproximadamente un tercio de los ácidos grasos consumidos con los alimentos. Como resultado, se reduce la absorción de calorías sin afectar el apetito (Seo *et al.*, 2019).

Si bien el fármaco orlistat es bien tolerado, debido a las grasas no absorbidas en el intestino, los pacientes pueden experimentar esteatorrea, deposiciones frecuentes, flatos con secreción e incontinencia fecal. Además, este medicamento evita la absorción de las vitaminas liposolubles, por lo que se deben considerar los suplementos de vitamina A, D, E y K para su uso a largo plazo (Tak *et al.*, 2021). Los inhibidores de la lipasa pancreática han recibido una atención considerable por parte de los investigadores en los últimos años, debido a su diversidad estructural, baja toxicidad y su origen proveniente de una amplia gama de fuentes naturales (Liu *et al.*, 2020). Varios productos inhibidores de lipasa pancreática poseen la capacidad de inducir la reducción del peso corporal y prevenir la obesidad inducida por la dieta (Mohamed *et al.*, 2014; Zielinska *et al.*, 2020; Anigboro *et al.*, 2021).

2.2. Estrés Oxidativo y el Síndrome Metabólico

La producción *in vivo* continua de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno puede provocar la muerte celular y el daño tisular (Kalpana *et al.*, 2008; Je *et al.*, 2009). En condiciones patológicas, existe una sobreproducción de radicales libres debido a la presencia de compuestos prooxidantes, o bien debido a la exposición hacia otros factores de riesgo como fumar, exceso de actividad física, estrés, entre otros, lo que da lugar al estrés oxidativo (**Figura 5**) (Ferreira *et al.*, 2009). Además, las

alteraciones mediadas por radicales libres a ADN, proteínas y lípidos de membrana están asociadas con una gran cantidad de patologías, que incluyen aterosclerosis, cáncer, úlceras gástricas, diabetes y trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer (Frölich *et al.*, 1995).

De igual manera, algunos autores han planteado que pacientes con síndrome metabólico, el estrés oxidativo puede verse amplificado por una deficiencia antioxidante, lo cual puede favorecer la propagación de alteraciones oxidativas desde espacios intracelulares a extracelulares, generando así un estado de estrés oxidativo sistémico (Vendemiale *et al.*, 1995; Sahaf *et al.*, 2005).

2.2.1. Estrés Oxidativo en la Diabetes

En diabetes mellitus, con el desarrollo de hiperglucemia crónica se pueden alterar varias vías de señalización en diferentes tejidos, produciendo estrés oxidativo y la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE), así como la secreción de las citocinas proinflamatorias y la muerte celular (autofagia y/o apoptosis) (Volpe *et al.*, 2018).



Figura 5. Causas, objetivos, órganos afectados y antioxidantes que combaten el estrés oxidativo. Tomado de Carochó *et al.* (2018).

Asimismo, Jang *et al.* (2017) han demostrado que el metilglioxal (MGO) junto con especies reactivas de oxígeno (EROS), pueden inducir la apoptosis en las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Los factores descritos anteriormente pueden conllevar al desarrollo de complicaciones en diabetes (**Figura 6**) (Fiorentino *et al.*, 2013; Volpe *et al.*, 2018).

En la hiperglucemia, los EROS reducen el nivel de insulina que controla la transcripción del gen y finalmente causa apoptosis en células β (Quan, 2019). La autofagia, la necroptosis y la apoptosis son los tipos de muerte celular con diferentes funciones. La autofagia es un paso crítico en el daño tisular. Además, se ha establecido que el desequilibrio entre la autofagia y la apoptosis puede establecer la progresión de las complicaciones de la diabetes (Di Rosa *et al.*, 2016). A su vez, tanto la apoptosis como la necroptosis tienen un papel importante en la progresión de las complicaciones diabéticas y pueden provocar lesiones tisulares en el corazón, la retina, los riñones y el sistema nervioso (Di Rosa *et al.*, 2016).

Por lo tanto, resulta de vital importancia el uso de antioxidantes en la dieta o en combinación con fármacos antidiabéticos que pueden ayudar en gran medida al sistema inmunológico a combatir la condición hiperglucémica y por ende el estrés oxidativo causado por la diabetes (Harmon *et al.*, 2005; Okon *et al.*, 2015; Volpe *et al.*, 2018).

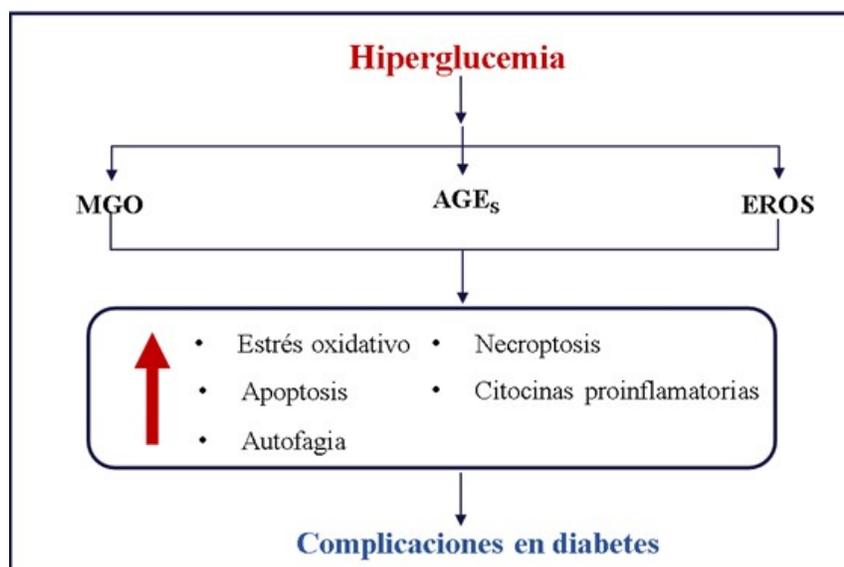


Figura 6. Factores que conllevan a complicaciones de la diabetes. Tomado de Volpe *et al.* (2018).

2.2.2. Estrés Oxidativo en la Obesidad

Actualmente, la evidencia científica ha demostrado que la acumulación de grasa y la obesidad están relacionadas con un mayor estrés oxidativo (Vincent *et al.*, 2007; Imessaoudene *et al.*, 2016; Furukawa *et al.*, 2017). El estrés oxidativo crónico está relacionado con unas defensas antioxidantes inadecuadas y una mayor formación de radicales libres, especialmente en el exceso de tejido adiposo (Imessaoudene *et al.*, 2016).

La insuficiencia de las defensas antioxidantes probablemente comienza con una baja ingesta dietética de antioxidantes y fitoquímicos que poseen capacidad antioxidante (Taylor *et al.*, 2006). Además, la ingesta de fitoquímicos se correlaciona inversamente con la circunferencia de cintura alta, el índice de masa corporal (IMC) y la peroxidación de lípidos plasmáticos (Taylor *et al.*, 2006). Por otra parte, cuando la ingesta energética excede el gasto energético, es decir se da un estado de balance energético positivo, el cual puede desencadenar respuestas en muchos tipos de células, como adipocitos, células endoteliales e inmunes, que posteriormente promueven la inflamación activando vías de señalización como la quinasa c-Jun N terminal y el inhibidor de la vía kappa B quinasa-beta (Hotamisligil, 2006). Esta respuesta se caracteriza por un aumento de los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias, adipocinas y otros marcadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina (IL) -6 (Shoelson *et al.*, 2007). A su vez, estas citocinas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo. También se ven afectadas las enzimas antioxidantes endógenas, como el superóxido dismutasa (SOD), el glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). El estrés oxidativo puede dañar las estructuras celulares y provocar adiposidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Houstis *et al.*, 2006; Warolin *et al.*, 2014).

Como precursor del síndrome metabólico y de otros trastornos relacionados con la obesidad, el aumento del estrés oxidativo en la grasa acumulada debería ser un objetivo importante para el desarrollo de nuevas terapias contra la obesidad (Imessaoudene *et al.*, 2016). Además, dado el alto riesgo cardiovascular y el estrés oxidativo asociados con la obesidad, la disponibilidad de fármacos que tienen propiedades antioxidantes y reductoras de lípidos puede tener un valor clínico considerable.

Diferentes productos naturales contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos con diferentes efectos anti-obesidad sobre el metabolismo y oxidación de las grasas, por lo que se han estudiado y reportado como útiles en el tratamiento de la obesidad (Gamboa-Gómez *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018).

2.3. Funcionalidad Biológica de los Antioxidantes

Los radicales libres son estabilizados por moléculas antioxidantes. Un antioxidante se puede definir como "una sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato" (Halliwell, 1990; Neha *et al.*, 2019).

Todos los antioxidantes siguen uno de los siete mecanismos de acción, que varían según el tipo de oxidantes: a) secuestro de radicales libres del medio; b) quelación de iones metálicos; c) inhibición de enzimas productoras de radicales libres; d) activación de enzimas antioxidantes endógenas; e) prevención de la peroxidación lipídica; f) prevención de daños en el ADN; g) prevención de modificación de proteínas y destrucción de azúcar (Carocho *et al.*, 2018).

Actualmente, los compuestos naturales han surgido como candidatos clave para obtener compuestos antioxidantes, debido al reconocimiento de la relación inversa entre la ingesta dietética de antioxidantes naturales y la incidencia de enfermedades humanas (Brown *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2018).

Durante las últimas décadas varias investigaciones se han centrado en el potencial antioxidante de compuestos bioactivos provenientes de plantas (Oteiza *et al.*, 2005). A su vez, se ha reportado que hongos endófitos, bacterias, algas y actinomicetos aislados de plantas también representan una fuente potencial de antioxidantes novedosos para aplicaciones farmacéuticas e industriales (Uma *et al.*, 2011; Ayed *et al.*, 2015; Toghueo *et al.*, 2019). Diversos estudios han aportado información que establece a los antioxidantes como benéficos para la salud, debido a que reducen la aparición de diferentes trastornos o enfermedades como: envejecimiento, cáncer, diabetes, inflamación,

enfermedad hepática, enfermedad cardiovascular, cataratas, nefrotoxicidad y trastornos neurodegenerativos (Neha *et al.*, 2019).

2.3.1. Antioxidantes como Inhibidores Enzimáticos

Los antioxidantes se han convertido en un tema de interés constante ya que cantidades masivas de radicales libres resultan en enfermedades crónicas o potencialmente mortales (Young *et al.*, 2001). Los antioxidantes pueden retrasar o prevenir significativamente la oxidación de sustratos oxidables (Kasote *et al.*, 2015). La suplementación con antioxidantes exógenos es uno de las más prometedoros métodos para contrarrestar el estrés oxidativo indeseable (Kasote *et al.*, 2013). Asimismo, en los últimos años se ha reconocido la relación inversa entre la ingesta dietética de antioxidantes naturales y la incidencia de enfermedades humanas, tales como diabetes y obesidad (Huang *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020).

Estas contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico, el cual se relaciona con la actividad de las enzimas que participan en entidades patológicas tales como intolerancia a la glucosa, hipertensión y obesidad abdominal. Algunas de esas enzimas son α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), enzima convertidora de angiotensina (ECA) (EC 3.4.15.1) y lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) (Tan *et al.*, 2016).

La reducción de la hiperglucemia posprandial mediante la inhibición de las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos (α -glucosidasa y α -amilasa), la inhibición de las enzimas lipolíticas, incluida la lipasa, así como la inhibición del estrés oxidativo y el retraso del proceso inflamatorio son los enfoques terapéuticos más comunes para tratar síndrome metabólico (Costamagna *et al.*, 2016).

2.3.1.1. Compuestos Bioactivos Inhibidores de α -Amilasa y α -Glucosidasa. Entre los metabolitos secundarios con capacidad antioxidantes se ha reportado que polifenoles y péptidos provenientes

de fuentes naturales tales como algas, plantas, insectos y hongos presenta potencial para inhibir las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa, enzimas clave en el metabolismo de glucosa (Nwosu *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2019; Si *et al.*, 2020; Zielinska *et al.*, 2020). La inhibición de estas enzimas reduce la digestión de carbohidratos, por lo que reduce la absorción de glucosa y los niveles séricos de glucosa (Tarling *et al.*, 2008). Por tanto, los inhibidores de enzimas pueden ser candidatos potenciales para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Nasab *et al.*, 2020).

Dicho potencial de inhibición se ha atribuido a la capacidad antioxidante, la cual, a su vez puede reducir el daño oxidativo asociado con las complicaciones de la diabetes (Fiorentino *et al.*, 2013). Se ha encontrado que la actividad antidiabética de los compuestos bioactivos está estrechamente relacionado a la estructura de estos. Para el caso de flavonoides se ha encontrado que las actividades más altas están relacionadas con el número de grupos hidroxilo en las moléculas (Sales *et al.*, 2012).

Por otro lado, se descubrió que las momilactonas son buenos inhibidores de la α -glucosidasa y la α -amilasa, dicho efecto se atribuyó al anillo de lactona α , β -insaturado con un sustituyente hidroxilo (Quan, 2019). Otro elemento a considerar son los péptidos, se ha establecido que la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa se atribuye a la presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) e hidrofóbicos (Siow *et al.*, 2017; Zielinska *et al.*, 2020).

Entre otras fuentes productoras de metabolitos secundarios se encuentran las bacterias, se ha reportado que *Bacillus amyloliquefaciens* produce el compuesto (S)-2-hidroxi-N-((S)-1-((S)-8-hidroxi-1-oxoisocroman-3-il)-3-metilbutil)-2-((S)-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)acetamida, el cual inhibe a α -glucosidasa en 52.98% (Shahzad *et al.*, 2018). Asimismo, se ha documentado que Chungkookjang un alimento tradicional coreano de soja, fermentado con la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, presenta actividad antidiabética debido a que mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa y reduce la apoptosis de las células β , lo que se ha atribuido a la presencia de isoflavonas como son daidzina, genistina, daidzeina y glicanos isoflavonoides (Jeong *et al.*, 2020).

2.3.1.2. Compuestos Bioactivos Inhibidores de Lipasa Pancreática. La lipasa pancreática es la enzima más importante responsable de la digestión de la grasa de la dieta, ralentizando la deposición de grasa en el tejido adiposo y la supresión del aumento de peso, que tiene efectos beneficiosos para el sobrepeso y la obesidad (Podsdek *et al.*, 2014; Dechakhamphu *et al.*, 2015). Actualmente, se ha documentado la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática mediante el empleo de compuestos bioactivos como polifenoles (Yuan *et al.*, 2018), polisacáridos (Aguilera-Angel *et al.*, 2018), péptidos (Jakubczyk *et al.*, 2019), alcaloides (Pereira *et al.*, 2017) y saponinas (Del Hierro *et al.*, 2021).

