



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

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE HOJA DE
Moringa oleifera L., EN LA INHIBICIÓN *IN VITRO* DE ENZIMAS
RELACIONADAS CON EL SÍNDROME METABÓLICO**

Por:

Olimpia Soto Valdez

TESIS APROBADA POR LA

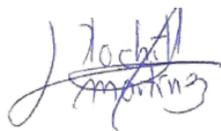
COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA PRODUCTOS AGRICOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Olimpia Soto Valdez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Directora de Tesis

Dr. José Basilio Heredia

Integrante de comité de tesis

Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante

Integrante de comité de tesis

Dra. Josefina León Félix

Integrante de comité de tesis

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Olimpia Soto Valdez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Directora de Tesis

Dr. José Basilio Heredia

Integrante de comité de tesis

Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante

Integrante de comité de tesis

Dra. Josefina León Félix

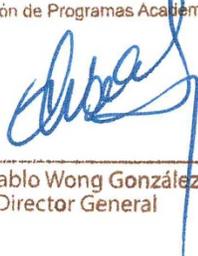
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de Péptidos Bioactivos de Hoja de *Moringa oleifera* L., en la Inhibición *in vitro* de Enzimas Relacionadas con el Síndrome Metabólico” 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 Olimpia Soto Valdez, 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

Gracias a CONACYT por el apoyo económico brindado para realizar este proyecto y llegar a término con el posgrado.

Gracias a CIAD por confiar en mí, además de abrir sus puertas para formar parte de su sociedad estudiantil.

Gracias CIAD Culiacán en especial al laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, por la experiencia de llevar a cabo el proyecto en este laboratorio.

Gracias a mi comité de tesis por todo el apoyo brindado durante estos dos años para llevar a término el proyecto, a la Dra. Josefina León y el Dr Miguel Ángel por sus consejos para mejorar el proyecto.

Gracias a la Dra. Xochitl por su paciencia y comprensión, por toda la ayuda que me brindó durante este tiempo, por ser una gran persona y por confiar en mí para ser parte de su visión y proyecto.

Gracias al Dr. Basilio por ser la primera persona que creyó en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, gracias por la confianza para realizar la maestría con ustedes y por todo el apoyo brindado a mi persona durante este tiempo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por toda la orientación y ayuda que me brindaron.

Gracias a Laura Contreras por ser un gran apoyo para mí en esta travesía, gracias por su paciencia ya que requirió demasiada, pero principalmente gracias por su amistad.

Gracias a Alexis Emus por exigirme más cada día para llevar a cabo cada metodología, para que no fuera solo el soldado perfecto y poder cuestionarme más a mí misma y así aprender en el proceso y sobre todo gracias por tu amistad.

Gracias a los compañeros que no eran de mi laboratorio ni de mi generación pero que se volvieron amigos que me ayudaron a ser ligera la estancia en CIAD y terminar nuestro proyecto gracias a Sara, Monica, Jeni, Nancy, Leslie, Emmanuel y Hector.

Gracias a mis compañeros de generación Arleth, Eduardo, María José, Lucia, Yudith, Judith, Elizabeth, Aramis y Juan Carlos más que compañeros en estos dos años se convirtieron en mis amigos de vida, me ayudaron en cuestiones tanto de la maestría, como en cuestiones personales, me ayudaron a salir adelante cada vez que sentía que me derrumbaba y que quería renunciar, gracias por todo los quiero mucho y serán parte importante de mi vida siempre.

Gracias a mi amiga Daizha, sin querer te convertiste en parte fundamental para poder concluir el posgrado, te convertiste en una gran amiga, además, aprendí a apreciarte y seguirás siendo parte importante de mi vida, gracias por toda tu ayuda y apoyo, te quiero mucho.

Gracias a mi mejor amigo Manuel Bernal en este tiempo de mi estancia en CIAD, has sido un gran apoyo para mí, me ayudaste aprender mucho del laboratorio, fuiste mi maestro en cuestiones de concentraciones, me has apoyado mucho en este tiempo en el que he estado en Culiacán, sé que siempre puedo contar contigo, y sabes que siempre cuentas conmigo, gracias por brindarme la más sincera de las amistades y gracias por todo lo que has hecho por mí te quiero mucho.

Gracias a mi gran amiga Rubi Zamorano, eres la persona que más me alentó para realizar esta meta y siempre estás conmigo cuando te necesito en las buenas, en las malas y en las peores, gracias amiga por dejarme ser parte de tu vida y gracias por ser parte de la mía eres la mejor amiga que pude encontrar en la vida gracias por todo tu apoyo y por alentarme tanto y echarme tantas porras para poder terminar este proyecto te quiero muchísimo y lo sabes gracias por todo amiga.

Gracias a mi familia por todo el apoyo y el aliento que me han brindado por la confianza que tienen en mí los amo.

Gracias a mis hermanas Paola, Abril y Brizeida, por todo su apoyo y por toda la ayuda que me dan las amo con todo mi corazón, aparte de ser mis hermanas son mis amigas y las extraño cuando estamos lejos, gracias por todo lo hacen por mí, siempre seremos raíces del mismo árbol aun cuando tomemos caminos diferentes, nuestros corazones siempre pertenecerán a una misma planta.

Gracias a mis padres Griselda Valdez y José Ignacio Soto, por todo lo que hacen por mí gracias por ser mi más grande ejemplo de superación, gracias por estar siempre para mí, por ser mi gran soporte y mi gran apoyo, gracias por nunca abandonarme aun cuando yo ya lo había hecho, gracias por permitirme tener esta segunda oportunidad y ayudarme a lograrlo, son las personas que dan todo sin pedir nada a cambio los amo, no hay amor más puro y más honesto como el de los padres, gracias por dejarme soñar y ayudarme a no rendirme jamás y que mis sueños se hicieran realidad.

Gracias a mis hijos Alejandra y José Ignacio, por la paciencia que han tenido para que su mamá se aleje de casa y pueda buscar un futuro mejor, los amo y siempre serán lo más importante para mí, espero que siempre superen todos los obstáculos que les ponga la vida por delante y nunca se rindan, que su madre siempre estará ahí para apoyarlos en todo.

Gracias a mi compañero de vida Ernesto López, por todo tu apoyo, tu comprensión y los sacrificios hechos para poder llegar a este momento, gracias por estar siempre conmigo, porque aun cuando

me has visto en mis peores momentos me has levantado limpiado mis lágrimas y me has hecho seguir adelante, eres la única persona que haces que el peor día se convierta en algo mejor, y me has ayudado sin poner condiciones, gracias por todo el amor que me das, te amo igual, gracias por todo.

Gracias a los que se me adelantaron y no lograron estar conmigo en este momento pero que me apoyaron desde el momento en que volví a estudiar y cuando entré en la maestría se sintieron orgullosos de mí los amo y los extraño gracias por la enseñanza que me dejaron y los grandes recuerdos; gracias a mis Tíos Carlos Andrés, Carlos Alcantar, Ernesto Soto, Dusulina Valdez, Guillermo Valdez y mi abuelo Ángel Valdez.

DEDICATORIA

A mi familia:

A mis padres: José Ignacio Soto Moreno y Griselda Valdez Giusti, a mis hermanos gracias por todo su apoyo, a mis hijos; mi reina hermosa; Alejandra Gpe., a mi príncipe; José Ignacio y a mi soporte y fortaleza

Ernesto López Ríos

*Gracias por todo y por acompañarme en esta travesía los
año*

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
APROBACIÓN	3
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	4
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	8
CONTENIDO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE CUADROS	12
LISTA DE ECUACIONES	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Síndrome Metabólico	18
2.2. Enzimas Relacionadas con el Síndrome Metabólico.....	20
2.2.1. α -Glucosidasa	20
2.2.2. Lipasa Pancreática	21
2.2.3. Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	22
2.3. Medicamentos para el Tratamiento del Síndrome Metabólico.....	23
2.3.1. Acarbosa: Inhibidor de α -Glucosidasa.....	23
2.3.2. Orlistat: Inhibidor de Lipasa Pancreática.....	23
2.3.3. Captopril: Inhibidor de ECA.....	24
2.4. Efectos Adversos de Medicamentos Alopáticos	24
2.4.1. Insuficiencia Renal	24
2.4.2. Daño Hepático	25
2.5. Péptidos Bioactivos.	25
2.3. <i>Moringa oleifera L.</i>	29
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Muestras	34
5.2. Concentrado Proteico de la Hoja de <i>Moringa oleifera L.</i>	34
5.3. Hidrólisis Enzimática	34
5.4. Proteína Soluble por el Método de Kjeldahl	35

CONTENIDO (Continuación)

5.5. Grado de Hidrólisis.....	36
5.6. Capacidad Antioxidante por el Método de DPPH.....	37
5.7. Capacidad Antioxidante en Equivalente de Trolox (TEAC) ABTS.....	37
5.8. Inhibición de α -Glucosidasa.....	38
5.9. Inhibición de Lipasa Pancreática.....	39
5.10. Inhibición de ECA.....	39
5.11. Electroforesis de una Dimensión en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	40
5.12. Análisis Estadístico	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1. Proteína por el Método de Kjeldahl y Grado de Hidrólisis	42
6.2. Capacidad Antioxidante por los Métodos de DPPH y ABTS	43
6.3. Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa.....	45
6.4. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática.....	48
6.5. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	51
6.6. Electroforesis 1D SDS-PAGE.....	54
7. CONCLUSIONES.....	57
8. RECOMENDACIONES.....	58
9. REFERENCIAS	59
10. ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Función de α -glucosidasa intestinal	20
2. Digestión y absorción de lípidos.....	21
3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona en la regulación de la presión arterial	22
4. IC ₅₀ del concentrado proteico para inhibición de α -glucosidasa	46
5. IC ₅₀ de Hd 2h para inhibición de α -glucosidasa	47
6. IC ₅₀ de Hd 3h para inhibición de α -glucosidasa	47
7. IC ₅₀ de concentrado proteico para inhibición de lipasa pancreática	49
8. IC ₅₀ de Hd 2h para inhibición de lipasa pancreática.....	50
9. IC ₅₀ de Hd 3h para inhibición de lipasa pancreática.....	50
10. IC ₅₀ para concentrado proteico para Inhibición de ECA	52
11. IC ₅₀ de Hd 2h para inhibición de ECA	53
12. IC ₅₀ de Hd 3h para inhibición de ECA	53
13. Gel de electroforesis.....	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Parámetros establecidos por la OMS para determinación del SM.....	18
2. Países con el mayor número de personas con DM.....	19
3. Proteína en hoja, concentrado proteico e hidrolizados proteicos y grado de hidrólisis en los hidrolizados proteicos.....	42
4. Capacidad antioxidante de las muestras por los métodos de DPPH y ABTS.....	44
5. Inhibición de la enzima α -glucosidasa y el IC ₅₀	46
6. Inhibición de la enzima Lipasa pancreática y el IC ₅₀	49
7. Inhibición de ECA y el IC ₅₀	52

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1. Porcentaje de Nitrógeno = $H \cdot N \cdot \text{meq/g muestra} \cdot 100$	35
2. Porcentaje de Proteína = Porcentaje α de nitrogeno * factor de conversión	36
3. Porcentaje de Grado de Hidrólisis = $[(B \cdot N_b \cdot 1.5) / (M \cdot (S\% / 100) / \text{pH})] \cdot 100$	36
4. Porcentaje de inhibición α -glucosidasa = $\text{Ablanco} - \text{Amuestra} / \text{Ablanco} \cdot 100$	38
5. Porcentaje de inhibición lipasa = $\text{ABlanco} - \text{AMuestra} / \text{ABlanco} \cdot 100$	39
6. Porcentaje de inhibición ECA = $B - A / B - C \cdot 100$	40

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un problema de salud pública, el cual se atiende con diferentes medicamentos que inhiben la actividad de enzimas que tienen funciones relacionadas con las enfermedades de este padecimiento. En esta investigación se obtuvieron péptidos de harina de hoja de moringa para la inhibición de las enzimas relacionadas con el SM, los cuales se produjeron por hidrólisis enzimática, utilizando las enzimas pepsina y pancreatina por 2 y 3 h cada una de las enzimas. El grado de hidrólisis (GH) fue de 53.98% para los hidrolizados por 2 h (Hd 2h). Mientras que se obtuvo un valor de 92.89% para los hidrolizados por 3 h (Hd 3h). El resultado de capacidad antioxidante por método DPPH fue de 62.74 μM ET/g para los Hd 2h y de 92.73 μM ET/g para los Hd 3h, mientras que por el método de ABTS fue de 63.1 μM ET/g para los Hd 2h y de 99.62 μM ET/g para los Hd 3h. Con respecto a los resultados de la inhibición de enzimas: para α -glucosidasa se observó un 75.12% con los Hd 2h (IC_{50} 0.127 mg/mL) y un 75.08% con los Hd 3h (IC_{50} 0.075 mg/mL); para la inhibición de lipasa se mostraron resultados de 69.98% con los Hd 2h (IC_{50} 0.210 mg/mL) y de 74.94% con los Hd 3h (IC_{50} 0.111 mg/mL); y para la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) se mostró una inhibición de 76.72% on los Hd 2h (IC_{50} 0.033 mg/mL) y de 76% con los Hs 3h (IC_{50} 0.013 mg/mL). Por medio de electroforesis se pudo detectar que la mayoría de los péptidos de las hojas de *Moringa oleifera*, utilizando los dos procesos de hidrólisis, estuvieron en un rango de 5 y 2 kDa de peso molecular. Los péptidos obtenidos de la hoja de moringa mostraron una capacidad antioxidante relevante y un peso molecular < 5 kDa. Los cuales tuvieron una capacidad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasa, lipasa y ECA.