Las bioactividades tales como hipolipemiente/antiobesidad provenientes de fuentes naturales, se han asociado a la estructura de los metabolitos secundarios. Zhang *et al.* (2021), reportaron que el extracto de péptidos la especie marina *Cucumaria frondosa* inhibió la lipasa pancreática y dicho efecto se atribuyó a la anfipaticidad de los aminoácidos constituyentes, características estructurales e interacciones intensas con residuos catalíticos. De igual manera, se ha reportado que las hojas de *Ligustrum purpurascens* contienen glucósidos fenilpropanoides y se ha destacado la relación entre el grupo hidroxilo fenólico como una característica estructural importante que podría aumentar la afinidad de unión y la inhibición de la lipasa (Wu *et al.*, 2017).

Por lo anterior, la inhibición de estas enzimas podría ayudar a reducir el valor energético de los alimentos, reduciendo su disponibilidad y la extensión del proceso de digestión, reduciendo así el peso corporal y generando beneficios de gran alcance para la salud (Han *et al.*, 2001; Mohammad *et al.*, 2013; Worsztynowicz *et al.*, 2014; Zielinska *et al.*, 2020).

2.4. *Bacillus* en la Producción de Metabolitos Secundarios

Las especies naturales que son la fuente de los compuestos bioactivos abarcan todos los reinos biológicos, especialmente los invertebrados marinos, plantas, hongos y bacterias (ASP, 2016). En el caso de bacterias, uno de los géneros más empleados es el de *Bacillus*, que pertenece a un grupo de bacterias heterogéneas filogenéticamente y fenogenéticamente que pueden tolerar condiciones

extremas y dinámicas. Además, pueden producir metabolitos secundarios (Rampelotto, 2010; Baruzzi *et al.*, 2011; Hamdache *et al.*, 2011).

Entre las bacterias del género *Bacillus* se encuentra la especie *B. amyloliquefaciens* (KX953161.1). La cual tiene forma de bastoncillos y ha sido caracterizada morfológica y molecularmente. De manera general esta se caracteriza por tener consistencia cremosa y mucosidad, forma irregular y color claro crema, así como flagelación tipo peritrica y además es Gram (+) (Ley-López *et al.*, 2018). Dicha especie ha atraído un interés considerable debido a que son capaces de producir una amplia gama de compuestos antimicrobianos activos, lipopéptidos, macrolactinas, enzimas hidrolíticas y ciertos compuestos volátiles. Además, esta especie tiene un 8.5% de su genoma dedicado a la síntesis de metabolitos (Chen *et al.*, 2007a).

Entre los metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens* destacan los lipopéptidos, debido a que tienen propiedades antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas, inmunomoduladoras contra la aterosclerosis y son surfactantes excepcionales (Cooper *et al.*, 1981; Ongena *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2017; Murai *et al.*, 2017). Dichas moléculas también se han reconocido como biosurfactantes, los cuales se han descrito como eficaces para prevenir algunas enfermedades crónicas de alta prevalencia (Sekhon *et al.*, 2012).

2.4.1. Importancia de los Lipopéptidos

Actualmente, se ha demostrado que los lipopéptidos se consideran entre las sustancias menos tóxicas y además presentan alta estabilidad a la temperatura y resistencia a las proteasas (Cameotra *et al.*, 2004; Ayed *et al.*, 2017). Entre las actividades biológicas reportadas, se ha encontrado que los lipopéptidos pueden actuar como agentes antimicrobianos, antiadhesivos, antitumorales, antivirales, antiinflamatorios e inmunomoduladores (Rodrigues *et al.*, 2006). Por lo que estos compuestos podrían constituir alternativas ecológicas a los pesticidas químicos o ser ingredientes útiles para fines cosméticos o terapéuticos (Tabbene *et al.*, 2012; Deravel *et al.*, 2014).

2.5. Generalidades de Lipopéptidos Cíclicos

Los lipopéptidos constituyen un grupo estructuralmente diverso de moléculas, que se componen de 7 a 25 aminoácidos (grupo hidrofílico), unidos a los ácidos grasos β -hidroxi o β -amino (grupo hidrofóbico), generalmente de manera cíclica (Raaijmakers *et al.*, 2010). A menudo son modificados por metilación, acilación o glicosilación. Existen muchas formas isoméricas, debido a las variaciones en la composición de aminoácidos o la diferente longitud de la cadena de ácidos grasos (Ongena *et al.*, 2008). Se ha informado que muchas especies de hongos, bacterias y actinomicetos producen lipopéptidos con diversas actividades biológicas. Estas moléculas se producen de manera no ribosómica a través de grandes complejos multienzimáticos por sintetasas peptídicas no ribosómicas sin involucrar ARN mensajero (Leclere *et al.*, 2005), dicho proceso se lleva a cabo en membranas celulares de microorganismos (Chen *et al.*, 2007a).

Las especies bacterianas que producen biosurfactantes lipopeptídicos pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Arthrobacter* (Ongena *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, dentro del género *Bacillus*, las especies *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. amyloliquefaciens* son las principales productoras de biosurfactantes de lipopéptidos (Arima, 1968; Wakayama *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008a).

El hecho de que muchas cepas de *Bacillus* produzcan más de una la familia de lipopéptidos puede mejorar su propiedades biológicas debido a interacciones simultáneas entre los diferentes compuestos (Falardeau *et al.*, 2013). La mezcla de lipopéptidos puede ser beneficiosa y podría tener una aplicación futura, pero los diversos efectos de las diferentes mezclas de lipopéptidos de los aislados de *Bacillus* aún deben investigarse en detalle (Deravel *et al.*, 2014).

Entre los lipopéptidos cíclicos destacan tres familias principales: iturina, surfactina y fengicina (**Figura 7**), y también se han identificado algunas otras moléculas como kurstarkin, micosubtilina, bacilomicina y liquenisina (Peypoux *et al.*, 1986; Volpon *et al.*, 1999; Hathout *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010; Bechet *et al.*, 2012; Dimkic *et al.*, 2017).

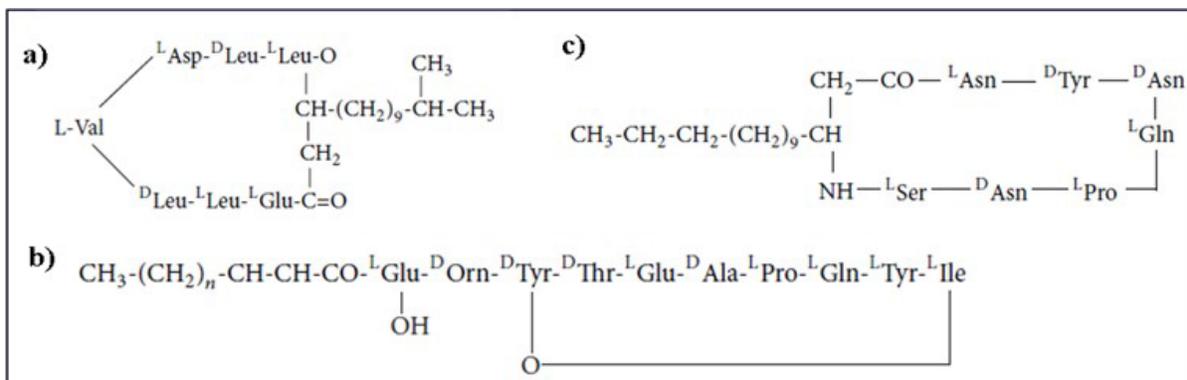


Figura 7. Estructura de los lipopéptidos cíclicos a) Surfactina b) Fengicina c) Iturina. Tomado de Meena *et al.* (2015).

2.5.1. Surfactina

La surfactina (~1.36 kDa) es un lipopeptido cíclico anfipático, su estructura se encuentra conformada por un anillo de lactona cíclica que consiste en un ácido graso β -hidroxi C12-C16 y un heptapéptido con un aminoácido variable en las posiciones 2, 4 y 7 (Bonmatin *et al.*, 1995; Seydlová *et al.*, 2011).

Por lo general, la secuencia de sus aminoácidos es Glu- Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu (Seydlová *et al.*, 2011). Los aminoácidos hidrofóbicos de la molécula de surfactina se encuentran en las posiciones 2, 3, 4, 6 y 7, mientras que los residuos de Glu y Asp se encuentran en las posiciones 1 y 5, respectivamente. Además, las isoformas de surfactina coexisten en la célula como una mezcla de varias variantes peptídicas o con una longitud de cadena alifática diferente (Tang *et al.*, 2007; Korenblum *et al.*, 2012). El patrón de aminoácidos y ácidos grasos β -hidroxi en la molécula de surfactina depende no solo de la cepa bacteriana productora sino también del tipo de condiciones de cultivo (Seydlová *et al.*, 2011).

Por la estructura anfifílica, la surfactina es considerado uno de los biosurfactantes más fuertes. Los estudios sobre surfactina se han centrado en sus propiedades contra los microorganismos fitopatógenos, como la capacidad antibacteriana, antifúngica, inhibitoria en la formación de coágulos de fibra y antiviral (Wang *et al.*, 2017).

2.5.2. Fengicina

La fengicina es un lipopéptido bioactivo que también es conocido como Plipastatina. La estructura de esta molécula contiene una cadena peptídica de 10 aminoácidos unidos a una cadena de ácido graso (Akpa *et al.*, 2001). La longitud de la cadena de ácidos grasos puede variar de átomos de carbono C-14 a C-17, dando así diferentes compuestos homólogos o isómeros. La porción peptídica del lipopéptido de fengicina consiste en una cadena deca péptida, de la cual 8 aminoácidos (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr e Ile) están involucrados en la formación de un anillo peptídico a través del enlace de lactona entre el lado -cadena fenólica-OH grupo de Tyr3 y C-terminal-COOH grupo de Ile10 (Pathak *et al.*, 2012). La variación en un solo aminoácido en la sexta posición en el anillo peptídico da lugar a dos homólogos. La fengicina A contiene Ala en la posición 6, mientras que el homólogo B contiene Val (Vater *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Meena *et al.*, 2015).

Diversos estudios han demostrado que fengicina producida por *Bacillus subtilis* juega un papel crucial como antifúngicos, agentes antibacterianos y antitumorales (Luo *et al.*, 2015). Las propiedades biológicas de esta molécula, se han atribuido a que fengicina hace más permeable la membrana plasmática de la célula objetivo (Deleu *et al.*, 2008). Lo cual es debido a su naturaleza anfifílica y su afinidad por las bicapas lipídicas (Chen *et al.*, 2010).

2.5.3. Iturina

Entre los tres lipopéptidos cíclicos más destacados, iturina tiene la masa molecular más pequeña, siendo esta de ~1.1 kDa (Aranda *et al.*, 2005). El lipopéptido de iturina es un péptido cíclico de 7 aminoácidos (heptapéptidos) unidos con Asp o Asn en la posición 1 a una cadena de ácido graso (β -amino) que puede variar de moléculas de carbono C-14 a C-17 (Volpon *et al.*, 1999; Tsuge *et al.*, 2001). Esta estructura manifiesta carácter anfifílico, lo que permite su interacción con membranas celulares, siendo este el sitio más probable para su acción (Aranda *et al.*, 2005).

Entre los homólogos de esta molécula se encuentran iturina A, B, D y D. La iturina A que consta de dos partes principales: una parte peptídica compuesta de 7 aminoácidos y cola hidrofóbica de 11-12 carbonos (Tsuge *et al.*, 2001).

Por otro lado, este lipopéptido ha sido considerado no tóxico, debido a que no causa daño en ratones a concentraciones menores de 5000 mg por kg (Zhao *et al.*, 2018).

2.6. Propiedades Antioxidantes de Lipopéptidos

Actualmente, se han desarrollado escasas investigaciones sobre el potencial antioxidante de los lipopéptidos. En el **Cuadro 3** se muestran algunos estudios del efecto que tienen sobre la inhibición de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). No obstante, existen otros métodos para determinar la capacidad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres (Ramos *et al.*, 2008). La evaluación de la capacidad antioxidante tiene un interés creciente debido a las funciones protectoras en productos alimenticios y farmacéuticos contra el deterioro oxidativo en el organismo contra los procesos patológicos mediados por el estrés oxidativo (Gulcin, 2020).

Por otra parte, en un estudio reciente de Jamshidi-Aidji *et al.* (2019), se realizó el análisis de efecto dirigido con un extracto que contenía una mezcla compleja de lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis*. Para esto, se realizó cromatografía en capa fina de alto rendimiento junto con diferentes bioensayos, entre ellos capacidad antioxidante por el método de DPPH. Lo anterior demostró que iturina y surfactina resultaron con capacidad antioxidante, al igual que “Kurstakins”, un compuesto identificado por primera vez.

Los estudios anteriores indican que los lipopéptidos producidos por *Bacillus spp.* tienen la capacidad de eliminar los radicales libres y de proteger las células contra el estrés oxidativo, el cual se ha asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas tales como la diabetes, hipertensión y obesidad (Nijhawan *et al.*, 2019; Germoush *et al.*, 2020; Touyz *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Inhibición de radicales DPPH por efecto de lipopéptidos.

Autor	Bacteria	Lipopéptidos	Inhibición (%)	IC₅₀	Caracterización de lipopéptidos
Yalcin <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	Surfactina	75-80	0.25 mg/mL	HPLC FTIR
Tabbene <i>et al.</i> (2012)	<i>B. subtilis</i>	Bacilomicina		93.88 μ M 94.47 μ M 90.08 μ M	TLC MALDI-TOF
Ayed <i>et al.</i> (2015)	<i>B. majavensis</i>	Surfactina y Fengicina	65		HPLC MALDI-TOF
Jamshidi-Aidji <i>et al.</i> (2019)	<i>B. subtilis</i>	Surfactina, Iturina y Kurstakins			HPTLC-MS
Ayed <i>et al.</i> (2017)	<i>B. amylolyquefaciens</i>	Surfactina, Bacilomicina y Fengicina	81%		HPLC MALDI-TOF

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

FTIR: Espectroscopía infrarroja

TLC: Cromatografía en capa fina

MALDI-TOF: Matrix asistida por láser de desorción / ionización acoplada a un analizador de tiempo vuelo

HPTLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas

IC₅₀: Concentración media inhibitoria.