Palabras clave: Síndrome Metabólico, α -Glucosidasa, Lipasa Pancreática, Enzima Convertidora de Angiotensina, Péptidos e Hidrolizados.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a public health problem, which is treated with different drugs with inhibitory capacity on enzymes that have functions related to the diseases of this condition. Moringa leaf flour peptides were obtained in order to test its antioxidant capacity and inhibitory activity on the enzymes related to the MS, which were produced by enzymatic hydrolysis, using the enzymes pepsin and pancreatin for 2 and 3 h. The hydrolysis degree (HD) in the hydrolysates for 2 h (Hd 2h) was 53.98%, for each enzyme, while the hydrolysates for 3 h (Hd 3h) showed 92.89% for each enzyme. The result of antioxidant capacity by the DPPH method of 62.74 μ MET/g in the Hd 2h, and 92.73 μ MET/g in the Hd 3h; while in the ABTS method it was seed at 63.1 μ MET/g in the Hd 2h and 99.62 μ M ET/g in the Hd 3h. Regarding the result of the inhibition of enzymes, the Hd 2h inhibited the α -glucosidase activity 75.12% (IC_{50} 0.127 mg / mL) while the Hd 3h 75.08% (IC_{50} 0.075 mg/ mL). Lipase activity was inhibited by the Hd 2h in 69.98% (IC_{50} 0.210 mg /mL) and the Hd 3h inhibited 74.94% (IC_{50} 0.111 mg / mL). The Angiotensin Converting Enzyme (ACE) showed an inhibition of 76.72% (IC_{50} 0.033 mg /mL) in the Hd 2h; and of 76% (IC_{50} 0.013 mg/mL) with the Hd 3h. Trough electrophoresis it was possible to detect the most of the peptides obtained from the leaves of *Moringa oleifera*, using the two hydrolysis processes, they were in a range of 2 and 5 kDa of molecular weight. It can be concluded that the peptides obtained from the moringa leaf that have a relevant antioxidant capacity and a molecular weight <5 kDa were the ones that showed the greatest inhibitory capacity on the enzymes α -glucosidase, lipase and ECA

Keywords: Metabolic Syndrome, α -glucosidase, pancreatic lipase, Angiotensin Converting Enzyme, Peptides and Hydrolysates.

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores interrelacionados entre enfermedad cardiovascular (ECV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad. El interés hacia este padecimiento se ha centrado en que el posible factor de enlace entre todos los factores es la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que el síndrome es común y que tiene una creciente prevalencia en todo el mundo, que se relaciona principalmente con el aumento de la obesidad y el estilo de vida sedentario (Alberti et al., 2009).

El enfoque para controlar el SM y sus posibles complicaciones de hiperglucemia puede ser utilizar diferentes estrategias, como la inhibición de la enzima α -glucosidasa para la DM2; para el control de la hipertensión arterial se utilizan inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y para el control de la obesidad se busca que esta sea por medio de una alimentación más saludable, pero se han utilizado inhibidores de la enzima lipasa pancreática (Nakano et al., 2006).

Estudios epidemiológicos muestran una relación entre el uso de medicamentos inhibidores de estas enzimas y la disminución de síntomas. No obstante, el uso prolongado de estos medicamentos inhibidores puede generar la aparición de efectos secundarios dañinos a la salud (Bataller y Balaguer, 2004). Aunque, también se intenta prevenir este tipo de padecimiento con alternativas naturales, como alimentos con propiedades bioactivas, que inhiben enzimas que están relacionadas con el SM (Mojica et al., 2015). Una de estas alternativas han sido los péptidos bioactivos provenientes de diferentes fuentes alimenticias.

Los péptidos bioactivos se consideran fragmentos de proteínas (de 2 a 20 aminoácidos) específicos que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína original. Después de que se liberan por hidrólisis enzimática, pueden ejercer diversas funciones fisiológicas (Meisel y FitzGerald, 2003). Se ha demostrado que los péptidos bioactivos poseen función antioxidante que les brinda una función compleja para la inhibición de enzimas como α -glucosidasa, lipasa pancreática y ECA (Power et al., 2012). También se ha demostrado que, los hidrolizados de proteínas y péptidos de origen vegetal son capaces de inhibir estas enzimas *in vitro* (Konrad, 2014).

En los últimos años, la industrialización global y el aumento de la demanda de productos para consumo humano han aumentado considerablemente, por lo cual la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas que no compiten con los que ahora están disponibles es de mayor importancia.

El estudio de fuentes no convencionales de proteína de origen vegetal y que han sido poco explotadas pueden representar un gran potencial como fuente de proteína y péptidos bioactivos benéficos a la salud del ser humano, además de generar información que contribuya a la promoción de consumo y revaloración. *Moringa oleifera* es una fuente vegetal de alto contenido en proteína, vitaminas, β -caroteno y compuestos fenólicos (Foidl et al., 1995; Smaranayaka y Li-Chan, 2011). Por ello la presente investigación plantea la utilización de hojas de *Moringa oleifera* para la obtención de péptidos con actividad biológica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Síndrome Metabólico

En la actualidad la alimentación con un alto consumo en grasas saturadas y azúcares refinados, además del estilo de vida sedentario, provoca un estrés oxidativo en el ser humano. El estrés oxidativo es el proceso de deterioro celular provocado por los radicales libres; y cuando existe un desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes para combatirlos, se produce este estrés. Más aún es uno de los factores para padecer diversas enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad, entre otras, cuando una persona padece diversas enfermedades al mismo tiempo se puede decir que presenta síndrome metabólico (Álvarez-Dongo et al., 2012).

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores interrelacionados de enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y obesidad (Alberti et al., 2009).

En el Cuadro 1 se muestran los factores que se consideran para determinar si una persona tiene SM:

Cuadro 1 Parámetros establecidos por la OMS para determinación del SM

<i>Componentes</i>	<i>Medida</i>	<i>Punto de corte</i>
Obesidad	<i>Circunferencia de cintura</i>	≥ 90 cm en hombres ≥ 80 cm en mujeres
Triglicéridos altos	Triglicéridos	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL bajo	CHDL	≤ 40 mg/dL en hombres ≤ 50 mg/dL en mujeres
Presión arterial alta	PA sistólica PA diastólica	≥ 130 mmHg ≥ 85 mmHg
Alteraciones en la regulación de la glucemia	Glucemia	≥ 100 mg/dL ayunas ≥ 140 mg/dL en PTOG

Guías de Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) de la OMS (2008)

Se estima que alrededor del 20 al 25% de la población mundial presenta SM, el cual triplica el riesgo de un evento cardio-cerebrovascular y cinco veces más riesgo de desarrollar DM2, convirtiéndose así, en un problema de salud pública (García y Alemán, 2014).

En México el SM también representa un problema en aumento, el doctor Flores Sáenz expuso que el infarto al miocardio, los ictus y la enfermedad cardiovascular no isquémica son las causas de fallecimiento hasta del 80% de las personas con DM2, además de tener una acción sinérgica con otros factores de riesgo, como el tabaco, la hipertensión arterial y la dislipidemia. Esto es cuando el paciente presenta todos estos factores ya es considerado como paciente con SM. Cuatro de cada diez mexicanos presentan SM; México ocupa el séptimo lugar mundial con 10.3 millones de personas que padecen DM2 entre la población mayor de 20 años, es por ello que se considera que el SM va seguir aumentando año con año ya que se cree que este es el principal factor para presentar SM (UAM, 2015).

Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2017), la prevalencia de DM en Norte América y el Caribe en adultos de 18-99 años, es de 5-9%. Los 5 países de Norte América y el caribe con mayor población con DM son los que se muestran en el Cuadro 2:

Cuadro 2 Países con el mayor número de personas con DM

<i>País</i>	<i>Personas con DM (18-99 años)</i>
Estados Unidos de América	33,517,033
México	12,477,291
Canadá	2,950,176
Haití	372,541
Jamaica	224,939

8th Edición IDF (2017)

La DM2 se ha considerado un factor determinante para presentar SM, y por las altas cifras de personas con este padecimiento en nuestro país se considera que va seguir en aumento, se cree que

en 10 años la población con SM será el doble de lo que se presenta actualmente (Alberti et al., 2009).

Para el control del SM se utilizan varios medicamentos, cada uno de ellos dirigido a las diferentes enfermedades que el paciente presenta, la mayoría de estos medicamentos son inhibidores de enzimas, estos inhiben a las enzimas relacionadas con la enfermedad por la función que estas presentan en el organismo.

2.2. Enzimas Relacionadas con el Síndrome Metabólico

2.2.1. α -Glucosidasa

La α -glucosidasa es una enzima que se encuentra presente en la mucosa epitelial del intestino delgado y tiene la función de degradar polisacáridos en monosacáridos absorbibles, como se muestra en la Figura 1. Los inhibidores de la α -glucosidasa pueden retardar la absorción de carbohidratos de la dieta y suprimir la hiperglucemia postprandial y son útiles para el tratamiento de la DM2; ya que al inhibir a la enzima no se degradan los polisacáridos en monosacáridos, por lo tanto, no son absorbibles para el organismo, generando así la reducción de glucosa disponible en sangre (Luna y Flengos, 2001).

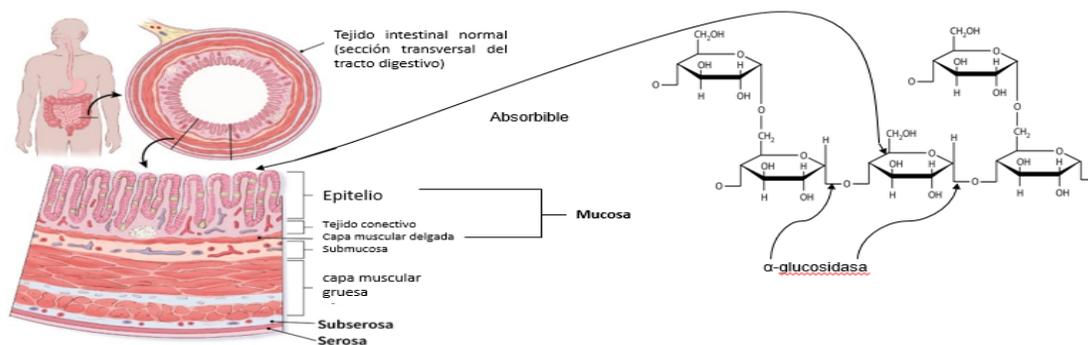


Figura 1 Función de α -glucosidasa intestinal (AJCC, 2018; Cuéllar y Sigüenza, 2019)

2.2.2. Lipasa Pancreática

Las lipasas son esencialmente importantes para que se lleve a cabo el proceso digestión, absorción y metabolismo de lípidos dietarios de manera eficiente, como se muestra en la Figura 2. Para ello, diversas lipasas participan en este complejo proceso, siendo de gran importancia aquellas que están involucradas en las etapas de digestión de lípidos a lo largo del tracto gastrointestinal (Whitcomb y Lowe, 2007). La mayor parte de la hidrólisis de lípidos se lleva a cabo en el duodeno, por lo que las lipasas que actúan a este nivel son de especial interés, ya que estas son las que provocan que el organismo absorba las grasas y estas puedan ser utilizadas en diversas funciones del organismo, como la producción de energía; pero al no ser utilizadas las grasas que se consumen en gran cantidad en la dieta diaria, estas suelen almacenarse en el organismo provocando así el aumento de masa grasa en el cuerpo produciendo la obesidad. Con los medicamentos se busca inhibir esta enzima para el tratamiento de la obesidad, ya que se llega a prolongar la absorción de grasas y suelen ser excretadas al no ser absorbidas (Keller y Layer, 2005; Lowe, 2002).

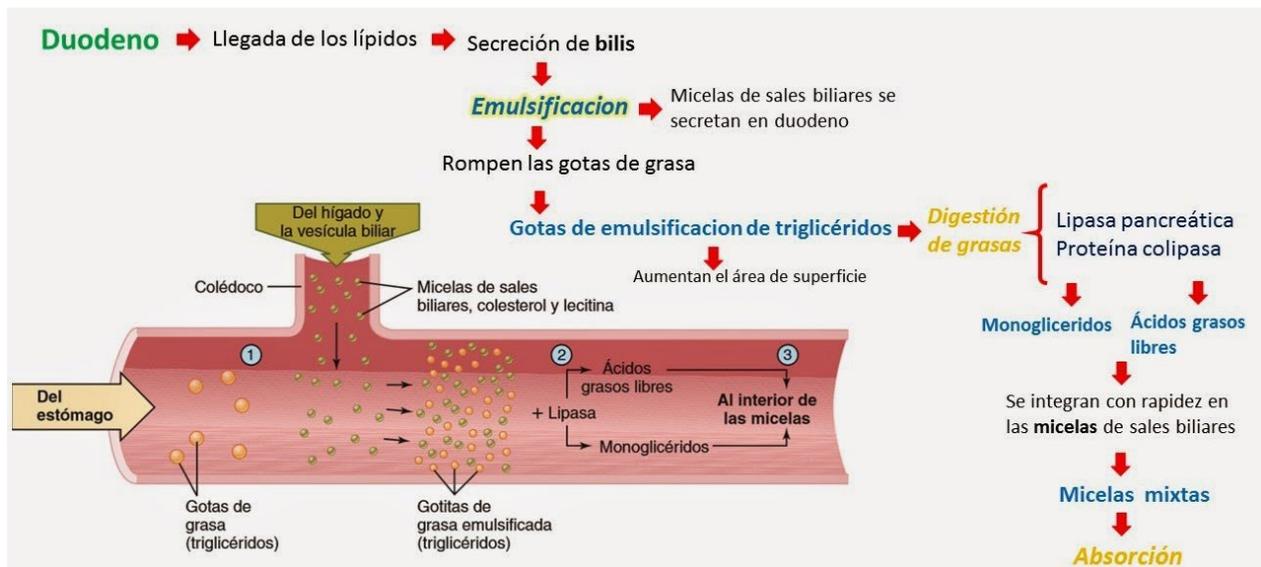


Figura 2 Digestión y absorción de lípidos (Fox-Ira, 2017)

2.2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA es un catalizador producido por las células endoteliales, que convierte el decapeptido inactivo angiotensina I mediante la eliminación de un dipéptido de su extremo carboxi-terminal en el octapéptido activo angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor. No es una enzima específica, ya que desdobla otras peptidasas (bradicinina, encefalinas, y sustancia P). Es una cininasa que activa la angiotensina II vasoconstrictora e inactiva la bradicinina vasodilatadora. La mayoría de las ECA en el organismo, están unidas a las membranas plasmáticas (células endoteliales, células epiteliales como la del túbulo renal proximal, células neuroepiteliales, próstata, etc.) y su escisión proteolítica provoca la liberación (ECA soluble en sangre, orina, linfa, edema pulmonar, líquido cefalorraquídeo, etc.). La fuente principal de ECA es el riñón, en el borde en cepillo del túbulo proximal (Mauer-Díaz et al., 2001). En la Figura 3 se muestra el funcionamiento del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el cual al ECA interacciona para la regulación de la presión arterial.

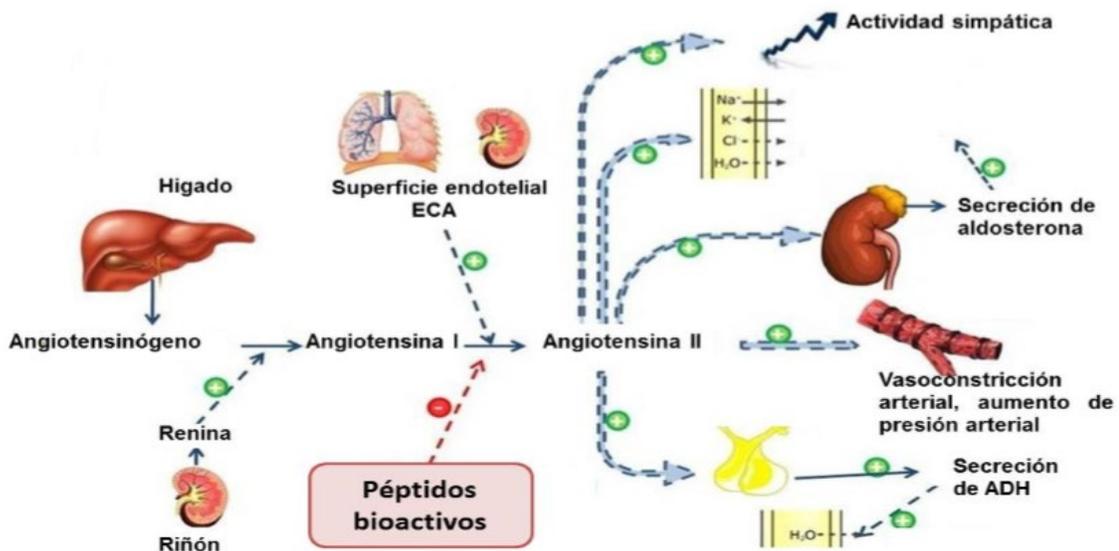


Figura 3 Sistema renina-angiotensina-aldosterona en la regulación de la presión arterial (Moya-Zeledón et al., 2012)

2.3. Medicamentos para el Tratamiento del Síndrome Metabólico

2.3.1 Acarbosa: Inhibidor de α -Glucosidasa

Uno de los enfoques terapéuticos más importantes para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas que hidrolizan carbohidratos como α -glucosidasa (Sevilla-Asencio et al., 2013).

La Acarbosa inhibe de forma competitiva y reversible a la α -glucosidasa de las microvellosidades intestinales, retrasando la absorción de los hidratos de carbono complejos y disminuyendo el pico glucémico posprandial. En monoterapia no producen incremento de peso ni hipoglucemia (Martínez-Castelao et al., 2012).

2.3.2 Orlistat: Inhibidor de Lipasa Pancreática

Para el tratamiento de la obesidad, se pueden utilizar diferentes métodos, entre los que están, el cambio de vida con una dieta saludable y ejercicio, la cirugía bariátrica y por farmacoterapia. Los avances más interesantes en el tratamiento de la obesidad están en la terapia farmacológica, la cual, al combinarse con un mejor y adecuado estilo de vida del individuo, favorece la disminución de peso significativamente. Su indicación está restringida a personas con un IMC mayor de 27 a 30 kg si presenta comorbilidades (Lanchero-Barrios, 2016).

El Orlistat se une covalentemente a la Ser152 en el sitio activo de la lipasa pancreática y forma un complejo estable, que inactiva la enzima, haciéndola incapaz de hidrolizar los triglicéridos y, por tanto, las grasas no absorbidas serán expulsadas en las heces fecales (Suwailem et al., 2006).

2.3.3. Captopril: Inhibidor de ECA

El Captopril es un inhibidor de ECA que actúa bloqueando la proteína peptidasa del centro activo de la misma. La peptidasa, una enzima convertidora que hidroliza la angiotensina I en angiotensina II e inactiva a la bradicina, un potente vasodilatador que actúa al menos en parte por estimulación de la secreción de óxido nítrico y prostaciclina. La actividad hipotensora del captopril es resultado de una acción inhibitoria sobre el sistema renina-angiotensina y una estimulante del sistema calicreína-cinina, inhibiéndola del 75-85% (Katzung y Trevor, 2016).

2.4. Efectos Adversos de Medicamentos Alopáticos

2.4.1. Insuficiencia Renal

La Food and Drug Administration (FDA, 2016) ha reforzado la advertencia existente acerca del riesgo de lesión renal aguda para los medicamentos para la diabetes tipo 2, además de la existencia de otros medicamentos que utilizados por largos periodos de tiempo también pueden llegar a predisponer al paciente a padecer insuficiencia renal. Por ello considera que los profesionales de la salud deben tomar en cuenta los factores que pueden predisponer a los pacientes a sufrir una lesión renal aguda antes de comenzar el tratamiento con diuréticos. Entre los factores a considerar se encuentran la disminución del volumen de la sangre, la insuficiencia renal crónica, la insuficiencia cardíaca congestiva y tomar otros medicamentos como, medicamentos para la presión arterial llamados inhibidores de ECA y bloqueador de receptores de angiotensina, y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Evaluar la función renal antes de comenzar el tratamiento y monitorearla periódicamente después.

2.4.2. Daño Hepático

El hígado es un órgano excepcional, aunque subestimado. Convierte los nutrientes que ingerimos en sustancias que el cuerpo puede aprovechar, y las toxinas en sustancias inofensivas, o se asegura de que sean eliminadas del organismo. Cuando el hígado funciona bien, nuestro metabolismo muestra un equilibrio. Pero a veces los medicamentos y los suplementos alimenticios pueden causar estragos en ese sistema, acarreando problemas hepáticos peligrosos. La FDA, se esfuerza por prevenir los daños hepáticos ocasionados por los medicamentos; “cualquier medicamento puede ocasionar problemas hepáticos peligrosos, pero afortunadamente este tipo de problemas rara vez ocurre”, según el Dr. John R. Senior “Es difícil predecir cómo afectarán los medicamentos el hígado porque la manera en que cada paciente responde a un medicamento determinado es diferente. El objetivo es prevenir la toxicidad en los fármacos”. Los medicamentos de venta sin receta son los causantes de más casos de fallos hepáticos fulminantes. La FDA ha identificado varios casos de daños hepáticos ocasionados por suplementos alimenticios. Por ejemplo, la dependencia ha emitido avisos de salud pública y enviado cartas de advertencia a las empresas que comercializan suplementos para adelgazar o para aumentar la masa muscular. En cierto caso, una empresa de Texas aceptó retirar y destruir ciertos suplementos alimenticios tras descubrir una interrelación entre esos productos y los casos de insuficiencia hepática y de hepatitis cuyo origen no es viral (FDA, 2014).

Es por ello que se buscan nuevas alternativas para el tratamiento de los padecimientos relacionados con el SM, como pueden ser un cambio de vida a un estilo más saludable, una dieta rica en alto contenido de antioxidantes, y algunos compuestos que puedan inhibir estas enzimas como los péptidos bioactivos.

2.5. Péptidos Bioactivos.

Los péptidos se consideran fragmentos de proteína específicos (de 2 a 20 aminoácidos) que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína original, pero después de algún proceso donde se

corta la proteína como la hidrólisis enzimática y se liberan los péptidos, pueden ejercer diversas funciones fisiológicas (Meisel y FitzGerald, 2003). Los péptidos pueden obtenerse a partir de la digestión de proteínas de origen animal o vegetal, ya sea empleando enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana, procesamiento y durante la digestión gastrointestinal (Smaranayaka y Li-Chan, 2011).

La mayor actividad de los péptidos comparada con los aminoácidos libres se debe a las propiedades fisicoquímicas únicas conferidas por sus secuencias de aminoácidos. La mayoría de los péptidos derivados de fuentes alimentarias presentan intervalos de peso molecular de 500 a 1800 kDa. Asimismo, a menudo incluyen restos de aminoácidos hidrofóbicos como valina (Val) o leucina (Leu) en el grupo amino terminal, así como prolina (Pro), His-Tir-Trp-Met-Cis en sus secuencias. Se ha estimado la actividad antioxidante de una biblioteca de tripéptidos estructuralmente relacionados con Pro-His-His, empleando un sistema de peroxidación del ácido linoléico, encontrando que los tripéptidos que contienen residuos de triptófano (Trp) o tirosina (Tir) en el carbono terminal presentan una fuerte actividad de captación de radicales libres (Saito et al., 2003). También se ha encontrado que los péptidos pueden ejercer un fuerte efecto sinérgico con algunos otros antioxidantes, por ejemplo, los compuestos fenólicos (Wang y González de Mejía, 2005). Por lo cual se cree que los péptidos bioactivos tienen una función antioxidante, que les brinda una función compleja que les permite inhibir enzimas como α -glucosidasa. También se les atribuye actividad antihipertensiva, hipocolesterolémica, citomoduladora, opioide, antitrombótica, inmunomoduladora, anticarcinogénico e incluso capacidad antiobesogénica (Power et al., 2012). Desde el descubrimiento del pentapéptido inhibidor de la ECA a partir del veneno de serpiente, se han seguido estudiando estos péptidos, tanto de origen animal como vegetal, pero que contengan esa cualidad de inhibición de la ECA (Ferreira et al., 1970); ECA convierte a Angiotensina I, un péptido de 10 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) en Angiotensina II, al cortar o eliminar los aminoácidos His-Leu de la parte terminal, siendo la Angiotensina II un vaso constructor que provoca elevación del flujo sanguíneo; los péptidos bioactivos compiten con la Angiotensina I para funcionar como el sustrato de ECA logrando así su inactivación (Cheun et al., 1980), ya se han establecido cadenas peptídicas de proteínas específicas que inhiben a esta enzima por ejemplo: Leu-Ile-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro proveniente de h- β -caseína, Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp proveniente de músculo de atún (*Thunnus thynnus*) y Gly-Val-Tyr-Pro-His-

Lys proveniente de bonito (*Sarda sarda*), son algunas de las cadenas ya establecidas (Yamamoto, 1997).

Con péptidos producidos a partir de carne de bonito seco utilizando la enzima termolisina y sometidos a ultrafiltración, los cuales se administraron en la dieta a ratas espontáneamente hipertensas, en una dosis de 1.5 g/día, mostraron un efecto antihipertensivo dos veces mayor comparado con una solución ya establecida para la hipertensión (KO) (Fujita et al., 2001). Péptidos obtenidos de proteína de soya utilizando columnas de intercambio catiónico para obtener las distintas fracciones de pesos moleculares y después por ultrafiltración, mostraron capacidad inhibitoria media (IC₅₀ 0.65 mg/mL) *in vitro* de ECA (Wu y Ding, 2002).