2.7. Propiedades Biológicas de Lipopéptidos

Por lo general los lipopéptidos tienen excelente actividad superficial y actividad antifúngica o bacteriana (Chen *et al.*, 2008a). Otros estudios han reportado que surfactina, fengicina e iturina, así como bacilomicina tienen propiedades antiproliferativas contra células de cáncer de mama, colon, pulmonar y renal (Chen *et al.*, 2008a; Cheng *et al.*, 2008; Hajare *et al.*, 2013; Ramalingam *et al.*, 2019).

Además, se ha documentado mediante estudios *in vivo* que iturina aumentó significativamente la abundancia de probióticos. En general, estas moléculas tienen un gran potencial para convertirse en aditivos alimentarios funcionales para mejorar la abundancia de probióticos en la microflora intestinal y ejercer su potencial antitumoral al causar efectos citotóxicos en las células cancerosas e inhibir su crecimiento (Zhao *et al.*, 2018).

En un estudio reciente de Jamshidi-Aidji *et al.* (2019), se realizó el análisis de efecto dirigido con un extracto de lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis*. Es decir, se realizó cromatografía en capa fina de alto rendimiento junto con diferentes bioensayos, entre ellos la inhibición de α -glucosidasa. Lo anterior, demostró que iturina, surfactina y kurstakins inhiben de manera muy efectiva a α -glucosidasa.

En investigaciones de Zouari *et al.* (2015), se ha reportado que la administración de lipopéptidos producido por *Bacillus subtilis* a ratas diabéticas no obesas, ejerció efectos sobre trastornos de salud asociados con la diabetes tipo 1. De igual manera, Zouari *et al.* (2017) llevaron a cabo un estudio *in vivo* donde a las ratas se les administró una dieta alta en grasas y alta en fructosa con el fin de inducir obesidad e hiperglucemia, no obstante se reportó que la administración de lipopéptidos revirtió en efecto a niveles normales de glucosa en sangre y redujo significativamente la actividad de la α -amilasa en el plasma, enzima que desempeña un papel clave en la digestión de los carbohidratos. De igual manera, se documentó que la mezcla de lipopéptidos producidos por *Bacillus subtilis* podrían ser utilizados para tratar la hiperlipidemia e hipertrigliceridemia. Además, los lipopéptidos presentaron un efecto protector y curativo en tejido hepático. Por lo anterior, se

sugirió que los lipopéptidos podrían lograr un efecto anti-obesidad a través de la inhibición de las enzimas lipídicas digestivas, y además podrían evitar la disfunción hepática (Zouari *et al.*, 2016).

En cambio, Chen *et al.* (2020), realizaron un estudio *in vitro* encontrando que los lipopéptidos iturina, fengicina y surfactina coproducidos por la cepa de *Bacillus velezensis* tienen gran potencial para actuar como inhibidores de la lipasa. También se reveló que el mecanismo y tipo de inhibición. Por otra parte, Zouari *et al.* (2017) y Ghazala *et al.* (2017) realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*, y reportaron que la mezcla de lipopéptidos inhibe la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por lo que también podrían ser utilizados como antihipertensivos útiles.

Una de las estrategias populares en el desarrollo de fármacos contra el síndrome metabólico es la búsqueda de inhibidores que interfieran con las enzimas digestivas responsables de la hidrólisis y absorción de macronutrientes, como carbohidratos y triglicéridos (de la Garza *et al.*, 2011; Zielinska *et al.*, 2020).

Entre las terapias comúnmente utilizadas para la disminución de la hiperglucemia postprandial en pacientes diabéticos no dependientes de insulina consiste en retrasar la absorción de glucosa mediante la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos, α -amilasa, α -glucosidasa y/o β -glucosidasa, las cuales se encuentran en el tracto digestivo (You *et al.*, 2011; D'Souza *et al.*, 2012). Mientras que la lipasa pancreática es una enzima metabólica implicada en la descomposición de los triacilglicéridos en el intestino y su absorción (Inthongkaew *et al.*, 2017). La inhibición de la lipasa es uno de los métodos para el tratamiento de la obesidad mediante la atenuación de la digestión y, por tanto, la absorción de lípidos en el tracto digestivo (Maqsood *et al.*, 2017).

Por lo tanto, las investigaciones previas resultan prometedoras e indican la importancia de seguir estudiando los lipopéptidos y sus propiedades antioxidantes y biológicas a fin de obtener una posible alternativa terapéutica o coadyuvante para tratar el síndrome metabólico, así como para retrasar las complicaciones derivadas de los trastornos metabólicos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome metabólico es una condición patológica caracterizada por obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión y dislipidemia. La co-ocurrencia de estos factores se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes mellitus tipo 2. Además, en condiciones de obesidad se incrementa el nivel de especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, ion superóxido y radical hidroxilo), lo cual es debido a una alta ingesta calórica o inflamación. De igual manera, la diabetes mellitus tipo 2, un trastorno metabólico que se caracteriza por los altos niveles de glucosa en la sangre, también se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, causando daño oxidativo al tejido, así como otras afecciones. Como tratamiento para la obesidad y diabetes suministran fármacos que actúan como inhibidores enzimáticos pero cuyo uso prolongado puede provocar efectos adversos en la salud. Por lo anterior, se han buscado alternativas eficaces para el control y tratamiento de afecciones involucradas en el síndrome metabólico. Una de las principales alternativas que se tienen en la actualidad es el empleo de compuestos antioxidantes que sean capaces de suprimir enzimas relacionadas al metabolismo de lípidos y glucosa. En este sentido, se han reportado propiedades biológicas de los lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus*. Sin embargo, existen pocos estudios *in vitro* acerca de los efectos de lipopéptidos sobre la capacidad antioxidante y el síndrome metabólico. Mediante la evaluación del potencial hipoglucemiante e hipolipemiante del extracto de lipopéptidos se podrá generar información para estudios posteriores y posible desarrollo de coadyuvante que pueda ser utilizado en el tratamiento para la obesidad y/o diabetes tipo 2 (síndrome metabólico).

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 1- ¿Cuáles son los mecanismos químicos para que los lipopéptidos actúen como antioxidantes?
- 2- ¿Existen diferencias de afinidad entre los lipopéptidos y las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa?
- 3- ¿Como varia y cuál será el porcentaje de inhibición enzimática de lipasa pancreática al ser sometida a diferentes concentraciones de extracto de lipopéptidos?

5. HIPÓTESIS

- 1.- Los lipopéptidos presentan capacidad antioxidante al actuar como donadores de electrones y protones.
- 2.- El extracto de lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* presenta mayor afinidad a la enzima α -glucosidasa, por lo que se espera una mayor inhibición sobre esta enzima.
- 3- La inhibición de lipasa pancreática por el extracto de lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* será dependiente de la dosis (es decir a mayor concentración mayor inhibición). Además, se alcanzarán porcentajes de inhibición mayores al 50% debido a que las moléculas presentes podrían interactuar directamente con el sitio activo de la enzima.

6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación descriptiva y experimental en el Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos del CIAD, A.C., Unidad Culiacán. El trabajo se dividió en las siguientes etapas.

Etapas descriptiva

- Producción, extracción y purificación de lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.
- Evaluación antioxidante del extracto de lipopéptidos.

Etapas experimental

- Evaluación del potencial hipoglicemiante *in vitro* por efecto del extracto de lipopéptidos provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens* (KX953161.1).
- Evaluación del potencial hipolipemiante *in vitro* por efecto del extracto de lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Evaluar el potencial antioxidante, hipoglicemiante e hipolipemiante *in vitro* de lipopéptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens*

7.2. Objetivos Específicos

1. Producir y extraer lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.
2. Determinar la capacidad reductora total de los lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.
3. Determinar el potencial antioxidante de los lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens* mediante los métodos de ORAC y ABTS.
4. Evaluar el potencial hipoglicemiante *in vitro* del extracto de lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.
5. Evaluar el efecto hipolipemiante *in vitro* del extracto de lipopéptidos de *Bacillus amyloliquefaciens*.

8. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha incrementado la demanda de metabolitos secundarios de origen natural. Se ha estudiado a los lipopéptidos por ser resistentes a altas temperaturas, proteasas y no presentar toxicidad. Además, se ha demostrado que exhiben propiedades biológicas. Sin embargo, existen escasos estudios acerca de la capacidad antioxidante y potencial hipoglicemiante e hipolipemiante, para lo cual se busca la inhibición de enzimas clave en el metabolismo de lípidos y glucosa, la cual es considerada una de las principales alternativas para el tratamiento y control de diabetes tipo 2 y/o obesidad, patologías que conforman el síndrome metabólico. Por lo anterior, esta investigación tiene justificación en el ámbito científico y de salud.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Cepa de *B. amyloliquefaciens*

La cepa de *B. amyloliquefaciens* (KX953161.1) empleada para la producción de lipopéptidos fue proporcionada por el laboratorio de fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

9.2. Obtención del Extracto de Lipopéptidos

9.2.1. Producción de Lipopéptidos

La preparación de los medios de cultivo se realizó mediante el método de Jemil *et al.* (2017a) con algunas modificaciones. Se inoculó *Bacillus amyloliquefaciens* (KX953161.1) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 150 mL de medio de caldo nutritivo. El medio se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 48 h y posteriormente se transfirió un 3% (v / v) de inóculo a un matraz Erlenmeyer de 2 L que contenía 700 mL de medio Landy, el cual se conforma por: glucosa 20 g/L, ácido L-glutámico 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, CuSO₄ 0.0016 g/L, Fe₂ (SO₄)₃ 0.0004 g/L, MnSO₄ 0.0012 g/L. El pH del medio se ajustó a 7.0 y el cultivo se incubó durante 96 h a 27 °C con agitación a 200 rpm.

9.2.2. Extracción de Lipopéptidos

Esta técnica de extracción es una combinación de precipitación ácida y extracción con solvente

(Smyth *et al.*, 2010). El medio Landy se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para eliminar las células bacterianas. El pH del sobrenadante se ajustó a 2.0 añadiendo HCl 6 N y se almacenó a 4 °C durante la noche hasta que apareció un precipitado blanco. Luego se centrifugó el sobrenadante a 12,000 rpm durante 15 min y se recolectó el precipitado, y fue resuspendido en metanol, se ajustó el pH a 7.0 y se sometió a agitación durante 2 h a 80 rpm. Por último, se filtró el metanol para eliminar el material restante y evaporar hasta sequedad mediante evaporación rotatoria a 50 °C. El extracto de lipopéptidos fue resuspendido en metanol y se utilizó para evaluar la capacidad antioxidante en concentración específica de acuerdo a la metodología empleada.

9.2.3. Ultrafiltración de Lipopéptidos

Los lipopéptidos obtenidos de la precipitación ácida fueron utilizados para la ultrafiltración de acuerdo a Ma *et al.* (2016). Los precipitados se extrajeron dos veces con metanol anhidro durante 5 h y las impurezas insolubles se eliminaron por centrifugación a 8000 xg a 4 °C durante 20 min. El metanol se evaporó usando un evaporador rotatorio de vacío a 50 °C para concentrar los lipopéptidos y la muestra resultante se disolvió en agua ultrapura.

Los lipopéptidos se purificaron mediante ultrafiltración en dos etapas mediante una unidad de separación de celulosa regenerada Millipore con moléculas de corte de membranas menores de 10,000 Da. El primer paso, la unidad de separación por membrana de ultrafiltración se utilizó para tratar las soluciones acuosas de lipopéptidos y se recogió el fluido retenido obtenido a 4,000 rpm por 40 min a 4 °C. Luego, el pH de la mezcla se ajustó a 7.0 con NaOH 1.0 M y se añadió cierto volumen de metanol con agitación lenta durante 2 h. Segundo paso, se utilizó el mismo método y se recogió el líquido de la parte inferior del tubo. El líquido filtrado se concentró para lo cual se usó un rotaevaporador de vacío y la muestra se liofilizó para obtener el polvo de lipopéptidos, el cual fue resuspendido en tampón fosfato (0.1 M, pH 6.9) para los ensayos de inhibición de α -glucosidasa; el tampón fosfato (0.075 M, pH 7.5) se utilizó para el ensayo de inhibición de lipasa pancreática.

9.3. Métodos de Capacidad Antioxidante

9.3.1. Capacidad Reductora Total por Folin-Ciocalteu

La capacidad reductora total se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y se empleó el método propuesto por Swain *et al.* (1959) con algunas modificaciones. Se mezclaron 10 μL de 230 μL de agua destilada y 10 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pocillos. La mezcla se incubó 3 min, y se le añadió 25 μL de Na_2CO_3 4 N. Después, se incubó a temperatura ambiente durante 2 h en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 725 nm a través de un lector de microplacas Synergy HT. La cuantificación de capacidad reductora total se realizó mediante una curva estándar de ácido gálico (0.1 a 0.4 mg/mL) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/ g muestra).

9.3.2. Capacidad Antioxidante por ORAC

La capacidad antioxidante por ORAC de los extractos de lipopéptidos se determinó de acuerdo al método de Huang *et al.* (2002), el cual consiste en la disminución de la fluorescencia inducida por un generador de radicales peroxilo 2,2'-azobis, 2-amidino-propano dihidrócloruro (AAPH). Para el ensayo, se tomó una alícuota de 25 μL del extracto de lipopéptidos diluido con buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.4) (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se depositó en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con paredes oscuras. Posteriormente, la placa se introdujo en un lector de microplacas a una temperatura de incubación de 37 °C, el cual dispensó 200 μL de fluoresceína 0.96 μM y 75 μL de AAPH 95.8 μM . La reacción inició una vez que se adiciona este último reactivo. Los datos de fluorescencia se registraron cada 70 min con intervalos de 70 s a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 580 nm. Los cálculos se obtuvieron de una ecuación de regresión lineal de una curva estándar de Trolox y el área bajo la curva de la pérdida de fluorescencia. Los resultados se expresaron en μmol equivalente de Trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol TE}/\text{g extracto}$).

9.3.3. Inhibición de la Absorbancia del Radical ABTS

La capacidad antioxidante por ABTS de los lipopéptidos se determinó como lo describen Thaipong *et al.* (2006). El radical ABTS fue disuelto en agua destilada a una concentración de 7.4 mM (solución stock). El radical ABTS^{•+} se produjo al mezclar la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.6 mM (1:1 v/v) y se incubó en oscuridad a 25 °C por 12-16 h antes de su uso. Posteriormente, se preparó la solución de reacción tomando 100 µL del radical y se disolvió en 2900 µL de disolvente para ajustar la absorbancia. Para el ensayo se mezcló 10 µL de extracto de lipopéptidos (500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/mL) con 190 µL de la solución de reacción en una microplaca, y se sometió a incubación durante 30 min. Posteriormente, la absorbancia fue leída en una microplaca, y se sometió a incubación durante 30 min. Posteriormente, la absorbancia fue leída en un lector de microplacas a 734 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva de Trolox y los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto (µmol ET/g extracto).