Aunque existen diversas técnicas para obtener péptidos bioactivos como hidrólisis química, hidrólisis enzimática y fermentación bacteriana, los estudios realizados han demostrado que la hidrólisis enzimática es un método muy eficiente para la obtención de péptidos bioactivos de origen vegetal (Korhonen y Pihlanto, 2006), ya que este es uno de los métodos en los que se simula la digestión natural de las proteínas en el organismo (Sewald y Jakubke, 2002). Mientras que para la confirmación de la formación de péptidos demostrando como se separa la proteína y el peso molecular que llegan a tener los péptidos formados por el proceso de hidrólisis enzimática, uno de los métodos utilizados es la electroforesis SDS-PAGE (Corona et al., 2017; Bueno-Gavilá, 2017). Se han establecido diversas funciones de los péptidos además de inhibir a la ECA o como es que alguna otra función les brinda mayor capacidad inhibitoria, como es la función antioxidante. En péptidos de hoja de alfalfa (*Medicago sativa*) obtenidos por medio de hidrólisis enzimática con la enzima alcalasa, se determinó la capacidad antioxidante de estos por el método colorimétrico de DPPH comparado con el glutatión reducido. Los péptidos con una concentración de 1.60 mg/mL mostraron una capacidad de inhibición del radical de DPPH del 79.71% y la del glutatión reducido de > 80% en una concentración de 0.4 mg/mL. Además, los péptidos mostraron un efecto quelante del 65.15% sobre los iones ferrosos a una concentración de 0.50 mg/mL. En la determinación del peso molecular de los péptidos, la mayoría mostraba un peso inferior a 1000 Da, pudiendo concluir que esos péptidos eran los que mostraron la mayor capacidad antioxidante (Xie et al., 2008).

También se han inhibido otras enzimas con péptidos bioactivos como por ejemplo la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), enzima de gran importancia, relacionada con el DM2; es por ello que se busca que los péptidos puedan tener la cualidad de inhibir a esta enzima (Roy et al., 2010; Nongonierma y FitzGerald, 2016). Los péptidos obtenidos de suero de leche bovina tratados con

la enzima pepsina mostraron la capacidad de inhibir a esta enzima. De la hidrólisis se pudieron identificar 24 péptidos derivados de α -lactoalbúmina y 11 de β -lactoglobulina. Los fragmentos con la mayor inhibición sobre la enzima DPP IV fueron del péptido de α -lactoalbúmina Leu-Cys-Ser-Glu-Lys-Leu-Asp-Gln y el péptido de β -lactoglobulina Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu con un 46 y 73% de inhibición de la enzima, respectivamente, aunque el conjunto peptídico mostró una mayor capacidad inhibitoria (Lacroix y Li-Chan, 2014).

En los estudios sobre péptidos bioactivos se ha demostrado que se puede inhibir las enzimas DPP IV, la ECA y α -glucosidasa, pero aún no se han realizado estudios para demostrar la inhibición de lipasa pancreática. Aun cuando no se ha inhibido con péptidos se han realizado estudios para inhibir esta enzima con otros componentes como es con el medicamento Orlistat, donde se comprobó que este medicamento en personas obesas tiene un efecto en la reducción del peso corporal de 1.75 ± 0.54 kg con 36 mg por día del medicamento; el cual se les administro en el lapso de 12 semanas (Drent et al., 1995). También se han realizado estudios para la inhibición de lipasa pancreática con extractos de polifenoles como el realizado con polifenoles del árbol mistol (*Ziziphus mistol*); los compuestos polifenólicos demostraron tener la capacidad de inhibir a la enzima, siendo su IC_{50} 5.9 ± 0.5 mg/mL (Orqueda et al., 2017). También con un extracto polifenólico de orégano se logró inhibir a la enzima lipasa pancreática en su fase intestinal hasta un 54.54% (Gutiérrez-Grijalva et al., 2019).

La mayoría de los estudios realizados sobre la obtención de péptidos se han realizado en proteínas de origen animal por ser más viable (Darewicz, Dziuba y Minkiewicz, 2007). Pero también se han estudiado en diferentes fuentes de origen vegetal, una de las fuentes que proporciona la mayoría de los péptidos de origen vegetal es la soya. Se han encontrado 28 péptidos relacionados estructuralmente con Leu-Leu-Pro-His-His y se observó que la secuencia Pro-His-His era el sitio más activo, lo cual hace pensar que los péptidos que contienen histidina pueden actuar como quelantes de iones metálicos, captadores de radicales e inactivadores de especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuyendo a su actividad (Wang y González de Mejía, 2005).

Es por ello que la mayoría de los estudios que se han realizado sobre péptidos de origen vegetal se han centrado en las semillas o leguminosas, ya que, es donde se encuentra la mayor concentración de proteína. En un estudio se generaron péptidos bioactivos por hidrólisis con pepsina-pancreatina con una duración de 2 h por cada una de las enzimas, utilizando 5 variedades de frijol común *Phaseolus vulgaris* (pinto, rojo, marino, negro y gran norte), pre cocidos y crudos a los cuales se

les midió la capacidad antioxidante por el método de ORAC y capacidad inhibitoria de α -amilasa, α -glucosidasa, DPP IV y ECA. Se identificaron un total de 11 y 17 secuencias de péptidos biológicamente activos en frijoles crudos y pre cocidos, respectivamente. La mayor capacidad antioxidante se obtuvo de los péptidos de frijol negro pre cocidos la cual fue de 610.5 mM ET/g. Por otra parte la mayor capacidad para inhibir las enzimas fueron para α -amilasa con un 38% los péptidos de frijol rojo crudo; para α -glucosidasa con un 70% los péptidos de frijol negro crudos; para DPP IV, se logró el IC₅₀, con una concentración de 0.093 mg de proteína/mL, de los péptidos de frijol marino crudo; y para ECA, el IC₅₀, se logró con una concentración de 0.2 a 0.5 mg de proteína/mL de todas las variedades y tanto en crudos y pre cocidos. También lograron identificar que los péptidos con un peso molecular <3 kDa eran los que mostraban mayor capacidad inhibitoria (Mojica et al., 2015).

Debido a todo lo anterior se ha establecido que los péptidos con mayor capacidad antioxidante por diferentes métodos como son ORAC, DPPH y ABTS, además que presentan un peso molecular <10 kDa son los péptidos que llegan a mostrar mayor capacidad inhibitoria sobre diversas enzimas, además llegan a mostrar mayor eficiencia si el peso molecular es <3 kDa.

Para la obtención de péptidos de origen vegetal han sido mayormente estudiados de las semillas y leguminosas, pero estas tienen algunos inconvenientes ya que suelen tener componentes alergénicos que el organismo no los reconoce como propios. Además de los componentes antinutricionales, que suelen generar interacción con otros como vitaminas y minerales, impidiendo que estos sean absorbidos por el organismo. Por otro lado las proteínas vegetales procedentes de fruto y de la hojas (fuente no convencional), el organismo las reconoce como propias, además de que ayudan a la absorción de algunos componentes; por ello se propone el estudio de péptidos de una fuente no convencional como es la hoja de la *Moringa oleifera* (Elizalde et al., 2009).

2.3. *Moringa oleifera* L.

Se siguen buscando péptidos de fuentes no convencionales como son las hojas de las plantas, es por ello que para realizar esta investigación, el interés es encontrar péptidos bioactivos de hoja de *Moringa oleifera*, ya que hay estudios que demuestran que esta planta posee un alto contenido de

proteína en su hoja del 25-30% (Castillo-López et al., 2017). Además diferentes partes de la planta contienen un perfil de minerales importante, y son una buena fuente de proteínas, vitaminas, β -caroteno, aminoácidos y varios compuestos fenólicos (Foidl et al., 1995; Anwar et al., 2007).

Ya se han realizado estudios de péptidos bioactivos de moringa y en su mayoría han sido en la semilla. En un estudio donde se obtuvieron péptidos de semilla de *Moringa oleifera* por hidrólisis enzimática, con los tratamientos con tripsina, quimiotripsina y pepsina-tripsina por 2.5 y 5 h, se determinó el peso molecular por electroforesis donde los péptidos obtenidos oscilaron de 6 a 50 kDa. Se midió la capacidad antioxidante de los péptidos por el método colorimétrico de ABTS, donde obtuvieron una capacidad de 27.43 mM ET/mg de proteína. Esta propiedad la mostraron los péptidos con un peso <10 kDa y producidos con el tratamiento de tripsina por 5 h. También determinaron la capacidad inhibitoria de los péptidos en las enzimas de ECA, donde con los péptidos <10 kDa obtenidos por el tratamiento de pepsina-tripsina por 5 h determinaron la IC₅₀ con 0.226 μ g de proteína/ μ L, y con esos mismos péptidos lograron inhibir a α -glucosidasa obteniendo el IC₅₀ con una concentración de 0.123 μ g de proteína/ μ L (González-Garza et al., 2017). En otro estudio con semilla de *Moringa oleifera* se obtuvieron péptidos mediante hidrólisis enzimática con alcalasa, tripsina y pepsina por 3 h, a los cuales se les midió la capacidad antioxidante por el método colorimétrico de DPPH, se observó que los péptidos obtenidos con pepsina lograron tener una capacidad antioxidante de un 35.99%, comparada con el glutatión reducido que fue de 69%, y lograron el mayor porcentaje de inhibición de ECA con los péptidos obtenidos con alcalasa que fue de 79.30% (Aderinola et al. 2018).

La hoja de la moringa ha sido utilizada para consumo humano y animal por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. Se ha demostrado que puede combatir la desnutrición de poblaciones infantiles y maternas desprotegidas (Fahey, 2005). Las hojas de moringa poseen un porcentaje similar de proteína a la del huevo, y superior en un 50% de los lácteos, además de poseer cuatro veces más calcio que la leche de vaca, cuatro veces más vitamina A que la zanahoria, siete veces más vitamina C que la naranja, cuatro veces más hierro que la espinaca, tres veces más potasio que el plátano y tres veces más magnesio que la lechuga (Alfaro y Martínez, 2006; Enríquez, 2013). Sus hojas verdes corresponden al grupo de alimentos que se utilizan como una fuente de alimento importante en todas las partes del mundo (Yang y Tsou, 2006; Saini et al., 2014).

La *Moringa oleifera* es una planta con propiedades antioxidantes. En un estudio realizado con plantas de moringa de diferentes tamaños, analizaron la capacidad antioxidante de la hoja por el método de ORAC, donde obtuvieron su mayor capacidad antioxidante en las hojas del árbol con la altura de 250 cm la cual fue de 648.82 $\mu\text{M ET/g}$ (Guzmán et al., 2015). En otro estudio se caracterizó el contenido de proteínas en la harina de hoja de *Moringa oleifera* de 2 variantes, vaina corta y vaina larga. El valor más elevado de proteína se encontró en la variante de vaina larga 30%, también analizó el contenido de aminoácidos y se encontró un elevado contenido en tirosina de 3.95 g por 100 g de muestra, e histidina de 2.59 g por 100 g de muestra. En el análisis de capacidad antioxidante por el método de ORAC, el valor más elevado se encontró en la variante de vaina corta con 182.31 $\mu\text{mol/ET g}$ y por el método de DPPH el valor más elevado se encontró en la variante de vaina larga 981.22 $\mu\text{mol/ET g}$ (Castillo-López et al., 2017).

Lo que hace a *Moringa oleifera* una fuente de interés para el estudio ya que es rica en proteínas y presenta actividad antioxidante. Estas propiedades podrían brindarle la factibilidad de contener péptidos bioactivos con capacidad antioxidante y capacidad inhibitoria de enzimas relacionadas con el síndrome metabólico.

3. HIPÓTESIS

Los péptidos obtenidos de la hoja de *Moringa oleifera* presentan capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS entre los 80-150 μM ET/g. Un efecto inhibitorio sobre las enzimas, α -glucosidasa, lipasa y ECA, con resultados de inhibición: $\geq 65\%$. Y la mayoría de los péptidos obtenidos de la hoja de *Moringa oleifera* presentan un peso molecular <10 kDa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos bioactivos de hoja de *Moringa oleifera* L. en las enzimas α -glucosidasa, ECA y lipasa.

4.2. Objetivos Específicos

1. Obtener los péptidos bioactivos de hoja de *Moringa oleifera* por hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina.
2. Determinar la capacidad antioxidante de los péptidos de hoja de *Moringa oleifera*
3. Evaluar la capacidad inhibitoria de los péptidos de hoja de *Moringa oleifera* en las enzimas α -glucosidasa, ECA y lipasa.
4. Determinar el peso molecular de los péptidos de hoja de *Moringa oleifera*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestras

La harina de *Moringa oleifera* se obtuvo de un proyecto anterior del laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; proveniente del campo experimental localizado en la comunidad “la Campana” en Culiacán, Sinaloa, México.

5.2. Concentrado Proteico de la Hoja de *Moringa oleifera* L.

La obtención del concentrado proteico se llevó a cabo siguiendo la metodología de Mojica et al. (2015), con modificaciones. Se pesó la harina de hoja de moringa y se le agregó agua destilada (10 mL/g). Después de homogenizar la mezcla se ajustó el pH al punto isoeléctrico de la moringa (10.5-11) con NaOH (2 N), para provocar la suspensión de la proteína soluble. Se dejó en agitación por 1 h a 200 rpm. Se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C por 15 min y se recuperó el sobrenadante, al cual se le ajustó el pH a 4 con HCl (3 N) para así precipitar la proteína soluble. Se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C por 20 min. Se retiró el sobrenadante y se conservó el pellet el cual se almacenó en congelación a -20 °C. El proceso se repitió 4 veces, y los pellets obtenidos se colocaron a -80 °C por 30 min. Por último las muestras fueron liofilizadas por 72 h.