9.4. Potencial Hipoglicemiante e Hipolipemiante

9.4.1. Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa

La actividad inhibidora de la α -glucosidasa se determinó de acuerdo al ensayo modificado del Manual de la enzima Worthington según lo informó por Cuevas-Juárez *et al.* (2014). Brevemente, en placas de 96 micropocillos se incubaron 50 µL de extracto de lipopéptidos a distintas concentraciones (5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL) por 10 min a 37 °C con 100 µL de α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (0.6 U/mL) en tampón fosfato (0.1 M, pH 6.9). Luego, se añadió 50 µL de p-nitrofenil- α -glucopiranosido 3 mM en tampón fosfato pH 6.9 (ρ NPG), y la mezcla se incubó por 12 min a 37 °C. La actividad de la enzima se determinó midiendo la liberación de ρ -nitrofenol del sustrato ρ NPG. La absorbancia a 405 nm se midió con un lector de microplacas de 96 pocillos

(Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Además, se empleó 50 μ L de acarbosa 1 mM como control.

$$\% \text{ Inhibición} = [(\Delta\text{Abscontrol}-\Delta\text{Absmuestra}) / \Delta\text{Abscontrol}] \times 100$$

9.4.2. Inhibición de la Enzima α -Amilasa

En el ensayo de inhibición de la α -amilasa se consideró el Manual de la enzima Worthington (Worthington, 1993). Para este ensayo se adicionó 50 μ L de sustrato (almidón al 1% en tampón de fosfato con pH 6.9 y 0.006 M de NaCL) y enzima (13 U/mL), y 50 μ L del extracto de lipopéptidos a distintas concentraciones (5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL) y 50 μ L de acarbosa (8.38 mg/mL). El tampón de fosfato con pH 6.9 y 0.006 M de NaCL se utilizó como blanco. Se preparó una solución madre de almidón soluble en agua que fue calentada a 90 $^{\circ}$ C en una placa caliente durante 15 min. La solución madre de α -amilasa pancreática (13 U/mL) se preparará en tampón de fosfato con pH 6.9 y 0.006 M de NaCL. La solución enzimática y la mezcla del ensayo fueron pre incubadas a 37 $^{\circ}$ C en baño maría durante 10 min y la reacción inicia al agregar la enzima. La mezcla se sometió a incubación a 37 $^{\circ}$ C durante 10 min con 50 μ L de α -amilasa pancreática a 13 U/mL, 50 μ L de sustrato a 1 mg/mL y 50 μ L de extracto de lipopéptidos (5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL). Posteriormente, se añadirá 1 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico, y la solución se calentó a 85 $^{\circ}$ C durante 15 min. Luego, la solución se transfirió a hielo hasta temperatura ambiente, y se añadió 1 mL de agua destilada. Finalmente, se añadió 250 μ L de cada muestra en una placa de 96 pocillos, y se registró la absorbancia a 540 nm con un lector de microplacas.

$$\% \text{ Inhibición} = [(\Delta\text{Abscontrol}-\Delta\text{Absmuestra}) / \Delta\text{Abscontrol}] \times 100$$

9.4.3. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática

La actividad inhibidora de la lipasa por efecto de lipopéptidos se realizó mediante el método de espectroscopía de Worsztynowicz *et al.* (2014) con algunas modificaciones. En el ensayo se utilizó p-nitrofenol palmitato (pNPP) como sustrato, que se hidroliza con lipasa para dar p-nitrofenol (pNP), un agente de color que se puede monitorear a 410 nm. La mezcla de ensayo total compuesta por 1000 μL de tampón de fosfato de sodio 0.05 M (pH 7.5 a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$) que contiene colato de sodio (1.15 mg/mL) y goma arábica (0.55 mg/mL). Después se añadió 20 μL del extracto de lipopéptidos, empleando diversas concentraciones (0.8, 2, 5, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego, se añadieron 20 μL de la solución de enzima lipasa porcina (35 mg/mL) en tampón de fosfato de sodio (0.05 M) para iniciar la reacción colorimétrica. Por último, se añadió 20 μL PNPP en isopropanol (0.01 M). La mezcla fue incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. El p-nitrofenol liberado se midió a 410 nm. La reacción de control (sin inhibidor) representó el 100% de actividad enzimática. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = [(\Delta\text{Abscontrol} - \Delta\text{Absmuestra}) / \Delta\text{Abscontrol}] \times 100$$

9.5. Diseño Experimental

Los datos de capacidad antioxidante por capacidad reductora total y ORAC se muestran con medias \pm de desviación estándar. Mientras que para el ensayo de ABTS los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, donde el factor es la concentración y se tienen cinco niveles (500, 750, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), siendo la respuesta el porcentaje de inhibición del radical ABTS.

Por otra parte, en los ensayos de inhibición enzimática de α -glucosidasa y α -amilasa, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, siendo la concentración y

se tienen cinco niveles (5, 10, 20, 30 y 40 mg/mL); la respuesta es el porcentaje de inhibición de α -amilasa y/o α -glucosidasa. De forma muy similar en el ensayo de inhibición enzimática de lipasa, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, siendo la concentración y se tienen cinco niveles (0.8, 2, 5, 8 y 10 μ g/mL).

Los diseños propuestos fueron contrastados mediante un análisis de varianza, haciendo la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). El paquete estadístico empleado para el análisis de resultados fue Minitab v.18. Con los resultados obtenidos de capacidad antioxidante por ABTS e inhibición enzimática se realizó un análisis de regresión lineal y/o logarítmico para obtener la concentración inhibitoria media (IC_{50}).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Capacidad Antioxidante

10.1.1 Capacidad Reductora Total

En el **Cuadro 4** se muestran los resultados correspondientes a capacidad reductora total (CRT) del extracto de lipopéptidos, comparado con estudios reportados en otras fuentes. En CRT el extracto de lipopéptidos presentó una concentración de 75.80 ± 5.06 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

En la determinación de la CRT, se emplea el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C), y el estándar ácido gálico se emplea para cuantificar otro tipo de moléculas como son los compuestos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Sin embargo, el reactivo F-C reacciona con compuestos fenólicos, además, de otros compuestos reductores como el ácido ascórbico, ácido deshidroascórbico, azúcares reductores (glucosa y fructosa) y aminoácidos (tirosina, el triptófano y cisteína) (Matsushita *et al.*, 1966; Singleton *et al.*, 1999; Everette *et al.*, 2010).

El valor obtenido en CRT es superior a lo reportado por Cho (2020) y Piotrowicz *et al.* (2020), al estudiar aislados e hidrolizados de proteína de salvado de arroz, respectivamente, con valores de 2.10 a 37.24 mg EAG/g. Con la misma fuente natural, Zaky *et al.* (2019) obtuvo resultados de CRT de 2.32 a 11.15 mg EAG/g.

Xu *et al.* (2019), reportaron que hidrolizados de kafirina de sorgo obtenidos por fraccionamiento presentan valores de CRT de 30.76 a 40.59 mg EAG/g. Se considera que el proceso de hidrólisis liberó los péptidos con residuos de aminoácidos fenólicos, así como otros posibles compuestos fenólicos.

Es importante señalar que la CRT puede estar sobreestimada debido a la interferencia de otros productos que podrían reaccionar con el reactivo de F-C como los ácidos nucleicos (Anuniação *et al.*, 2017).

Cuadro 4. Capacidad reductora total de extracto de lipopéptidos y otras fuentes de péptidos.

Autores	Fuentes	Resultados
	Extracto de lipopéptidos	75.80 ± 5.06 mg EAG/g
Piotrowicz <i>et al.</i> (2020)	Hidrolizados y aislados de proteína de salvado de arroz	4.78 a 37.24 mg EAG/g.
Cho (2020)	Aislado de proteína de salvado de arroz	2.10 mg EAG/g.
Zaky <i>et al.</i> (2019)	Hidrolizados de proteína de salvado de arroz	2.32 a 11.15 mg EAG/g
Xu <i>et al.</i> (2019)	Hidrolizados de kafirina de sorgo	30.76 a 40.59 mg EAG /g

Los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g). Datos mostrados como medias ± desviación estándar de tres réplicas.

10.1.2. Capacidad Antioxidante por ORAC

La capacidad antioxidante del extracto de lipopéptidos se evaluó a través del ensayo químico ORAC. El ensayo de capacidad antioxidante se basa en la transferencia de protones, es decir, miden la capacidad donante del átomo de hidrógeno de los antioxidantes (Xiao *et al.*, 2020). En este estudio, la capacidad antioxidante del extracto de lipopéptidos fue de $207.98 \pm 8.74 \mu\text{mol ET/g}$. Por su parte, Zhang *et al.* (2010) reportan datos inferiores de 23 a $83.8 \mu\text{mol TE/g}$ en hidrolizados de proteína de soya. Sin embargo, Zhang *et al.* (2019) muestran valores superiores a $458.32 \mu\text{mol TE/g}$ en hidrolizados de proteína de germen de maíz. De igual manera, Ji *et al.* (2019) reportaron $1180 \mu\text{mol TE/g}$ en péptidos de moha (*Setaria italica*). Las diferencias de estos dos últimos resultados respecto a nuestros datos, podría ser debido a que los investigadores mencionados emplearon péptidos aislados y purificados, lo cual debido a limitantes metodológicas no se pudo replicar en nuestro estudio.

Así mismo, Liu *et al.* (2016) indican que los péptidos menores a 1.5 kDa poseen excelente actividad antioxidante, probablemente porque los péptidos de bajo peso molecular tienen mayor solubilidad, menor viscosidad y pueden absorberse de manera más eficiente. Los lipopéptidos son moléculas de ~ 1.0-1.5 kDa (Yang *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2017). No obstante, el extracto empleado podría contener algunas impurezas provenientes del caldo de fermentación por ejemplo, macromoléculas (micelas de surfactina, polisacáridos, péptidos y proteínas) y moléculas pequeñas (medio mineral, alcoholes, ácido ftálico y aminoácidos) (Mulligan *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2007b).

10.1.3. Inhibición del Radical ABTS

Por otro lado, en la capacidad antioxidante por ABTS (**Figura 8**) se pueden apreciar diferencias significativas acorde a las concentraciones empleadas del extracto de lipopéptidos (500, 750, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g/mL}$). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvo un IC_{50} de 652 $\mu\text{g/mL}$. Zhang *et al.* (2016), realizaron una investigación con péptidos de colágeno de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y reportaron un IC_{50} 1480 $\mu\text{g/mL}$. De igual manera, Wang *et al.* (2014) reportaron valores de IC_{50} 1754.1 y 1305.5 $\mu\text{g/mL}$ en péptidos de músculo de tiburón (*Mustelus griseus*). Es importante mencionar que valores IC_{50} menores, indican que se requirió una menor concentración del extracto para inhibir el radical en un 50%.

Najafian *et al.* (2015), han descrito que la capacidad antioxidante de péptidos se ha atribuido a la presencia de aminoácidos de naturaleza aromática (fenilalanina y tirosina) e hidrofóbica (leucina, valina y fenilalanina), así como aminoácidos hidrófilos (histidina, prolina y lisina). La hidrofobicidad y la naturaleza anfifílica de los péptidos también parece mejorar las actividades de eliminación de radicales al aumentar la solubilidad de los péptidos al tiempo que facilita la interacción y los intercambios de protones con las especies de radicales. Otro factor que podría ser responsable de la actividad inhibitoria del radical ABTS son los bajos pesos moleculares de los péptidos (Chi *et al.*, 2015; Thamnarathip *et al.*, 2016).

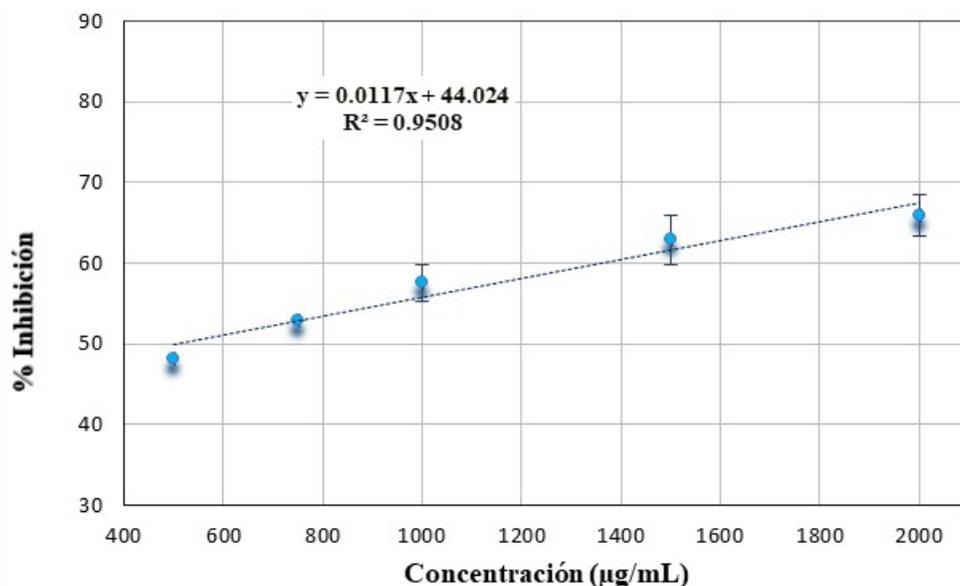


Figura 8. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición del radical ABTS.

Los lipopéptidos surfactina, fengicina e iturina son moléculas de ~ 1.0-1.5 kDa (Yang *et al.*, 2015). Además, están constituidos por grupos funcionales en su estructura, que les proporciona el poder donante de electrones y de tal manera que pueden reaccionar con los radicales libres ABTS^{•+} para convertirlos en un producto más estable.

Lo anterior coincide con Tabbene *et al.* (2012) y Ayed *et al.* (2017), donde se estipula que la capacidad antioxidante de los lipopéptidos es debido a los aminoácidos (hidrófobos y aromáticos) presentes en la región peptídica, así como a la cadena alifática de sus β-hidroxi o β-amino ácidos grasos (Yang *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2017b).

10.2. Potencial Hipoglicemiante

La evaluación del potencial hipoglicemiante *in vitro* mediante la inhibición enzimática se sustenta en que los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante podrían combatir la condición hiperglucémica actuando como inhibidores enzimáticos, lo que conlleva a la reducción en la digestión de los carbohidratos y la disminución en los niveles de glucosa (Bidon-Chanal *et al.*,

2013; Volpe *et al.*, 2018; Nasab *et al.*, 2020).

La α -glucosidasa es otra enzima clave unida a la membrana ubicada en el epitelio del intestino delgado involucrada en la digestión del almidón a través de la descomposición de oligosacáridos y disacáridos para producir glucosa, que luego es absorbida por el cuerpo. Por lo tanto, la inhibición de esta enzima es otra estrategia eficaz para reducir el nivel de glucosa en suero y, en última instancia, controlar los síntomas de la enfermedad asociados con la diabetes (Shobana *et al.*, 2009; Gropper *et al.*, 2012).

En la **Figura 9** se muestra el efecto del extracto de lipopéptidos ultrafiltrados sobre la enzima α -glucosidasa, además se aprecian diferencias significativas a las concentraciones empleadas (5, 20, 30, 40, 50 mg/mL). Con la concentración de 20 mg/mL se alcanzó el 36.44% de inhibición, lo cual difiere con Awosika *et al.* (2019), quienes a la misma concentración inhibieron en un 53.35% utilizando una fracción peptídica (<1 kDa) obtenida tras la hidrólisis de proteína de chícharo (*Pisum sativum*).

Aunque trabajos anteriores también han informado que los péptidos de bajo peso molecular son fuertes inhibidores de la actividad de la α -glucosidasa. Por ejemplo, la fracción peptídica <1 kDa derivada del frijol pinto Durango exhibió una actividad inhibidora de 76.4% contra la α -glucosidasa (Oseguera-Toledo *et al.*, 2015). Las altas concentraciones empleadas para inhibir α -glucosidasa se han atribuido a la presencia de péptidos con efectos antagonistas, los cuales podrían reducirse mediante el fraccionamiento, de tal manera se podría incrementar la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa (Awosika *et al.*, 2019).

Por otro lado, a partir de los datos obtenidos (**Figura 9**) se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvo una concentración media inhibitoria (IC₅₀) de 33.87 mg/mL. Dicho valor es mayor a lo reportado por Zielinska *et al.* (2020), se utilizaron péptidos de langosta del desierto (*Schistocerca gregaria*) para la inhibición enzimática de α -glucosidasa y se reportó un IC₅₀ 0.01594 mg/mL. Cabe destacar que un IC₅₀ menor indica que se requirió una menor concentración del extracto para inhibir en un 50% la enzima glucosidasa.

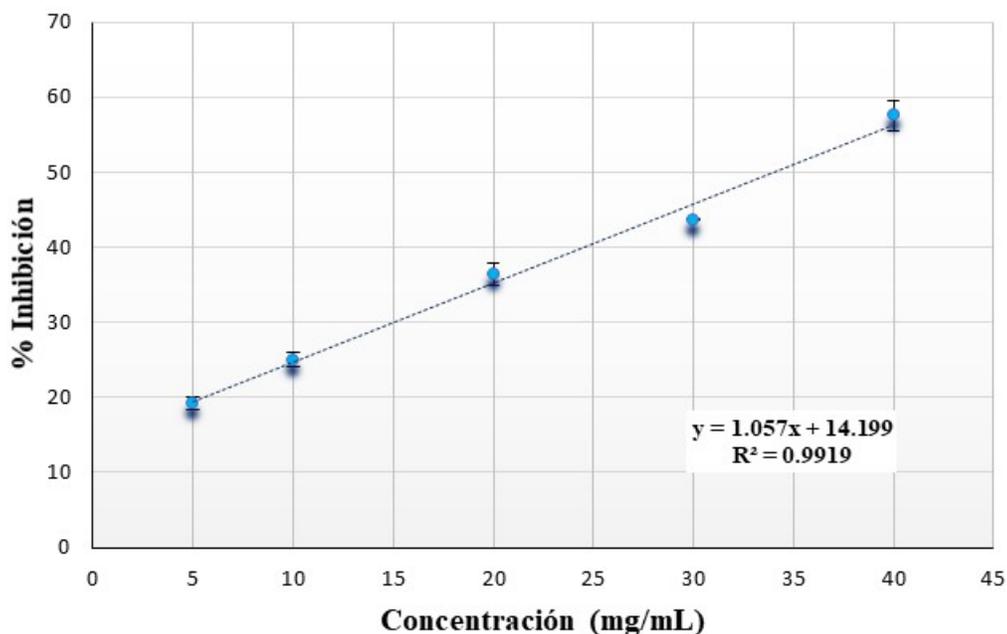


Figura 9. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición de la enzima α -glucosidasa.

Las diferencias podrían ser debido a lo reportado por Ibrahim *et al.* (2018), los cuales señalan que los péptidos inhibidores de la α -glucosidasa más potentes tienen muy pocos aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas voluminosas (leucina, isoleucina y valina). Con base en estas aseveraciones, se puede deducir que las interacciones hidrofóbicas podrían no estar involucradas en el mecanismo de inhibición de los péptidos inhibidores de la α -glucosidasa.

Surfactina, es uno de los lipopéptidos presentes en la muestra está constituida por un heptapéptido con aminoácidos apolares alifáticos (leucina y valina) y un ácido graso β -hidroxi. Por consiguiente, se infiere que surfactina no está involucrada en inhibición de la enzima y podría estar obstruyendo la interacción del resto de los lipopéptidos en la muestra con el sitio activo de α -glucosidasa. Contrario a lo anterior, se ha planteado que la secuencia de péptidos con residuos de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo (serina, treonina o tirosina) o un aminoácido básico (lisina o arginina) en el extremo N-terminal del péptido podrían influir en gran medida en la inhibición de la α -glucosidasa (Mojica *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2018).

Los lipopéptidos fengicina, así como iturina y bacilomicina miembro de esta última familia consta de los aminoácidos serina, tirosina y treonina y además están constituidos de pocos o ningún

aminoácido hidrofóbico (leucina, isoleucina y valina). Por lo anterior, existe la probabilidad de que las fracciones del extracto de lipopéptidos tengan más afinidad con la enzima α -glucosidasa.

La enzima α -amilasa es una de las principales enzimas involucradas en la digestión del almidón de la dieta, liberando oligosacáridos que pueden descomponerse en glucosa, que el cuerpo absorbe rápidamente. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la α -amilasa se considera una estrategia eficaz para controlar la diabetes (Gropper *et al.*, 2012). Sin embargo, durante la acción de inhibidores enzimáticos como alternativa terapéutica, suele ser de interés farmacéutico investigar los efectos correspondientes a inhibidores de la α -amilasa porque la mayoría de los efectos secundarios se asocian con una inhibición excesiva de esta enzima (Ibrahim *et al.*, 2018).

El nulo potencial del extracto de lipopéptidos contra la enzima α -amilasa probablemente se deba a la escasa presencia de aminoácidos aromáticos. Se ha documentado que los aminoácidos de naturaleza aromática (fenilalanina, triptófano y tirosina) de péptidos se unen a los residuos enzimáticos pertenecientes al sitio activo de α -amilasa mediante interacciones aromático-aromáticas que surgen de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de Van der Waals, las cuales parecen estar críticamente implicadas en la acción inhibidora de los péptidos hacia la enzima (Siow *et al.*, 2017).

De igual manera, otros estudios indican que los hidrolizados no fraccionados contienen un rango de péptidos más grande y de mayor tamaño, en consecuencia, los péptidos tendrán una capacidad de unión a enzimas más débil (Malomo *et al.*, 2016). Otra posible explicación podría deberse al hecho de que los hidrolizados no fraccionados contienen péptidos que pueden producir efectos antagonistas para reducir el efecto inhibidor de los péptidos activos (Girgih *et al.*, 2015).

Algunos estudios han reportado que es recomendable la inhibición leve de la α -amilasa para prevenir la fermentación bacteriana anormal que resulta de la presencia de carbohidratos no digeridos en el colon, lo cual promueve flatulencia y diarrea (Etxeberria *et al.*, 2012; Nagmoti *et al.*, 2013; Unuofin *et al.*, 2018). Según Chen *et al.* (2008b), la inhibición de la α -glucosidasa favorece el vaciamiento gástrico, lo que provoca saciedad y pérdida de peso, útiles en el tratamiento de la obesidad. Por tanto, una fuerte inhibición de la actividad α -glucosidasa de los extractos podría

ayudar a producir saciedad y pérdida de peso en sujetos obesos (McDougall *et al.*, 2005).

Por lo anterior, se ha sugerido una mayor selectividad por parte de los compuestos bioactivos para inhibir α -glucosidasa, la cual es considerada una ventaja para su posible aplicación como agentes terapéuticos o como ingredientes alimentarios funcionales con propiedades antidiabéticas (Cardullo *et al.*, 2020).

10.3. Inhibición de la Actividad de Lipasa Pancreática por Efecto de Lipopéptidos

La evaluación del potencial hipolipemiante *in vitro* mediante la inhibición enzimática de lipasa pancreática es considerada una estrategia potencial para contrarrestar la obesidad. La lipasa digestiva hidroliza los triglicéridos dietéticos no absorbibles en moléculas absorbibles más pequeñas de monoglicéridos y ácidos grasos libres, que son absorbidos por el intestino (Mohamed *et al.*, 2014; Buchholz *et al.*, 2015; Glisan *et al.*, 2017).

Mientras que la inhibición de la lipasa puede reducir la absorción de grasas intestinales, retarda la deposición de grasa en el tejido adiposo y suprime el aumento de peso, lo cual tiene efectos beneficiosos para el sobrepeso y la obesidad (Podsdek *et al.*, 2014; Dechakhamphu *et al.*, 2015).

En la **Figura 10** se muestra el efecto del extracto de lipopéptidos ultrafiltrados sobre la enzima lipasa pancreática, además se aprecian diferencias significativas a las concentraciones empleadas (0.8, 2, 5, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$). A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión logarítmica y se obtuvo una concentración media inhibitoria (IC_{50}) de 4.69 $\mu\text{g/mL}$.

Dicho valor es similar a lo reportado por Chen *et al.* (2020), quienes documentaron que el extracto crudo de lipopéptidos, fengicina purificada, así como los estándares de iturina y surfactina exhibieron fuertes actividades de inhibición contra la lipasa de manera dependiente de la dosis; el IC_{50} fue de 11, 5, 56 y 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El lipopéptido crudo estaba compuesto principalmente por fengicina (73.9%), por lo que se consideró que este lipopéptido contribuía

significativamente a las actividades inhibidas contra la lipasa.

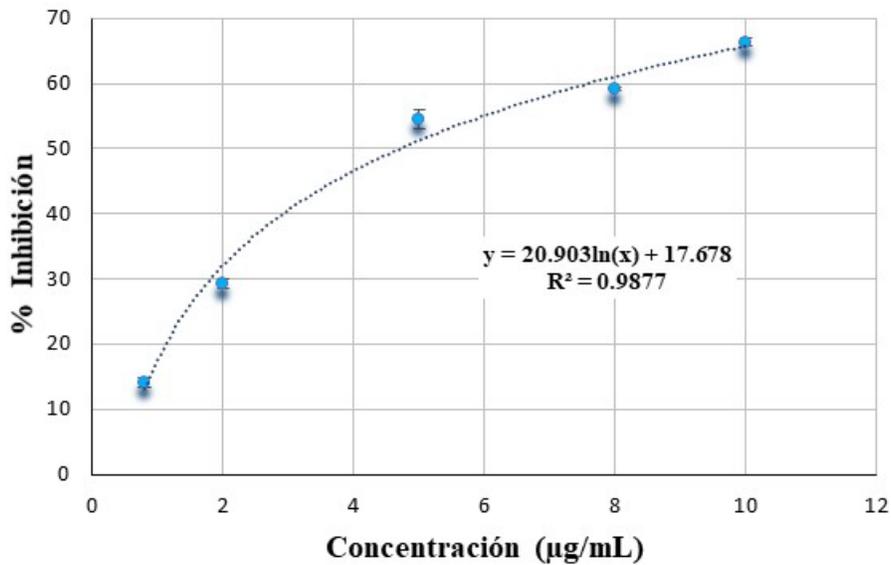


Figura 10. Efecto del extracto de lipopéptidos en la inhibición de la enzima lipasa pancreática.

Además, Chen *et al.* (2020), reportaron que los efectos de los lipopéptidos inhibidores sobre lipasa son debido a que los átomos de oxígeno del grupo hidroxilo en los residuos Thr y Glu en fengicina podrían actuar directamente sobre Ser y Asn de lipasa. Mientras que los grupos carbonilo del residuo Leu en la surfactina podría actuar directamente sobre Asp y Ser de la lipasa. Siendo los aminoácidos Ser, His y Asp los aminoácidos presentes en el sitio activo de la enzima.

Por otra parte, de acuerdo a Glisan *et al.* (2017), se puede observar que los efectos inhibidores del extracto ultrafiltrado de lipopéptidos se encuentran dentro del orden de magnitud de orlistat (IC_{50} 4 µg/mL), medicamento que actúa como un inhibidor de la lipasa pancreática inhibiendo la absorción de lípidos en la dieta y usado para tratar la obesidad (GBD, 2017; Saunders *et al.*, 2018).

11. CONCLUSIONES

El extracto de lipopéptidos registró una concentración de capacidad reductora total de 75.80 ± 5.06 mg EAG/g, la cual es considerable en comparación con otros metabolitos secundarios (fitoquímicos).

La capacidad antioxidante que se obtuvo por ORAC fue de 207.98 ± 8.74 μ mol ET/g. En tanto que con ABTS se registró un IC_{50} 652 μ g/mL. Dichos resultados se atribuyen a la estructura del biosurfactante y sus grupos funcionales.

El extracto de lipopéptidos inhibe α -glucosidasa a un IC_{50} de 28.25 mg/mL, pero presentó nula inhibición de α -amilasa. Lo anterior, podría deberse a la secuencia de aminoácidos en la región peptídica o bien a que la presencia de péptidos tendría efectos antagonistas, lo que se traduciría en una menor eficiencia para inhibir las enzimas.

El extracto de lipopéptidos inhibe lipasa a un IC_{50} de 4.69 μ g/mL, lo que indica que el extracto de lipopéptidos es eficaz como agente hipolipemiente. Esto podría deberse al perfil de lipopéptidos presentes en la muestra y la posible interacción de estos con el centro activo de la enzima.

12. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de bioaccesibilidad mediante la evaluación de la capacidad antioxidante con la mezcla de lipopéptidos y las fracciones individuales de lipopéptidos surfactina, fengicina y bacilomicina, con la finalidad de conocer los posibles efectos antagonistas y/o sinérgicos del extracto.