5.3. Hidrólisis Enzimática

El proceso se llevó a cabo con la metodología de Megías et al. (2004), con modificaciones. Se pesó el concentrado proteico de la hoja de moringa, se le agregó agua destilada (25 mL/g) se ajustó el

pH a 2 (HCl, 3 N), se agregó la enzima pepsina (1/10 enzima sustrato) y se incubó a 37 °C (2 y 3 h.). Después de ese tiempo, la mezcla se agitó manualmente cada 10 y 30 min. Se ajustó el pH a 2 (HCl, 3 N) y se mantuvo fijo midiendo la cantidad utilizada del ácido. Pasado el tiempo requerido se ajustó el pH a 7 (NaOH, 2 N), y se agregó la enzima pancreatina (en una relación 1:10 enzima: sustrato). Se incubó nuevamente a las mismas condiciones y se agitó manualmente cada 10 y 30 min. Se ajustó el pH (NaOH, 2 N para mantener fijó el pH a 7); midiendo la cantidad utilizada de base. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C por 20 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se congeló a -20 °C. Después se ultra congelaron a -80 °C por 30 min y se liofilizaron.

5.4. Proteína Soluble por el Método de Kjeldahl

Se utilizó el método 988.05 de A.O.A.C. (1998). El cual consistió de tres fases: digestión, destilación y titulación. Para la digestión, se pesaron 0.1 g de las muestras y se colocaron en matraz MicroKjeldahl, donde se les agregó 1.5 g de mezcla catalítica (sulfato de potasio y sulfato de cobre). Luego se les agregó 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se colocaron a ebullición por 2 h, hasta obtener una solución azul-verde (indicadora de que el nitrógeno orgánico se ha convertido en amoniaco). Para la destilación, a las muestras frías se les agregó 10 mL de agua destilada, se colocaron en el destilador, se les agregó NaOH (40%), hasta que la muestra se tornó negra. Se calentó a baño maría y los vapores de amonio se recuperaron (5 min) en 15 mL de una solución de ácido bórico (4%) e indicador (rojo de metileno y azul de metileno). Para la titulación se valoró con una solución de HCl (0.1 N). Se determinó primeramente el porcentaje de nitrógeno con la siguiente fórmula:

$$(1) \%Nitrógeno = \left(\frac{H * N * meq}{g \text{ de muestra}} \right) * 100$$

Dónde:

H = volumen de HCL gastado.

N = Normalidad del HCL.

meq= Miliequivalentes de Nitrógeno (0.01401).

Y posteriormente se determinó el porcentaje de proteína con la siguiente fórmula:

$$(2) \%Proteína = \%Nitrógeno * factor\ de\ conversión$$

Dónde:

Factor de conversión = 6.25.

5.5.Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó por el método de pH Stat propuesto por Ezquerria et al. (1997). Este se llevó a cabo realizando una hidrólisis controlada, manteniendo un pH fijó, con un ácido o una base; cuantificando la cantidad de estos utilizada durante el tiempo de hidrólisis. El grado de hidrólisis se calculó utilizando la ecuación de Adler-Nissen. (1986), y se reportó en porcentaje:

$$(3) \%GH = [(B * Nb * 1.5)/(M * (S\%/100)/pH)] * 100$$

Donde:

B= los mL del ácido o la base utilizados para mantener el pH fijó.

Nb= la normalidad del titulador.

1.5 es una constante.

M= masa en gramos, de reacción de la mezcla.

S%= es la concentración de proteína en la mezcla de reacción.

pH= el pH al que se mantuvo la reacción de hidrólisis.

5.6. Capacidad Antioxidante por el Método de DPPH

Uno de los ensayos que se pueden utilizar para valorar la actividad antioxidante de algún material vegetal es el denominado ensayo de DPPH. Este método utiliza el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), consiste en reducir su cromógeno púrpura por la acción de un compuesto antioxidante a un hidrazin, compuesto que colorea a un tono amarillo pálido. Este cambio se cuantifica por espectrofotometría a una absorbancia de 515-540 nm (Karadag et al., 2009).

Se utilizó una curva de estándar de Trolox (1000 μM) con etanol (80%), con las concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 mM. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 μL de blanco (etanol 80%), curva estándar y muestras (0.011mg/mL), se les adicionó 280 μL del radical DPPH; se dejó incubar en resguardo de la luz por 30 min. y se leyó a una absorbancia de 540 nm. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra ($\mu\text{M ET.g}^{-1}$).

5.7. Capacidad Antioxidante en Equivalente de Trolox (TEAC) ABTS

El ensayo ABTS [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzoatiazolin-6-sulfónico)] está basado en la inhibición de la absorbancia del radical ABTS^{*+} ocasionada por la reacción con antioxidantes. Este cambio de absorbancia encuentra su pico máximo de absorbancia a 415 nm y un pico máximo secundario a 660, 734 y 820 nm. Cuando se utiliza trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E) como estándar, el método se denomina TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, por sus siglas en inglés) (Singh y Singh, 2008).

Se utilizó una curva de estándar de Trolox (1000 μM) con etanol (80%), con las concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 mM. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 15 μL

de blanco (etanol 80%), curva estándar y muestras (0.011 mg/mL), se les adicionó 285 μL del radical ABTS; se dejó incubar en resguardo de la luz por 2 h y se leyó a una absorbancia de 734 nm (Thaipong et al., 2006). Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra ($\mu\text{M ET.g}^{-1}$).

5.8. Inhibición de α -Glucosidasa

Se realizó de acuerdo a lo propuesto por Cuevas-Juárez et al. (2014), con modificaciones, que consiste en determinar la diferencia de absorbancia a tiempo cero, y a 10 min de reacción enzima:sustrato. Se utilizó el sustrato p -Nitrofenil- α -glucopiranosido (p NGP), en un amortiguador de fosfato 0.1 M con pH 6.9 (PBS); el cual al ser sometido con la enzima α -glucosidasa, se separa el p -Nitrofenil y da una tinción (amarillo) a la reacción. En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μL de blanco (PBS) y muestras (0.1 mg/mL) o control (acarbose a 3 mg/mL). Se les agregó 100 μL de α -glucosidasa (0.0042 g/100 mL PBS), se incubó a 37 °C por 10 min. Después de ese tiempo se les agregaron 50 μL de PNGP (90.375 mg/100 mL PBS), y se leyó a una absorbancia de 405 nm. Posteriormente se incubó nuevamente a 37 °C por 10 min. y se determinó la absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición y se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(4) \%Inhibición = \left(\frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \right) * 100$$

Dónde:

Ablanco= diferencia de absorbancia del blanco (PBS).

Amuestra= diferencia de absorbancia de la muestra.

Diferencia= (Absorbancia 2 – Absorbancia 1).

5.9. Inhibición de Lipasa Pancreática

Se realizó acorde a lo establecido por Winkler y Stuckmann (1979) con algunas modificaciones, se utilizó Palmitato de ρ -Nitrofenil (ρ -NPP) como sustrato, el cual es hidrolizado por lipasa pancreática a ρ -Nitrofenol, esta reacción genera coloración (amarillo). En una microplaca de 96 pozos se agregaron 20 μ L de blanco (amortiguador de fosfato de sodio alcalino 0.1 M a pH 7.9), 100 μ L de muestra y 100 μ L de control (Orlistat 3 mg/mL). Se les añadió 20 μ L de una solución de enzima lipasa porcina (10 mg/mL), la mezcla se incubó a 37 °C por 10 min. Después, se les añadió 200 μ L del sustrato, el cual estaba en una solución de 100 mL que contenía 90 mL con clorato de sodio (1.15 mg/mL) y goma arábiga (0.55 mg/mL) y 10 mL de isopropanol con ρ -NPP (30 mg); se incubó nuevamente y se determinó la absorbancia a 410 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición y se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(5) \%Inhibición = \left(\frac{A_{Blanco} - A_{Muestra}}{A_{Blanco}} \right) * 100$$

Donde:

A_{Blanco} = es la absorbancia de la reacción de la enzima sin inhibidor.

$A_{Muestra}$ = es la absorbancia de la reacción de la enzima con inhibidor.

5.10. Inhibición de ECA

Se utilizó el método espectrofotométrico propuesto por Li et al. (2005) con algunas modificaciones. Se utilizó Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) como sustrato, que al ser sometido con la enzima ECA se libera ácido hipúrico, al cual agregándose quinolina y cloruro de bencenosulfonilo (BSC), forman un complejo colorido (café rojizo) y se determina a una absorbancia de 492 nm. A cada muestra, se le agregó la solución del inhibidor de la ECA 20 μ L (Concentrado proteico, Hd2h,

Hd3h 0.1 mg/mL y captopril 3 mg/mL), 50 µL de HHL (5 mM en amortiguador de tetraborato de sodio 100 mM (pH 8.3) que contiene NaCl 300 mM), se preincubaron a 37 °C por 5 min. La reacción se inició mediante la adición de 10 µL de solución de ECA (200 mU/mL) y la mezcla se incubó a 37 °C por 30 min, después de ese tiempo la reacción se detuvo agregando 100 µL de HCl (1M). Se añadieron los reactivos de quinolina (150 µL) y BSC (50 µL), se incubaron a 30 °C por 30 min. Posteriormente se les añadió 150 µL de etanol y se incubaron a 30 °C por 30 min. Se prepararon las muestras A (muestras), B (blanco), C (control) en tubos Eppendorf de 2 mL, color ámbar como lo indica la tabla de ECA (anexo 1). Se tomaron 180 µL de cada muestra para colocar en la micro placa de 96 pozos por triplicado. Se leyó a 492 nm (Narai-Kanayama y Aso, 2009). El grado de inhibición se determinó con la siguiente fórmula y se reportó en porcentaje:

$$(6) \%inhibición = \frac{B-A}{B-C} * 100$$

Se estimó el porcentaje de la actividad inhibitoria sobre las enzimas y se estableció una regresión lineal con los resultados para finalmente extrapolar los datos y obtener el IC₅₀ (Concentración necesaria de sustancia inhibitoria para inhibir el 50% de las enzimas).

5.11. Electroforesis de una Dimensión en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se llevó a cabo con el método de Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Se preparó un gel de poliacrilamida continuo al 20% (anexo 2). Se colocó el gel en la cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis (anexo 3). Se añadió en el primer carril 5 µL del estándar de peso molecular (Precisión Plus Protein Dual Xtra Standars BIO-RAD), con pesos de 2 a 250 kDa. En los siguientes carriles se colocaron las muestras 20 µL que contenían 15 y 20 µg de proteína en 10 µL y 10 µL de amortiguador de Laemmli las cuales fueron sometidas a baño seco por 5 min a 95 °C. La electroforesis se corrió a 120 V constantes con 400 mA, durante 60 min. Posteriormente, el gel se retiró del equipo y se colocó en solución de tinte (anexo 4) que se agitó durante unos

minutos y posteriormente se dejó en la solución por 16 h. Después de ese tiempo el gel se retiró de la solución de tñido y se colocó en solución de desteñido (anexo 5) donde se agitó por 1 h. Se cambió la solución y se agitó 1 h se retiró de la solución y se tomó una fotografía en el fotodocumentador. Posteriormente, se volvió a colocar en solución de desteñido por 16 h más, se retiró de la solución y se volvió a tomar fotografía para la determinación de los pesos moleculares de las muestras.

5.12. Análisis Estadístico

A la harina de la hoja de *Moringa oleifera*, se le realizaron los métodos de concentrado proteico (concentrado PT) e hidrólisis del aislado proteico (Hd 2h y Hd 3h) por triplicado. Para evaluar las posibles diferencias entre los procesos, para grado de hidrólisis, capacidad antioxidante e inhibición enzimática (se determinó la concentración Inhibitoria Media (IC50) por regresión lineal); se utilizó un análisis de ANOVA de un factor, y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. Se utilizó el programa estadístico Minitab ® 17.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Proteína por el Método de Kjeldahl y Grado de Hidrólisis

Se determinó el contenido de proteína en la harina de la hoja de moringa, como fuente de proteína para la obtención del concentrado y de los hidrolizados proteicos (Hd 2h y Hd 3h). La concentración de proteína en la harina y en los hidrolizados de Hd 2h y Hd 3h, fueron de 24.08%, 27.42% y 22.5%, respectivamente, mientras que el concentrado proteico fue de 47.78%. El grado de hidrólisis de los hidrolizados en Hd 2h fue de 53.93% y en Hd 3h fue de 92.9%. En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos de proteína en las muestras, además del grado de hidrólisis de los hidrolizados.