Llevar a cabo estudios de simulación gastrointestinal *in vitro* y evaluar el potencial hipoglicemiante e hipolipemiante con la mezcla de lipopéptidos y las fracciones individuales de lipopéptidos surfactina, fengicina y bacilomicina. Mediante estos estudios se podrá conocer sobre el grado de biodisponibilidad de estos metabolitos para ejercer su efecto sobre el síndrome metabólico.

Elucidar el modo de acción mediante cinéticas enzimáticas y aplicar modelos de acoplamiento molecular para deducir las interacciones presentes entre los lipopéptidos y las enzimas implicadas en el metabolismo de glucosa y lípidos.

13. REFERENCIAS

- ADA. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 33(1): 62-69.
- Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2013). Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. *Experimental Toxicologic Pathology*. 65(3): 305-309.
- Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B., & Wong, R. J. (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. *The Journal of the American Medical Association*. 313(19): 1973-1974.
- Aguilera-Angel, E. Y., Espinal-Ruiz, M., & Narváez-Cuenca, C. E. (2018). Pectic polysaccharides with different structural characteristics as inhibitors of pancreatic lipase. *Food Hydrocolloids*. 83: 229-238.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Thonart, P. (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 91(1): 551-561.
- Alberti, K., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J.-C., James, W. P. T., Loria, C. M., & Smith Jr, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*. 120(16): 1640-1645.
- Aloulou, A., & Carriere, F. (2008). Gastric lipase: an extremophilic interfacial enzyme with medical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(6): 851.
- Anigboro, A. A., Avwioroko, O. J., Akeghware, O., & Tonukari, N. J. (2021). Anti-obesity, antioxidant and in silico evaluation of *Justicia carnea* bioactive compounds as potential inhibitors of an enzyme linked with obesity: Insights from kinetics, semi-empirical quantum mechanics and molecular docking analysis. *Biophysical Chemistry*. 274: 106607.
- Anunciação, P. C., de Moraes Cardoso, L., Gomes, J. V. P., Della Lucia, C. M., Carvalho, C. W. P., Galdeano, M. C., Queiroz, V. A. V., Alfenas, R. d. C. G., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. *Food chemistry*. 221: 984-989.
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1713(1): 51-56.
- Arima, K. (1968). Surfactin, acrylline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical*. 31(3): 488-494.
- ASP. (2016). About the ASP. USA: The american society of pharmacognosy. Retrieved from <http://www.pharmacognosy.us/what-is-pharmacognosy/>
- Awosika, T. O., & Aluko, R. E. (2019). Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. *Food Science and Technology*. 54(6): 2021-2034.
- Ayed, B. H., Hmidet, N., Béchet, M., Jacques, P., & Nasri, M. (2017). Identification and natural functions of cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *Engineering in Life Sciences*. 17(5): 536-544.

- Ayed, H. B., Bardaa, S., Moalla, D., Jridi, M., Maalej, H., Sahnoun, Z., Rebai, T., Jacques, P., Nasri, M., & Hmidet, N. (2015). Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavenensis* A21. *Process Biochemistry*. 50(6): 1023-1030.
- Baron, A. D. (1998). Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 40: 51-55.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. *Science Against Microbial Pathogens*. 2(1): 1102-1111.
- Basque, J. R., & Ménard, D. (2000). Establishment of culture systems of human gastric epithelium for the study of pepsinogen and gastric lipase synthesis and secretion. *Microscopy research and technique*. 48(5): 293-302.
- Baynes, H. W. (2015). Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes and metabolism*. 6(5): 1-9.
- Bechet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclere, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., & Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied microbiology and biotechnology*. 95(3): 593-600.
- Beck-Nielsen, H. (2013). *The Metabolic Syndrome*. Springer.(Ed.). pp. 1-3.
- Bidon-Chanal, A., Fuertes, A., Alonso, D., Pérez, D. I., Martínez, A., Luque, F. J., & Medina, M. (2013). Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 60: 479-489.
- Biesinger, S., Michaels, H., Quadros, A., Qian, Y., Rabovsky, A., Badger, R., & Jalili, T. (2016). A combination of isolated phytochemicals and botanical extracts lowers diastolic blood pressure in a randomized controlled trial of hypertensive subjects. *European journal of clinical nutrition*. 70(1): 10-16.
- Birari, R. B., & Bhutani, K. K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*. 12(19-20): 879-889.
- Block, A., Schipf, S., Van der Auwera, S., Hannemann, A., Nauck, M., John, U., Völzke, H., Freyberger, H. J., Dörr, M., & Felix, S. (2016). Sex-and age-specific associations between major depressive disorder and metabolic syndrome in two general population samples in Germany. *Nordic journal of psychiatry*. 70(8): 611-620.
- Bonaventura, M. V. M. D., Martinelli, I., Moruzzi, M., Bonaventura, E. M. D., Giusepponi, M. E., Polidori, C., Lupidi, G., Tayebati, S. K., Amenta, F., & Cifani, C. (2020). Brain alterations in high fat diet induced obesity: Effects of tart cherry seeds and juice. *Nutrients*. 12(3): 623.
- Bonmatin, J.-M., Labbé, H., Grangemard, I., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Ptak, M., & Michel, G. (1995). Production, isolation and characterization of [Leu 4]-and [Ile 4] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Letters in Peptide Science*. 2(1): 41-47.
- Brown, A., Anderson, D., Racicot, K., Pilkenton, S. J., & Apostolidis, E. (2017). Evaluation of Phenolic Phytochemical enriched commercial Plant extracts on the In Vitro inhibition of α -glucosidase. *Frontiers in nutrition*. 4: 56.
- Brown, J. E., & Rice-Evans, C. A. (1998). Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free radical research*. 29(3): 247-255.
- Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta medica*. 81(10): 771-783.
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. (2003). β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(1): 102-110.

- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current opinion in microbiology*. 7(3): 262-266.
- Cardullo, N., Muccilli, V., Pulvirenti, L., Cornu, A., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S., & Tringali, C. (2020). C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: A study of α -glucosidase and α -amylase inhibition. *Food chemistry*. 313: 126099.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in food science technology*. 71: 107-120.
- Carvajal-Carvajal, C. (2017). Síndrome metabólico: definiciones, epidemiología, etiología, componentes y tratamiento. *Medicina Legal de Costa Rica*. 34(1): 175-193.
- Chaput, J.-P., St-Pierre, S., & Tremblay, A. (2007). Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 7(1): 3-10.
- Chen, Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W., & Reva, O. (2007a). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature biotechnology*. 25(9): 1007-1014.
- Chen, H.-L., Chen, Y.-S., & Juang, R.-S. (2007b). Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *Journal of Membrane Science*. 299(1-2): 114-121.
- Chen, H., Wang, L., Su, C., Gong, G., Wang, P., & Yu, Z. (2008a). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 47(3): 180-186.
- Chen, M.-c., Liu, T.-t., Wang, J.-p., Chen, Y.-p., Chen, Q.-x., Zhu, Y.-j., & Liu, B. (2020). Strong inhibitory activities and action modes of lipopeptides on lipase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 35(1): 897-905.
- Chen, X., Xu, G., Li, X., Li, Z., & Ying, H. (2008b). Purification of an α -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1, 6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*. 43(7): 765-768.
- Chen, Y. Q., Min, C., Sang, M., Han, Y. Y., Ma, X., Xue, X. Q., & Zhang, S. Q. (2010). A cationic amphiphilic peptide ABP-CM4 exhibits selective cytotoxicity against leukemia cells. *Peptides*. 31(8): 1504-1510.
- Cheng, C., Lu, Y., Chuang, K., Hung, W., Shiea, J., Su, Y., Kao, C., Chen, B., Roffler, S., & Cheng, T. (2008). Tumor-targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy. *Cancer gene therapy*. 15(6): 393-401.
- Cheung, B. M. Y., Cheung, T. T., & Samaranyake, N. R. (2013). Safety of antiobesity drugs. *Therapeutic advances in drug safety*. 4(4): 171-181.
- Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Ren, X.-J., Deng, S.-G., & Wu, C.-W. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. *Food chemistry*. 168: 662-667.
- Chiasson, J.-L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., & Group, S.-N. T. R. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*. 359(9323): 2072-2077.
- Cho, N., Shaw, J., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J., Ohlrogge, A., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research Clinical Practice*. 138: 271-281.

- Cho, S.-J. (2020). Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*: 109206.
- Cooper, D., Macdonald, C., Duff, S., & Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*. 42(3): 408-412.
- Costamagna, M. S., Zampini, I. C., Alberto, M. R., Cuello, S., Torres, S., Pérez, J., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G., & Isla, M. I. (2016). Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry*. 190: 392-402.
- Cuevas-Juárez, E., Yuriar-Arredondo, K. Y., Pío-León, J. F., Montes-Avila, J., López-Angulo, G., Díaz-Camacho, S. P., & Delgado-Vargas, F. (2014). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods*. 9: 78-88.
- D'Souza, R., Pandeya, D. R., Rahman, M., Lee, H. S., Jung, J.-K., & Hong, S.-T. (2012). Genetic engineering of *Lactococcus lactis* to produce an amylase inhibitor for development of an anti-diabetes biodrug. *New Microbiologica*. 35(1): 35-42.
- de la Garza, A. L., Milagro, F. I., Boque, N., Campión, J., & Martínez, J. A. J. P. m. (2011). Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. *Planta medica*. 77(08): 773-785.
- Dechakhamphu, A., & Wongchum, N. (2015). Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 5(12): 1042-1045.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., & Shulman, G. I. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 1(1): 1-22.
- Del Hierro, J. N., Casado-Hidalgo, G., Reglero, G., & Martin, D. (2021). The hydrolysis of saponin-rich extracts from fenugreek and quinoa improves their pancreatic lipase inhibitory activity and hypocholesterolemic effect. *Food chemistry*. 338: 128113.
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*. 94(7): 2667-2679.
- Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., & Jacques, P. (2014). Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Applied microbiology and biotechnology*. 98(14): 6255-6264.
- Derosa, G., & Maffioli, P. (2012). α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*. 8(5): 899.
- Di Rosa, M., Distefano, G., Gagliano, C., Rusciano, D., & Malaguarnera, L. (2016). Autophagy in diabetic retinopathy. *Current Neuropharmacology*. 14(8): 810-825.
- Dimkic, I., Stankovic, S., Nisavic, M., Petkovic, M., Ristivojevic, P., Fira, D., & Beric, T. (2017). The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-12.
- Eisvand, F., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2020). The effects of *Ginkgo biloba* on metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*.
- ENSANUT. (2018). Presentación de resultados. Retrieved from https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

- Etxeberria, U., de la Garza, A. L., Campión, J., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2012). Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert opinion on therapeutic targets*. 16(3): 269-297.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(14): 8139-8144.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39(7): 869-878.
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 16(12): 1543-1560.
- Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., & Folli, F. (2013). Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 19(32): 5695-5703.
- FMD. (2015). La disfunción del páncreas en la diabetes tipo 1 y 2. México Retrieved from <http://fmdiabetes.org/disfuncion-pancreas-diabetes-tipo-1-y-2/>
- FMD. (2018). Principales causas de mortalidad en México. México. Retrieved from <http://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2017/01/favicon-fmd-01.png>
- Frölich, L., & Riederer, P. (1995). Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Arzneimittel-Forschung*. 45(3A): 443-446.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 114(12): 1752-1761.
- Gamboa-Gómez, C. I., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., Vázquez-Cabral, B. D., & González-Laredo, R. F. (2015). Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI journal*. 14: 809.
- Gan, P., Jin, D., Zhao, X., Gao, Z., Wang, S., Du, P., & Qi, G. (2016). *Bacillus*-produced surfactin attenuates chronic inflammation in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice. *International Immunopharmacology*. 35: 226-234.
- García-García, E., Llata-Romero, M., Kaufer-Horwitz, M., Tusié-Luna, T., Calzada, R., Velázquez, V., Barquera, S., Romo, A. D. J., Orozco, L., Velázquez, D., Rosas-Peralta, M., Meléndez, J., Zacarías-Castillo, R., & Sotelo, J. (2009). Obesity and metabolic syndrome as public health problem. A reflection. Second part. *Archivos de cardiología de México*. 78: 318-337.
- GBD. (2017). Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *New England Journal of Medicine*. 377(1): 13-27.
- Germoush, M. O., Elgebaly, H. A., Hassan, S., Kamel, E. M., Bin-Jumah, M., & Mahmoud, A. M. (2020). Consumption of Terpenoids-Rich *Padina pavonia* Extract Attenuates Hyperglycemia, Insulin Resistance and Oxidative Stress, and Upregulates PPAR γ in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *Antioxidants*. 9(1): 22.
- Ghazala, I., Bouassida, M., Krichen, F., Manuel Benito, J., Ellouz-Chaabouni, S., & Haddar, A. (2017). Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification. *Engineering in Life Sciences*. 17(12): 1244-1253.

- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food chemistry*. 173: 652-659.
- Glisan, S. L., Grove, K. A., Yennawar, N. H., & Lambert, J. D. (2017). Inhibition of pancreatic lipase by black tea theaflavins: Comparative enzymology and in silico modeling studies. *Food chemistry*. 216: 296-300.
- Godbout, A., & Chiasson, J.-L. (2007). Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Current diabetes reports*. 7(5): 333-339.
- Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2012). *Advanced nutrition and human metabolism*. Cengage Learning.(Ed.). Australia. pp. 586.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*: 1-65.
- Guo, X., Tresserra-Rimbau, A., Estruch, R., Martínez-González, M. A., Medina-Remón, A., Fitó, M., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Portillo, M. P., & Moreno, J. J. (2017). Polyphenol Levels Are Inversely Correlated with Body Weight and Obesity in an Elderly Population after 5 Years of Follow Up (The Randomised PREDIMED Study). *Nutrients*. 9: 452.
- Gupta, P., Bala, M., Gupta, S., Dua, A., Dabur, R., Injeti, E., & Mittal, A. (2016). Efficacy and risk profile of anti-diabetic therapies: Conventional vs traditional drugs—A mechanistic revisit to understand their mode of action. *Pharmacological research*. 113: 636-674.
- Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., & Méndez-González, R. M. (2018). Prevalence of metabolic syndrome in Mexico: a systematic review and meta-analysis. *Metabolic syndrome and related disorders*. 16(8): 395-405.
- Hajare, S. N., Subramanian, M., Gautam, S., & Sharma, A. (2013). Induction of apoptosis in human cancer cells by a *Bacillus* lipopeptide bacillomycin D. *Biochimie*. 95(9): 1722-1731.
- Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., & Oku, T. (2009). Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 9(1): 3-12.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*. 9(1): 1-32.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J., & Collado, I. G. (2011). Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*. 74(4): 893-899.
- Han, L., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y., & Okuda, H. (2001). Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *International journal of obesity*. 25(10): 1459-1464.
- Harmon, J., Stein, R., & Robertson, R. (2005). Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *Journal of biological chemistry*. 280(12): 11107-11113.
- Hathout, Y., Ho, Y.-P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000). Kurstakins: a new class of Lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of natural products*. 63(11): 1492-1496.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444(7121): 860-867.
- Houstis, N., Rosen, E. D., & Lander, E. S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 440(7086): 944-948.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(16): 4437-4444.