Cuadro 3 Proteína en hoja, concentrado proteico e hidrolizados proteicos y grado de hidrólisis en los hidrolizados proteicos

<i>Muestra</i>	<i>% Proteína</i>	<i>% Grado de Hidrólisis</i>
Harina de hoja de moringa	24.08 ± 1.42 bc	NA
Concentrado Proteico	47.78 ± 2.24 a	NA
Hd 2h	27.42 ± 1.4 b	53.93 ± 2.55 b
Hd 3h	22.5 ± 1.68 c	92.9 ± 4.39 a

NA No aplica para las muestras el grado de hidrólisis

Los cambios en la concentración de proteína de las muestras en este estudio muestran el mismo comportamiento que se ha publicado en diversos trabajos. El porcentaje en la muestra inicial es bajo, se aumenta en la obtención del concentrado proteico, pero en los hidrolizados disminuye nuevamente. En forma similar lo presentaron González et al. (2017), usando muestras de harina desgrasada de semilla de moringa, determinaron la concentración de proteína por el método de

Bradford obteniendo que las concentraciones de proteína en la muestra inicial de harina fue 37.48%, en el concentrado proteico de 49.67% y en los hidrolizados realizados a 2.5 y 5 h de 19.89%. Kapel et al. (2006), en péptidos de *Medicago sativa* L. (alfalfa) realizaron un aislado proteico > 90% de proteína, determinado por el método de Kjeldahl, y en los hidrolizados al 87% de proteína. Marrufo-Estrada et al (2012), estudiaron semilla de *Jatropha curcas*, su muestra inicial fue harina desgrasada de esta semilla la cual tenía 65.60% de proteína, en el aislado proteico de 90.5% y en los hidrolizados obtuvieron un 50.98% de proteína; con sus diferentes tratamientos; el mayor porcentaje de grado de hidrólisis que obtuvieron fue con su tratamiento de pepsina-pancreatina por 120 min, siendo de 23%. Mojica et al. (2015) en péptidos de diferentes variedades de frijol precocido con tratamiento de pepsina-pancreatina por 2 h cada una de las enzimas obtuvieron su mayor porcentaje de hidrólisis en los péptidos de frijol pinto precocido (58%); en las muestras del presente estudio mostraron un grado de hidrólisis con el tratamiento de pepsina-pancreatina por 2 h cada una de las enzimas de 53.93%, mientras que los hidrolizados con pepsina-pancreatina por 3 h cada una de las enzimas fue de 92.9%. Por lo cual se puede inferir que a mayor tiempo de tratamiento con las enzimas se produce mayor grado de hidrólisis, ya que se produce mayor rompimiento de enlaces peptídicos en la proteína. No obstante si el tiempo excede a las 7 h con tratamiento de hidrólisis enzimática estos podrían convertirse en aminoácidos libres.

6.2.Capacidad Antioxidante por los Métodos de DPPH y ABTS

En la determinación de la capacidad antioxidante la muestra con mayor relevancia fue el hidrolizado por 3 h. En ambos métodos las muestras mostraron similar tendencia, el concentrado proteico presentó la menor capacidad antioxidante, seguido por el hidrolizado por 2 h y con mayor capacidad el hidrolizado por 3 h. Los péptidos pueden mostrar capacidad antioxidante debido a alguno de los aminoácidos presentes en su estructura, que puede poseer una función de quelante; y con esto producir interacciones con el sitio activo de algunas enzimas como las evaluadas en este estudio (Saito et al., 2003). En la literatura se hace referencia que si los péptidos producidos por hidrólisis enzimática muestran capacidad antioxidante, esta capacidad les brinda mayor actividad inhibitoria sobre enzimas (Power et al., 2012); por esta razón se realizó un comparativo, entre el

concentrado proteico y los hidrolizados, para determinar si los péptidos obtenidos después de las hidrólisis mostraban mayor capacidad antioxidante, o si el concentrado proteico era el que proporcionaba la capacidad antioxidante a las muestras. En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante

Cuadro 4 Capacidad antioxidante de las muestras por los métodos de DPPH y ABTS

<i>Muestras</i>	<i>DPPH $\mu\text{M ET/g}$</i>	<i>ABTS $\mu\text{M ET/g}$</i>
Concentrado proteico	37.18 \pm 1.99 c	35.44 \pm 1.47 c
Hd 2h	62.74 \pm 1.78 b	63.1 \pm 0.94 b
Hd 3h	92.73 \pm 1.15 a	99.62 \pm 1.17a

Se utilizaron los dos métodos para mostrar diferencias en las muestras entre los métodos, e identificar cual fue la función antioxidante que mostraron los péptidos. Los resultados obtenidos por los dos métodos (DPPH y ABTS) mostraron un comportamiento similar, siendo el concentrado proteico el que mostró la menor capacidad antioxidante de 37.18 $\mu\text{M ET/g}$ por el método de DPPH y 35.44 $\mu\text{M ET/g}$ por el método de ABTS, mientras que los hidrolizados por 3 h fueron los que mostraron la mayor capacidad antioxidante de 92.73 $\mu\text{M ET/g}$ por el método de DPPH y de 99.62 $\mu\text{M ET/g}$ por el método de ABTS, respectivamente. Diversos autores han buscado esta propiedad en los péptidos, para comparar esta capacidad con la capacidad inhibitoria que presentan los péptidos sobre diversas enzimas. Por ejemplo, Aderinola et al (2018), obtuvieron péptidos de semilla de moringa mediante hidrólisis enzimática con pepsina por 3 h; ellos encontraron una capacidad antioxidante de 85.34 $\mu\text{M ET/g}$ determinada por el método de DPPH; además, en otros tratamientos para producir hidrólisis, utilizaron las enzimas de tripsina y alcalasa por 3 h, sin embargo, encontraron la mayor capacidad con los péptidos producidos por pepsina. En el estudio de la hoja de moringa el tratamiento de pepsina-pancreática por 3 h cada una de las enzimas, los péptidos generados con este tratamiento mostraron mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS. González et al. (2017), obtuvieron péptidos por medio de hidrólisis con pepsina-tripsina

por 5 h, presentaron la mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS (13.86 $\mu\text{M ET/g}$), mientras que los hidrolizados del presente estudio a las 3 h de cada una de las enzimas, mostró mayor capacidad antioxidante que los reportados en el estudio anterior. Abadía-García et al. (2013) generaron péptidos de queso cottage con digestión simulada con pepsina-pancreatina por 3 h, al cual se le añadieron probióticos para la inhibición de la bacteria *L. monocytogenes*; a los cuales se les determinó la capacidad antioxidante en diferentes días, por los métodos de DPPH y ABTS (TEAC); se encontró que la actividad antioxidante fue aumentando conforme aumentaban los días de muestreo; ellos obtuvieron al día 28 por el método de DPPH una capacidad antioxidante de 220 $\mu\text{M ET/g}$ y por el método de ABTS de 300 $\mu\text{M ET/g}$. Con esto, cabe señalar que aun cuando el valor de este ensayo con estos péptidos de queso es mayor que el que se muestra con los péptidos de la hoja de moringa, la diferencia en actividades podría también atribuirse a que al estudio de los péptidos de queso cottage se le añadieron probióticos lo que podría brindarles mayor capacidad antioxidante.

6.3. Inhibición de la Enzima α -Glucosidasa

El ensayo de inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa, se realizó con las 3 muestras, concentrado proteico, Hd 2h y Hd 3h, utilizando como control positivo Acarbosa, medicamento comercial que inhibe a α -glucosidasa. Se determinó la IC_{50} para conocer la concentración de proteína requerida para inhibir el 50% de la enzima. En el Cuadro 5 se muestran los porcentajes de inhibición y la IC_{50} , y en las Figuras 4, 5 y 6 se muestran las curvas de obtención de la IC_{50} por regresión lineal, para cada una de las muestras.

Cuadro 5 Inhibición de la enzima α -glucosidasa y la IC_{50}

Muestras	Inhibición en α -glucosidasa (%)	IC_{50} mg/mL
Acarbosa	$81.04 \pm 2.26a$	ND
Concentrado proteico	$56.89 \pm 3.51b$	0.314
Hd 2h	$75.12 \pm 1.70a$	0.127
Hd 3h	$75.08 \pm 1.87a$	0.075

ND No determinado

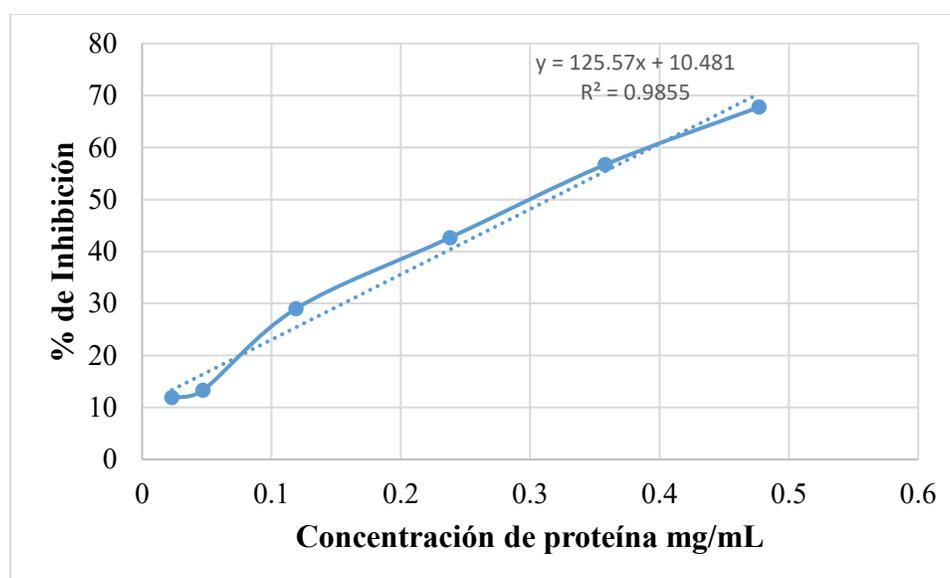


Figura 4 IC_{50} del concentrado proteico para inhibición de α -glucosidasa

Donde se logró IC_{50} con 0.314 mg de proteína/mL.

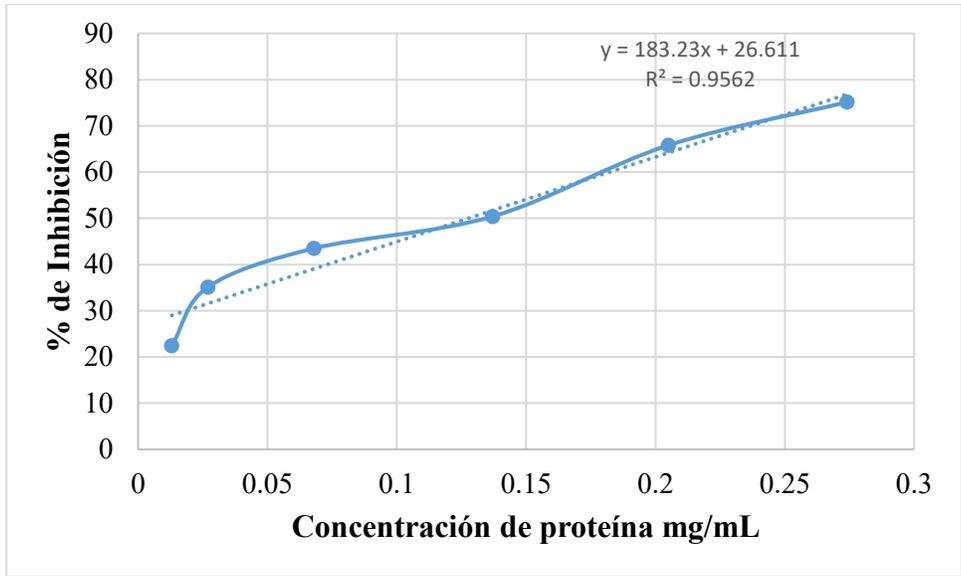


Figura 5 IC₅₀ de Hd 2h para inhibición de α -glucosidasa

Donde se logró IC₅₀ con 0.127 mg de proteína/mL.

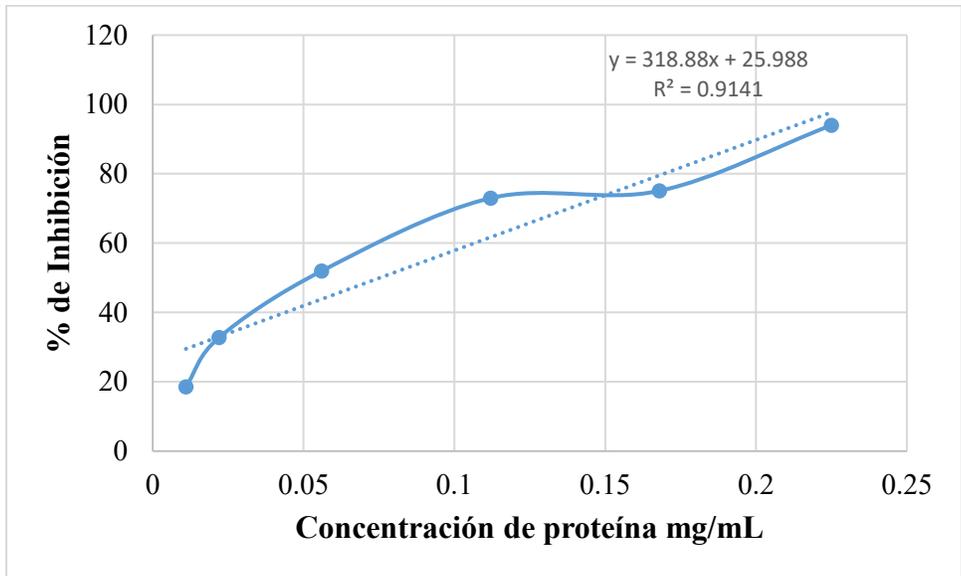


Figura 6 IC₅₀ de Hd 3h para inhibición de α -glucosidasa

Donde se logró IC₅₀ con 0.075 mg de proteína/mL.