- Huang, J., Wang, Y., Xie, Z., Zhou, Y., Y, Z., & X, W. (2014). The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *European journal of clinical nutrition*. 68: 1075–1087.
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models Mechanisms*. 2(5-6): 231-237.
- Hui, W. S., Liu, Z., & Ho, S. C. (2010). Metabolic syndrome and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Epidemiology*. 6(25): 375-384.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W., & Gaspar, A. R. (2018). Structural properties of bioactive peptides with α -glucosidase inhibitory activity. *Chemical biology and drug design*. 91(2): 370-379.
- IDF. (2017). *Diabetes Atlas*. In (8th ed.). Belgium.
- Imessaoudene, A., Merzouk, H., Berroukeche, F., Mokhtari, N., Bensenane, B., Cherrak, S., Merzouk, S. A., & Elhabiri, M. (2016). Beneficial effects of quercetin–iron complexes on serum and tissue lipids and redox status in obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 29: 107-115.
- INEGI. (2020). Características de las defunciones registradas en México durante 2019. México. Retrieved from <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2020/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Inthongkaew, P., Chatsumpun, N., Supasuteekul, C., Kitisripanya, T., Putalun, W., Likhitwitayawuid, K., & Sritularak, B. (2017). α -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and glucose uptake stimulatory effect of phenolic compounds from *Dendrobium formosum*. *Revista brasileira de farmacognosia*. 27(4): 480-487.
- Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Karaś, M., Złotek, U., & Kowalczyk, D. (2019). Potential anti-inflammatory and lipase inhibitory peptides generated by in vitro gastrointestinal hydrolysis of heat treated millet grains. *CYTA - Journal of Food*. 17(1): 324-333.
- Jamshidi-Aidji, M., Dimkić, I., Ristivojević, P., Stanković, S., & Morlock, G. E. (2019). Effect-directed screening of *Bacillus* lipopeptide extracts via hyphenated high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1605: 460366.
- Jang, J. H., Kim, E. A., Park, H. J., Sung, E. G., Song, I. H., Kim, J. Y., Woo, C. H., Doh, K. O., Kim, K. H., & Lee, T. J. (2017). Methylglyoxal-induced apoptosis is dependent on the suppression of c-FLIPL expression via down-regulation of p65 in endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 21(11): 2720-2731.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., & Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42(9): 1266-1272.
- Jemil, N., Ayed, H. B., Manresa, A., Nasri, M., & Hmidet, N. (2017a). Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC microbiology*. 17(1): 1-11.
- Jemil, N., Manresa, A., Rabanal, F., Ayed, H. B., Hmidet, N., & Nasri, M. (2017b). Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B*. 1060: 374-386.
- Jeong, S.-Y., Zhang, T., Wu, X., Qiu, J. Y., & Park, S. (2020). *Chungkookjang*, a soy food, fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* protects gerbils against ischemic stroke injury, and post-stroke hyperglycemia. *Food Research International*. 128: 108769.
- Ji, Z., Feng, R., & Mao, J. (2019). Separation and identification of antioxidant peptides from foxtail millet (*Setaria italica*) prolamins enzymatic hydrolysate. *Cereal Chemistry*. 96(6): 981-993.

- Kalpana, K., Srinivasan, M., & Menon, V. P. (2008). Antioxidant potential of aminothiazole derivative and its protective effect on H₂O₂-induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 314(1): 95.
- Kasote, D. M., Hegde, M. V., & Katyare, S. S. (2013). Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause (s), consequence (s), and implications of antioxidant therapy. *Biofactors*. 39(4): 392-406.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*. 11(8): 982.
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research Practice*. 2014.
- Kim, G. N., Shin, M. R., Shin, S. H., Lee, A. R., Lee, J. Y., Seo, B. I., & Roh, S. S. (2016). Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of Diospyros kaki Fruit and Citrus unshiu Peel. *BioMed Research International*: 1–7.
- Kim, J.-G., Jo, S.-H., Ha, K.-S., Kim, S.-C., Kim, Y.-C., Apostolidis, E., & Kwon, Y.-I. (2014). Effect of long-term supplementation of low molecular weight chitosan oligosaccharide (GO2KA1) on fasting blood glucose and HbA1c in db/db mice model and elucidation of mechanism of action. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14(1): 1-7.
- Kitabchi, A. E., Umpierrez, G., Miles, J., & Fisher, J. (2009). Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes: Response to Yasuda et al. *Diabetes Care*. 32(12): 158-158.
- Korenblum, E., de Araujo, L. V., Guimarães, C. R., De Souza, L. M., Sasaki, G., Abreu, F., Nitschke, M., Lins, U., Freire, D. M. G., & Barreto-Bergter, E. (2012). Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. *BMC Microbiology*. 12(1): 252.
- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents. *Drugs*. 65(3): 385-411.
- Latino-Martel, P., Cottet, V., Druesne-Pecollo, N., Pierre, F. H., Touillaud, M., Touvier, M., Vasson, M.-P., Deschasaux, M., Le Merdy, J., & Barrandon, E. (2016). Alcoholic beverages, obesity, physical activity and other nutritional factors, and cancer risk: a review of the evidence. *Critical reviews in oncology/hematology*. 99: 308-323.
- Leclere, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.-S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., & Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4577-4584.
- Lee, H. J., Kwon, O., & Kim, J. Y. (2018). Supplementation of a polyphenol extract from *Ecklonia cava* reduces body fat, oxidative and inflammatory stress in overweight healthy subjects with abdominal obesity: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Journal of Functional Foods*. 46: 356-364.
- Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., & Choi, Y. L. (2007). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*. 188(4): 307-312.
- Ley-López, N., Márquez-Zequera, I., Armando Carrillo-Fasio, J., León-Félix, J., Cruz-Lachica, I., Saúl García-Estrada, R., & Allende-Molar, R. (2018). Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(2).
- Li, Y., Bai, B., Ye, J., Liu, H., Liu, Y., & Zhang, W. (2008). Reviews on preparation and determination of α -glucosidase inhibitor. *Food Science*. 29: 617-619.

- Li, Y., Yang, S., & Mu, B. (2010). The surfactin and lichenysin isoforms produced by *Bacillus licheniformis* HSN 221. *Analytical Letters*. 43(6): 929-940.
- Liang, X., Nong, X.-H., Huang, Z.-H., & Qi, S.-H. (2017). Antifungal and antiviral cyclic peptides from the deep-sea-derived fungus *Simplicillium obclavatum* EIODSF 020. *Journal of agricultural food chemistry*. 65(25): 5114-5121.
- Liu, M. C., Yang, S. J., Hong, D., Yang, J. P., Liu, M., Lin, Y., Huang, C. H., & Wang, C. J. (2016). A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Chemistry Central Journal*. 10(1): 1-11.
- Liu, T. T., Liu, X. T., Chen, Q. X., & Shi, Y. (2020). Lipase inhibitors for obesity: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 128: 110314.
- Liu, X. Y., Yang, S. Z., & Mu, B. Z. (2009). Production and characterization of a C-15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochemistry*. 44(10): 1144-1151.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in physiology*. 9: 477.
- Lowe, M. E. (1997). Molecular mechanisms of rat and human pancreatic triglyceride lipases. *The Journal of Nutrition*. 127(4): 549-557.
- Lowe, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of lipid research*. 43(12): 2007-2016.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, H., Wang, X., & Chen, Z. (2015). Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(1): 422-431.
- Ma, Y., Kong, Q., Qin, C., Chen, Y., Chen, Y., Lv, R., & Zhou, G. (2016). Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS. *Amb Express*. 6(1): 1-15.
- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2016). In vitro acetylcholinesterase-inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 93(3): 411-420.
- Maqsood, M., Ahmed, D., Atique, I., & Malik, W. (2017). Lipase inhibitory activity of *Lagenaria siceraria* fruit as a strategy to treat obesity. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 10(3): 305-310.
- Márquez-Sandoval, F., Macedo-Ojeda, G., Viramontes-Hörner, D., Ballart, J. F., Salvadó, J. S., & Vizmanos, B. (2011). The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public health nutrition*. 14(10): 1702-1713.
- Massó, F. J. T. (2014). *La Diabetes en la Práctica Clínica* Ed. Médica Panamericana.(Ed.). pp. 61.
- Massó, F. T., & Jiménez, F. E. (2009). *La Diabetes Mellitus en la práctica clínica*. Médica Panamericana SA.(Ed.). España.
- Matsushita, S., Iwami, N., & Nitta, Y. (1966). Colorimetric estimation of amino acids and peptides with the Folin phenol reagent. *Analytical biochemistry*. 16(2): 365-371.
- McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(7): 2760-2766.
- Meena, K., Sharma, A., & Kanwar, S. (2017). Lipopeptides: A distinct class of antibiotics with diverse applications. *Advances in Biotechnology and Microbiology*. 7(2): 555706.
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*. 2015: 473050-473050.

- Mhatre, S. V., Bhagit, A. A., & Yadav, R. P. (2016). Pancreatic lipase inhibitor from food plant: Potential molecule for development of safe anti-obesity drug. *MGM Journal of Medical Sciences*. 3(1): 34-41.
- Mitrofanov, I., Seliatitskaia, V., IuA, N., & IuV, L. (2012). The prevalence of metabolic syndrome in an organized population. *Klinicheskaia meditsina*. 90(11): 47-50.
- Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R., Elkhayat, E. S., & El Dine, R. S. (2014). Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 52(2): 269-284.
- Mohammad, M., Al-masri, I. M., Issa, A., Khdair, A., & Bustanji, Y. (2013). Inhibition of pancreatic lipase by berberine and dihydroberberine: an investigation by docking simulation and experimental validation. *Medicinal Chemistry Research*. 22(5): 2273-2278.
- Mojica, L., & De Mejía, E. G. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food and Function*. 7(2): 713-727.
- Moreno-Córdova, E. N., Arvizu-Flores, A. A., Valenzuela-Soto, E. M., García-Orozco, K. D., Wall-Medrano, A., Alvarez-Parrilla, E., Ayala-Zavala, J. F., Domínguez-Avila, J. A., & González-Aguilar, G. A. (2020). Gallotannins are uncompetitive inhibitors of pancreatic lipase activity. *Biophysical Chemistry*. 264: 106409.
- Mukherjee, M. (2003). Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22(5-6): 369-376.
- Mulligan, C. N., & Gibbs, B. F. (1990). Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 47(1): 23-29.
- Murai, Y., Mori, S., Konno, H., Hikichi, Y., & Kai, K. (2017). Ralstonins A and B, lipopeptides with chlamydospore-inducing and phytotoxic activities from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Organic Letters*. 19(16): 4175-4178.
- Nagmoti, D. M., & Juvekar, A. R. (2013). In vitro inhibitory effects of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. seeds on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Journal of Biochemical Technology*. 4(3): 616-621.
- Najafian, L., & Babji, A. S. (2015). Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) myofibrillar protein hydrolysates. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 60(1): 452-461.
- Nasab, S. B., Homaei, A., Pletschke, B., Salinas-Salazar, C., Casillo-Zacarías, C., & Parra-Saldívar, R. (2020). Marine resources effective in controlling and treating diabetes and its associated complications. *Process Biochemistry*. 92: 313-342.
- Neha, K., Haider, M., Pathak, A., & Yar, M. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 178: 687-704.
- Nijhawan, P., Arora, S., & Behl, T. (2019). Intricate role of oxidative stress in the progression of obesity. *Obesity Medicine*. 15: 100125.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H. A., & McDougall, G. J. (2011). Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*. 126(3): 1006-1012.
- Obih, P. O., Nguyen, A., & Obih, J.-C. A. (2016). Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Mormodica charantia*. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 30: 607-607.
- Okon, I. S., & Zou, M. H. (2015). Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacological research*. 100: 170-174.
- Ongena, & Jacques. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16: 115-125.

- Oseguera-Toledo, M. E., de Mejia, E. G., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*. 76: 839-851.
- Oteiza, P. I., Erlejtman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface. *Journal of Immunology Research*. 12(1): 19-25.
- Pacheco-Leal, D. (2004). *Bioquímica médica*. LIMUSA.(Ed.). México. pp. 626.
- Park, H., Bae, S. H., Park, Y., Choi, H. S., & Suh, H. J. (2015). Lipase-mediated lipid removal from propolis extract and its antiradical and antimicrobial activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95(8): 1697-1705.
- Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., & Balaram, P. (2012). Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 23(10): 1716-1728.
- Pereira, M. N., Justino, A. B., Martins, M. M., Peixoto, L. G., Vilela, D. D., Santos, P. S., Teixeira, T. L., da Silva, C. V., Goulart, L. R., & Pivatto, M. (2017). Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and Products*. 97: 324-329.
- Peypoux, F., Pommier, M., Marion, D., Ptak, M., Das, B., & Michel, G. (1986). Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics*. 39(5): 636-641.
- Piotrowicz, I. B. B., Garcés-Rimón, M., Moreno-Fernández, S., Aleixandre, A., Salas-Mellado, M., & Miguel-Castro, M. (2020). Antioxidant, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Properties and Blood-Pressure-Lowering Effect of Rice Bran Protein Hydrolysates. *Foods*. 9(6): 812.
- Podsedek, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., & Koziółkiewicz, M. (2014). In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(20): 4610-4617.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Tomé, S. M., Oliveira, E. F., Viegas, M. F., Araújo, A. N., Ramos, M. J., Silva, A. M., & Fernandes, P. A. (2019). Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α -amylase towards a structure–activity relationship. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 34(1): 577-588.
- Qasim, A., Turcotte, M., De Souza, R., Samaan, M., Champredon, D., Dushoff, J., Speakman, J., & Meyre, D. (2018). On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obesity reviews*. 19(2): 121-149.
- Quan, N. (2019). Contribution of momilactones A and B to diabetes inhibitory potential of rice bran: Evidence from in vitro assays. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(5): 643-649.
- Quianzon, C. C., & Cheikh, I. E. (2012). History of current non-insulin medications for diabetes mellitus. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*. 2(3): 19081.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(6): 1037-1062.
- Ramalingam, V., Varunkumar, K., Ravikumar, V., & Rajaram, R. (2019). Production and structure elucidation of anticancer potential surfactin from marine actinomycete *Micromonospora marina*. *Process Biochemistry*. 78: 169-177.