Los péptidos obtenidos de la hoja de moringa mostraron un porcentaje de inhibición sobre la enzima α -glucosidasa de 75.12% y el 75.08% por los Hd 2h y los Hd 3h, respectivamente, los cuales no mostraron diferencias significativas con el control positivo Acarbosa, cuya inhibición fue de 81.04%. Con estos resultados se puede destacar que los péptidos obtenidos de la hoja de moringa presentan una actividad inhibitoria similar a la Acarbosa, por lo que se pueden ser viables para estudiar los péptidos como utilización alternativa para el tratamiento de la DM2. Además podría ser con menor cantidad que el medicamento, ya que se logró la inhibición con una cantidad baja de proteína ya que el IC_{50} se obtuvo en los Hd 2h y Hd 3h con una concentración de proteína de 0.127 mg/mL y 0.075 mg/mL, respectivamente. Esto podría significar que los péptidos no presenten el efecto adverso que a largo plazo llegan a presentar los medicamentos. Con esta concentración, también se puede decir que los péptidos obtenidos por Hd 3h mostraron mayor eficiencia, ya que se logró la inhibición de la enzima con la menor concentración de proteína. Los péptidos de hoja de moringa han mostrado mayor inhibición sobre esta enzima que lo que han reportado otros autores como Mojica et al. (2015). Ellos lograron inhibir la actividad de α -glucosidasa, con péptidos obtenidos por hidrólisis con pepsina-pancreatina por 2 h en un 68% (péptidos de frijol crudo, negro) y 60% (péptidos de frijol precocido, rojo) mostrando valores del $IC_{50} = 0.5$ mg/mL; lo cual demuestra que la inhibición con los péptidos de hoja de moringa es mayor. También lo reportado por Kang, Yi y Lee (2013), con el péptido N159-1 obtenido del hongo *Aspergillus oryza* por medio de hidrólisis con pepsina y ultrafiltración, obtuvieron una inhibición similar a lo reportado por Mojica et al. (2015), con un porcentaje de inhibición de 53.2% y un IC_{50} de 7.7 mg/mL.

6.4. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática

El ensayo de inhibición de la enzima lipasa pancreática, se realizó con las 3 muestras, el concentrado proteico, y los hidrolizados Hd 2h y Hd 3h, utilizando como control positivo, el medicamento comercial Orlistat. Se determinó la IC_{50} para conocer la concentración de proteína requerida para inhibir el 50% de dicha actividad enzimática. En el Cuadro 6 se muestran los

porcentajes de inhibición y la IC₅₀, y en las Figuras 7, 8 y 9 se muestran las curvas de obtención de la IC₅₀ por regresión lineal, para cada una de las muestras.

Cuadro 6 Inhibición de la enzima Lipasa pancreática y la IC₅₀

Muestras	Inhibición en lipasa (%)	IC ₅₀ mg/mL
Orlistat	78.43 ± 0.52a	ND
Concentrado proteico	61.76 ± 0.75 d	0.216
Hd 2h	69.89 ± 0.54 c	0.210
Hd 3h	74.94 ± 1.34 b	0.111

ND No determinado

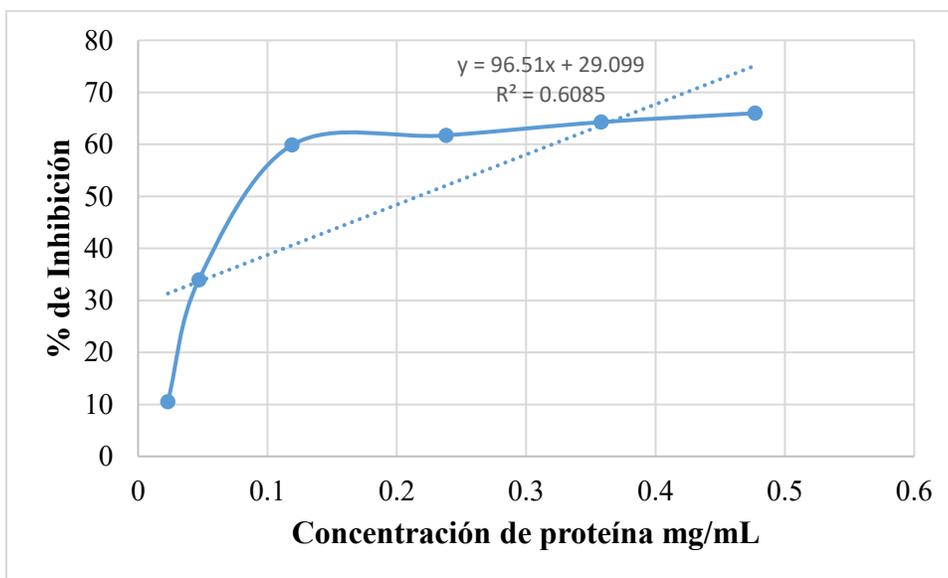


Figura 7 IC₅₀ de concentrado proteico para inhibición de lipasa pancreática

Donde se logró IC₅₀ con 0.216 mg de proteína/mL

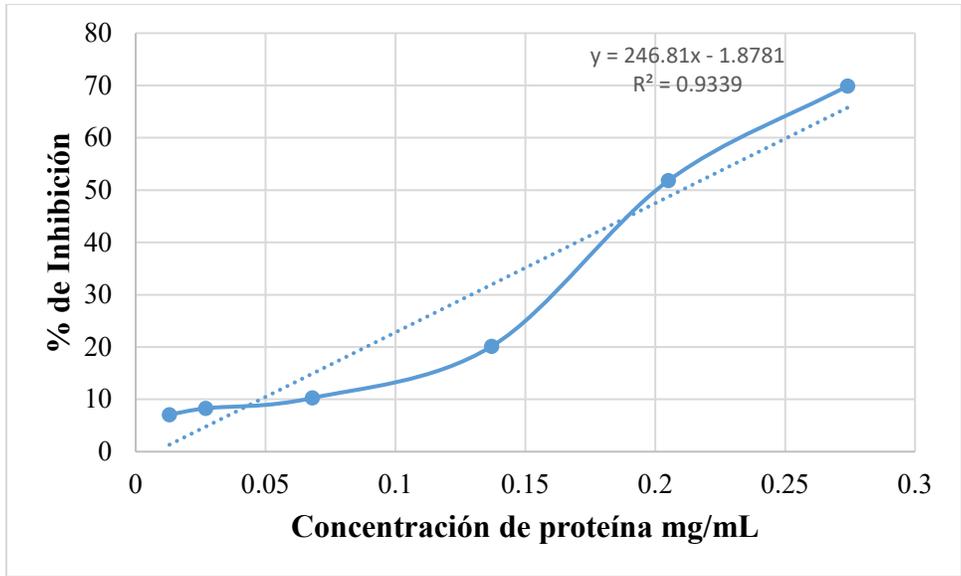


Figura 8 IC₅₀ de Hd 2h para inhibición de lipasa pancreática

Donde se logró IC₅₀ con 0.210 mg de proteína/mL.

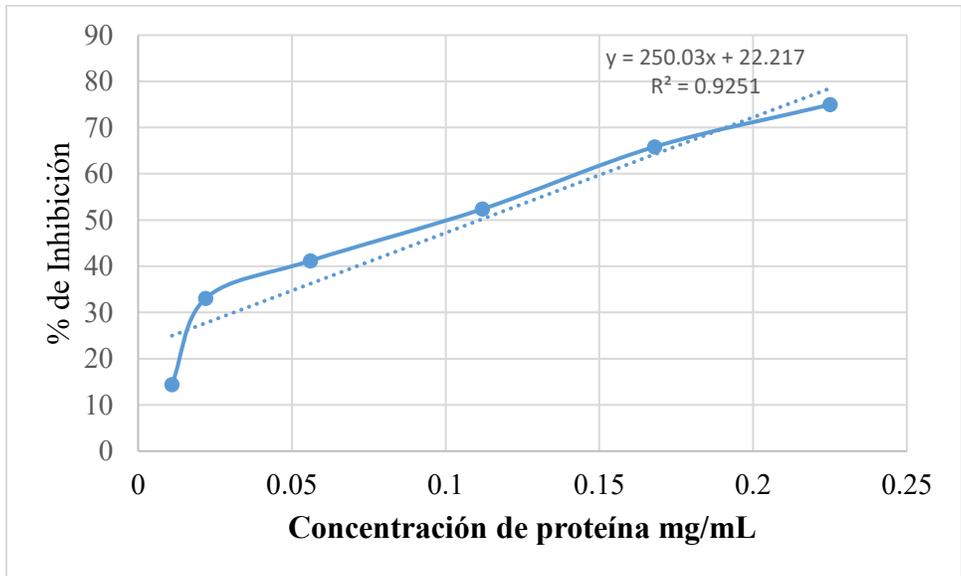


Figura 9 IC₅₀ de Hd 3h para inhibición de lipasa pancreática

Donde se logró IC₅₀ con 0.111 mg de proteína/mL.

Los péptidos obtenidos de hoja de moringa de Hd 2h y Hd 3h lograron inhibir la actividad de la enzima lipasa pancreática en un 69.89% y 74.94% respectivamente, mostrando valores de IC_{50} de 0.210 mg/mL y 0.111 mg/mL respectivamente. Aun cuando con el porcentaje de inhibición del medicamento Orlistat (78.43%), fue significativamente superior a lo obtenido con los péptidos, los péptidos de Hd 3h obtuvieron un porcentaje dentro de lo establecido para la inhibición de la enzima por este medicamento (70-80%). Los péptidos podrían ser una de las alternativas para el estudio de inhibición de lipasa. En nuestro conocimiento no existe información sobre la inhibición de esta enzima por la acción de los péptidos bioactivos, Esta enzima ha sido inhibida por extractos de polifenólicos de algunas planta como en un estudio realizado por Gutiérrez-Grijalva et al. (2019) con un extracto de polifenoles de orégano (*Hedeoma patens*). Dicho extracto de orégano fue sometido a digestión *in vitro*, y se obtuvo una inhibición de la actividad enzimática en la fase intestinal de 54.54%. También, en un estudio con extracto de polifenoles de cáscara de granada realizado por Colantuono, Ferracane y Vitaglione (2016), en una digestión *in vitro*, solo lograron inhibir el 13% a la actividad enzimática con una concentración de polifenoles de 0.578 mg/mL. Podemos inferir que hasta el momento los péptidos obtenidos de la hoja de moringa han mostrado mayor capacidad que los extractos de compuestos polifenólicos para inhibir la actividad de la enzima de lipasa pancreática. Por lo anterior se puede seguir el estudio de estos péptidos para la inhibición de la enzima. Ya que pueden ser más viables que los medicamentos, pues con menor cantidad de concentración de péptidos se logra la inhibición de esta enzima, podría ser un medicamento alternativo sin producir los daños adversos que llegan a producir los medicamentos a largo plazo.

6.5. Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

El ensayo de inhibición de ECA se realizó con el concentrado proteico, y los hidrolizados Hd 2h y Hd 3h, utilizando un control positivo el medicamento comercial para la inhibición de ECA (Captopril). Se determinó la IC_{50} para conocer la concentración de proteína requerida para inhibir el 50% de la actividad enzimática enzima. En el Cuadro 7 se muestran los resultados de inhibición

y la IC₅₀, mientras que en las Figuras 10, 11 y 12 se muestran las curvas de obtención de la IC₅₀ por regresión lineal, para cada una de las muestras.

Cuadro 7 Inhibición de ECA y la IC₅₀
Muestras **Inhibición en ECA (%)** **IC₅₀ mg/mL**

Captopril	92.72 ± 0.78a	ND
Concentrado proteico	84.34 ± 2.56b	0.213
Hd 2h	76.72 ± 2.10c	0.033
Hd 3h	76.00 ± 2.53c	0.013

ND No determinado

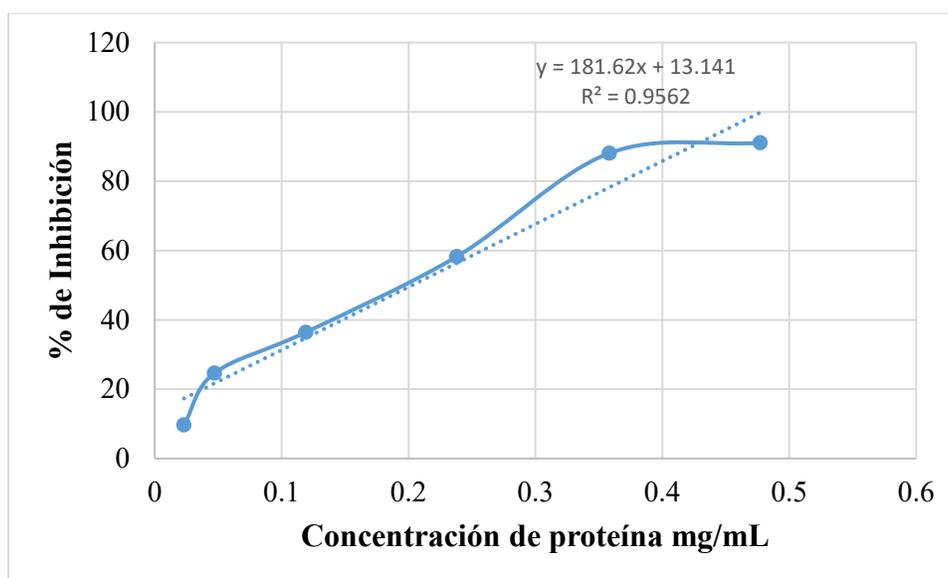


Figura 10 IC₅₀ para concentrado proteico para Inhibición de ECA

Donde se logró IC₅₀ con 0.202 mg de proteína/mL.