- Ramos, E., Castañeda, B., & Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista de la Academia Peruana de Salud*. 15(1): 42-46.
- Rampelotto, P. H. (2010). Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*. 2(6): 1602-1623.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(4): 609-618.
- Rosak, C., & Mertes, G. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 5: 357.
- Rosas-Guzmán, J., González-Chávez, A., Aschner, P., Bastarrachea, R., & Laviada, H. (2010). Epidemiología, Diagnóstico, Control, Prevención y Tratamiento del Síndrome Metabólico en Adultos. *Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes*. 18(1): 25-44.
- Sahaf, B., Heydari, K., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. J. A. o. b. (2005). The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Archives of biochemistry and biophysics*. 434(1): 26-32.
- Saisho, Y. (2015). β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World journal of diabetes*. 6(1): 109.
- Saklayen, M. G. (2018). The global epidemic of the metabolic syndrome. *Current hypertension reports*. 20(2): 1-8.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 15(1): 141-183.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 5(21): 5990-5999.
- Sánchez, J., Priego, T., Palou, M., Tobaruela, A., Palou, A., & Pico, C. (2008). Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life. *Endocrinology*. 149(2): 733-740.
- Saunders, K. H., Umashanker, D., Igel, L. I., Kumar, R. B., & Aronne, L. J. (2018). Obesity pharmacotherapy. *Medical Clinics*. 102(1): 135-148.
- Sekhon, K. K., Khanna, S., & Cameotra, S. S. (2012). Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. *Pet. Environ. Biotechnol*. 3(133): 10.4172.
- Seo, M. H., Lee, W. Y., Kim, S. S., Kang, J. H., Kang, J. H., Kim, K. K., Kim, B. Y., Kim, Y. H., Kim, W. J., & Kim, E. M. (2019). 2018 Korean society for the study of obesity guideline for the management of obesity in Korea. *Journal of obesity and metabolic syndrome*. 28(1): 40.
- Seravalle, G., & Grassi, G. (2017). Obesity and hypertension. In (Vol. 122, pp. 1-7): *Pharmacological Research*
- Seydlová, G., Čabala, R., & Svobodová, J. (2011). Surfactin-novel solutions for global issues. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*. 13: 305-330.
- Shahzad, R., Latif Khan, A., Ali, L., Bilal, S., Imran, M., Choi, K.-S., Al-Harrasi, A., & Lee, I.-J. (2018). Characterization of new bioactive enzyme inhibitors from endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1. *Molecules*. 23(1): 114.
- Shobana, S., Sreerama, Y., & Malleshi, N. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*. 115(4): 1268-1273.

- Shoelson, S. E., Herrero, L., & Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 132(6): 2169-2180.
- Si, F. L., Duan, S. I., Wang, X., & Wang, L. L. (2020). Phenolic Antioxidants of *Auricularia* Species and Their Inhibitory Effects on $[\alpha]$ -Amylase, $[\alpha]$ -Glucosidase and Acetylcholine Esterase Activities. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 18(2): 132-141.
- Sigalapalli, D. K., Yele, V., Jupudi, S., Shaikh, A. S., Kadagathur, M., Tangellamudi, N. D., & Babu, B. N. (2020). Insights into the pharmacophore-based 3D-QSAR modeling, molecular dynamics simulation studies of certain dihydroxy pyrrolidine/piperidine and aza-flavanone derivatives as α -glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*. 1223: 129243.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 299: 152-178.
- Siow, H. L., Lim, T. S., & Gan, C. Y. (2017). Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated Bioinformatics-phage display approach: Case study—Cumin seed. *Food chemistry*. 214: 67-76.
- Smyth, T., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. Springer(Ed.). Place Published|. pp. Pages|.
- Su, K., Mao, X., Ai, L., Zhang, X. J. J. O. A. B., & QUALITY, F. (2019). In vitro assessment of anti-diabetic potential of four kinds of dark tea (*Camellia sinensis* L.) protein hydrolysates. 92: 57-63.
- Sugihara, H., Nagao, M., Harada, T., Nakajima, Y., Tanimura-Inagaki, K., Okajima, F., Tamura, H., Inazawa, T., Otonari, T., & Kawakami, M. (2014). Comparison of three α -glucosidase inhibitors for glycemic control and bodyweight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*. 5(2): 206-212.
- Sun, C., Liu, Y., Zhan, L., Rayat, G. R., Xiao, J., Jiang, H., Li, X., & Chen, K. (2020). Anti-diabetic effects of natural antioxidants from fruits. *Trends in Food Science & Technology*.
- Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., & Yang, S. (2006). Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 22(12): 1259-1266.
- Sun, Z., & Chen, F. (2012). Evaluation of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* for management of diabetes. *Journal of Food and Drug Analysis*. 20: 246-249.
- Swain, T., & Hillis, W. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 10(1): 63-68.
- Tabbene, O., Gharbi, D., Slimene, I. B., Elkahoui, S., Alfeddy, M. N., Cosette, P., Mangoni, M. L., Jouenne, T., & Limam, F. (2012). Antioxidative and DNA protective effects of bacillomycin D-like lipopeptides produced by B38 strain. *Applied biochemistry and biotechnology*. 168(8): 2245-2256.
- Tak, Y. J., & Lee, S. Y. (2021). Long-term efficacy and safety of anti-obesity treatment: where do we stand? *Current Obesity Reports*. 10: 14-30.
- Tan, L. H., Zhang, D., Wang, G., Yu, B., Zhao, S. P., Wang, J. W., Yao, L., & Cao, W. (2016). Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical origins. *Industrial Crops and Products*. 80: 123–130.

- Tang, J. S., Gao, H., Hong, K., Yu, Y., Jiang, M. M., Lin, H. P., Ye, W. C., & Yao, X. S. (2007). Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data of nine surfactin isomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 45(9): 792-796.
- Tarling, C. A., Woods, K., Zhang, R., Brastianos, H. C., Brayer, G. D., Andersen, R. J., & Withers, S. G. (2008). The search for novel human pancreatic α -amylase inhibitors: high-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts. *ChemBioChem*. 9(3): 433-438.
- Taylor, A., Vincent, H., & Bourguignon, C. (2006). Inflammation and oxidative stress are associated with a novel dietary “Phytochemical Index” in obese young adults. *North American Research Conference on Complementary and Alternative Medicine*: 24–27.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition Analysis*. 19(6-7): 669-675.
- Thammarathip, P., Jangchud, K., Nitisingprasert, S., & Vardhanabhuti, B. (2016). Identification of peptide molecular weight from rice bran protein hydrolysate with high antioxidant activity. *Journal of Cereal Science*. 69: 329-335.
- Toghueo, R. M. K., & Boyom, F. F. (2019). Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants-A systematic review. *Biocatalysis Agricultural Biotechnology*. 22: 101430-101480.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*. 36(5): 659-670.
- Tsuge, K., Akiyama, T., & Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*. 183(21): 6265-6273.
- Twyman, R. M. (2009). *Hormonal Signaling to the Brain for the Control of Feeding/Energy Balance*. Academic Press(Ed.)|. Place Published|. pp. Pages|.
- Uma, R., Sivasubramanian, V., & Devaraj, S. N. (2011). Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2(3): 82-93.
- Unuofin, J. O., Otunola, G. A., & Afolayan, A. J. (2018). In vitro α -amylase, α -glucosidase, lipase inhibitory and cytotoxic activities of tuber extracts of *Kedrostis africana* (L.) Cogn. *Heliyon*. 4(9): e00810.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12): 6210-6219.
- Vecchié, A., Dallegri, F., Carbone, F., Bonaventura, A., Liberale, L., Portincasa, P., Frühbeck, G., & Montecucco, F. (2018). Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *European journal of internal medicine*. 48: 6-17.
- Vendemiale, G., Guerrieri, F., Grattagliano, I., Didonna, D., Muolo, L., & Altomare, E. (1995). Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration. *Hepatology*. 21(5): 1450-1454.
- Vincent, H. K., Innes, K. E., Vincent, K. R., & metabolism. (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obesity and Metabolism*. 9(6): 813-839.
- Volpe, C., Villar-Delfino, P., dos Anjos, P., & Nogueira-Machado, J. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death and Disease*. 9(2): 1-9.

- Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. (1999). NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *European Journal of Biochemistry*. 264(1): 200-210.
- Wakayama, S., Ishikawa, F., & Oishi, K. (1984). Mycocerein, a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 26(6): 939-940.
- Wang, B., Gong, Y. D., Li, Z. R., Yu, D., Chi, C. F., & Ma, J. Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*. 6: 176-185.
- Wang, X., Hu, W., Zhu, L., & Yang, Q. (2017). *Bacillus subtilis* and surfactin inhibit the transmissible gastroenteritis virus from entering the intestinal epithelial cells. *Bioscience Reports*. 37(2).
- Warolin, J., Coenen, K. R., Kantor, J. L., Whitaker, L. E., Wang, L., Acra, S. A., Roberts, L. J., & Buchowski, M. S. (2014). The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. *Pediatric obesity*. 9(1): 43-52.
- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53(suppl 3): S16-S21.
- White, J. R. (2014). A brief history of the development of diabetes medications. *Diabetes Spectrum*. 27(2): 82-86.
- WHO. (2018). Noncommunicable diseases country profiles 2018. World Health Organization.(Ed.). Geneva. pp. 223 p.
- Wolfenden, L., Barnes, C., Jones, J., Finch, M., Wyse, R. J., Kingsland, M., Tzelepis, F., Grady, A., Hodder, R. K., & Booth, D. (2020). Strategies to improve the implementation of healthy eating, physical activity and obesity prevention policies, practices or programmes within childcare services. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(2).
- Worsztynowicz, P., Napierała, M., Białas, W., Grajek, W., & Olkowicz, M. (2014). Pancreatic α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry*. 49(9): 1457-1463.
- Worthington, V. (1993). Alpha amylase. Worthington Biochemical Corporation(Ed.)|. Place Published|. pp. Pages|.
- Wu, X., Feng, Y., Lu, Y., Li, Y., Fan, L., Liu, L., Wu, K., Wang, X., Zhang, B., & He, Z. (2017). Effect of phenolic hydroxyl groups on inhibitory activities of phenylpropanoid glycosides against lipase. *Journal of Functional Foods*. 38: 510-518.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*. 1(1): 60-69.
- Xu, S., Shen, Y., Chen, G., Bean, S., & Li, Y. (2019). Antioxidant characteristics and identification of peptides from sorghum kafirin hydrolysates. *Journal of food science*. 84(8): 2065-2076.
- Yalcin, E., & Cavusoglu, K. (2010). Structural Analysis and Antioxidant Activity of a Biosurfactant Obtained from *Bacillus subtilis* RW-I. *Turkish Journal of Biochemistry*. 35(3): 243-247.
- Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(9): 2529-2542.
- Yao, Z., Li, C., Gu, Y., Zhang, Q., Liu, L., Meng, G., Wu, H., Bao, X., Zhang, S., Sun, S., Wang, X., Zhou, M., Jia, Q., Song, K., Li, Z., Gao, W., Niu, K., & Guo, C. (2019). Dietary myricetin intake is inversely associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Nutrition Research*. 68: 82-91.

- You, Q., Chen, F., Wang, X., Luo, P. G., & Jiang, Y. (2011). Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of agricultural food chemistry*. 59(17): 9506-9511.
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 54(3): 176-186.
- Yuan, Y., Zhang, J., Fan, J., Clark, J., Shen, P., Li, Y., & Zhang, C. (2018). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase. *Food Research International*. 113: 288-297.
- Zaky, A. A., Chen, Z., Liu, Y., Li, S., & Jia, Y. (2019). Preparation and assessment of bioactive extracts having antioxidant activity from rice bran protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement Characterization*. 13(4): 2542-2548.
- Zhang, L., Li, J., & Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource technology*. 101(7): 2084-2089.
- Zhang, R., Chen, J., Jiang, X., Yin, L., & Zhang, X. (2016). Antioxidant and hypoglycaemic effects of tilapia skin collagen peptide in mice. *International Journal of Food Science and Technology*. 51(10): 2157-2163.
- Zhang, S., Zhang, M., Yang, R., Zhang, S., & Lin, S. (2019). Preparation, identification, and activity evaluation of antioxidant peptides from protein hydrolysate of corn germ meal. *Journal of Food Processing and Preservation*. 43(10): e14160.
- Zhang, Y., He, S., Rui, X., & Simpson, B. K. (2021). Interactions of *C. frondosa*-derived inhibitory peptides against angiotensin I-converting enzyme (ACE), α -amylase and lipase. *Food chemistry*. 367: 130695.
- Zhao, H., Li, J., Zhang, Y., Lei, S., Zhao, X., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., & Sun, H. (2018). Potential of iturins as functional agents: safe, probiotic, and cytotoxic to cancer cells. *Food function*. 9(11): 5580-5587.
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 14(2): 88.
- Zhou, H., He, Y., Tian, Y., Cong, B., & Yang, H. (2019). Bacillohydrin A, a new cytotoxic cyclic lipopeptide of surfactins class produced by bacillus sp. sy27f from the indian ocean hydrothermal vent. *Natural product communications*. 14(1): 1934578X1901400137.
- Zielinska, E., Karas, M., Baroniak, B., & Jakubczyk, A. (2020). Evaluation of ACE, α -glucosidase, and lipase inhibitory activities of peptides obtained by in vitro digestion of selected species of edible insects. *EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY*. 246(7): 1361-1369.
- Zouari, R., Ben Abdallah-Kolsi, R., Hamden, K., Feki, A. E., Chaabouni, K., Makni-Ayadi, F., Sallemi, F., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi-Aydi, D. (2015). Assessment of the antidiabetic and antilipidemic properties of bacillus subtilis spb1 biosurfactant in alloxan-induced diabetic rats. *Peptide Science*. 104(6): 764-774.
- Zouari, R., Hamden, K., El Feki, A., Chaabouni, K., Makni-Ayadi, F., Kallel, C., Sallemi, F., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi-Aydi, D. (2016). Protective and curative effects of Bacillus subtilis SPB1 biosurfactant on high-fat-high-fructose diet induced hyperlipidemia, hypertriglyceridemia and deterioration of liver function in rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 84: 323-329.

Zouari, R., Hamden, K., El Feki, A., Chaabouni, K., Makni-Ayadi, F., Sallemi, F., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi-Aydi, D. (2017). Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant effects on hyperglycemia, angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity and kidney function in rats fed on high-fat–high-fructose diet. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 123(2): 112-120.