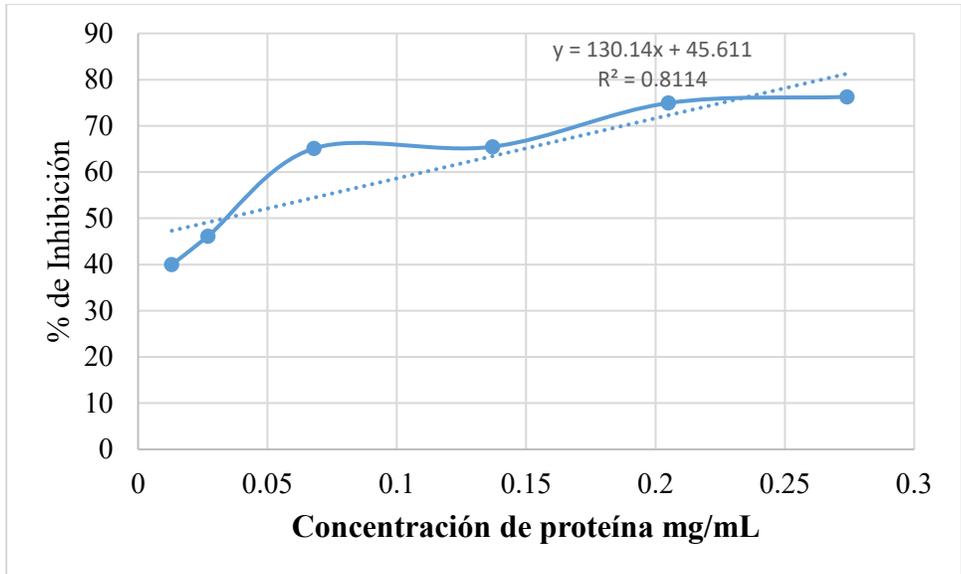


Figura 11 IC₅₀ de Hd 2h para inhibición de ECA

Donde se logró IC₅₀ con 0.033 mg de proteína/mL.

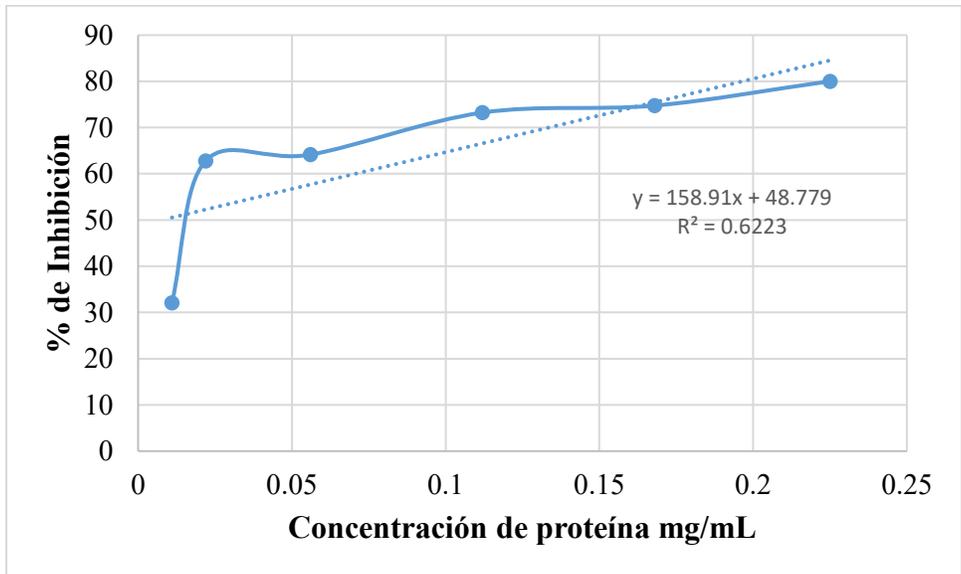


Figura 12 IC₅₀ de Hd 3h para inhibición de ECA

Donde se logró IC₅₀ con 0.0139 mg de proteína/mL.

Los péptidos obtenidos de la hoja de moringa por los Hd 2h y Hd 3h mostraron resultados de inhibición de 76.72 y 76.00%, y valores de la IC₅₀ con 0.033 y 0.013 mg/mL de proteína, respectivamente, pero el medicamento mostró mayor inhibición con un 92.72%. Además, fue posible observar que los péptidos mostraron menor eficiencia en la inhibición de la enzima que el concentrado proteico de (84.34%), aunque la IC₅₀ se encontró en una concentración mayor de proteína 0.213 mg/mL en comparación que la que requerida en los péptidos. Es importante resaltar que los valores obtenidos de la inhibición enzimática que se logró con los péptidos se encuentran dentro del intervalo de inhibición establecida para el medicamento que es del 70 al 85%. Por lo anterior los péptidos pueden ser una fuente viable de estudio para medicamento alternativo para inhibir a la ECA, ya que estos péptidos podrían no presentar efectos adversos a largo plazo por la concentración baja que se utiliza para inhibir a la enzima. Estos resultados de inhibición son similares a los publicados por Li et al. (2005), quienes reportaron que los péptidos producidos por hidrólisis enzimática con alcalasa por 2 h de frijol mungo presentaron una inhibición de ECA de 76.42%, y un IC₅₀ 6.2 mg/mL. Esto nos permite concluir que los péptidos de la hoja de moringa son mejores inhibidores de ECA que los reportados en el frijol mungo, es decir se logra un valor del IC₅₀ con menor cantidad de proteína. Por otro lado, las inhibiciones enzimáticas reportadas por González-Garza et al. (2017), con péptidos de semilla de moringa obtenidos por hidrólisis enzimática con tripsina-pepsina por 5 h, fueron mayores ya que mostraron un 79% de inhibición de la enzima ECA y con un IC₅₀ 0.226 mg de proteína/mL. Aunque la actividad de inhibición es mayor la concentración de proteína requerida para lograr la IC₅₀ es mayor que con los péptidos de la hoja de moringa. Ante esto, podemos inferir que los péptidos de hoja de moringa requieren menor concentración de proteína para producir la inhibición de la enzima y aun cuando sea menor la capacidad inhibitoria, que presentan sigue siendo relevante para la inhibición de la ECA.

6.6. Electroforesis 1D SDS-PAGE

Para el peso molecular se utilizaron la harina de la hoja de la moringa sin ningún proceso, y las muestras en dos concentraciones de contenido de proteína de 15 µg y 20 µg, para ver la separación

de la proteína del concentrado proteico y los hidrolizados de 2 y 3; como se muestra en la Figura 13:

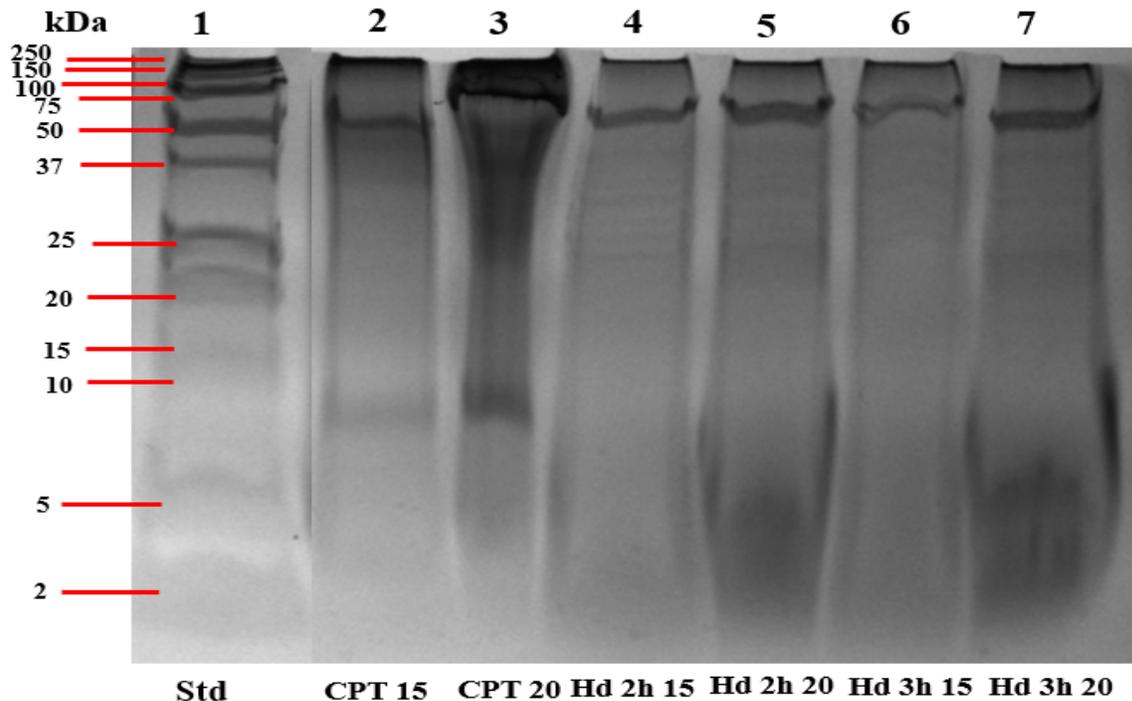


Figura 13 Gel de electroforesis. Las muestras carril 1: 5 μ L del estándar de pesos moleculares, carril 2: disolución con 15 μ g de proteína del concentrado proteico (CPT 15), carril 3: disolución con 20 μ g de proteína del concentrado proteico (CPT 20), carril 4: disolución con 15 μ g de proteína del Hd 2h (Hd 2h 15), carril 5: disolución con 20 μ g de proteína del Hd 2h (Hd 2h 20), carril 6: disolución con 15 μ g de proteína del Hd 3h (Hd 3h 15) y carril 7: disolución con 20 μ g de proteína de Hd 3h (Hd 3h 20). Se puede observar en los carriles de los Hd 2h 20 y Hd 3h 20 como se da la separación de la proteína y la mayor concentración de la proteína se encuentra en los pesos entre los 5 y 2 kDa.

Se lograron detectar en la muestra del concentrado proteico de 15 μ g de muestra (CPT 15 μ g), se lograron detectar los pesos moleculares de proteínas de 100, 50, 15 y 10 kDa. En la muestra de concentrado proteico de 20 μ g de muestra (CPT 20 μ g), se lograron detectar pesos moleculares de proteínas de 100, 50, 37, 15 10 y 5 kDa; en los péptidos Hd 2h con 15 μ g de muestra se produjo una separación de la proteína y se lograron obtener pesos moleculares de 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10, y 5 kDa. En relación a los péptidos Hd 2h con 20 μ g, se obtuvieron pesos moleculares de 100, 75, 50, 37, 25, 5 y 2 kDa; en los péptidos Hd 3h con 15 μ g de muestra se obtuvieron pesos moleculares de 100, 75, 50, 25, 15, 10 y 2 kDa; en los péptidos Hd 3h con 20 μ g de muestra se obtuvieron pesos moleculares de 100, 75, 50, 20, 10, 5 y 2 kDa. El primer peso destacado en todas

las muestras es el de 100 kDa; mientras en los carriles de las muestras con los hidrolizados con 20 μg de proteína se logra observar la mayor concentración de la proteína se encuentra en los pesos de 5 y 2 kDa. Pero, con lo establecido, se puede inferir que los péptidos menores a 5 kDa son los que muestran la mayor capacidad antioxidante, así como la mayor capacidad de inhibición de las enzimas. También podemos establecer que la muestra requiere otro proceso de filtración o de pureza para mejor visualización de las bandas de los pesos moleculares.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron péptidos por hidrólisis enzimática con pepsina-pancreatina los cuales mostraron un grado de hidrólisis >50%.

Los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con pepsina-pancreatina por 3 h mostraron la mayor capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS.

La hidrólisis enzimática por 2 y 3 h generó péptidos que lograron una inhibición enzimática de α -glucosidasa, sin presentar diferencias significativas con el control (Acarbosa).

Los péptidos hidrolizados por 3 h mostraron la mayor inhibición de actividad de lipasa, aunque no significativamente mayor que el medicamento Orlistat.

El concentrado proteico mostró una mayor inhibición de la enzima ECA aunque no mayor que el medicamento Captopril; sin embargo los péptidos lograron inhibir a la enzima en un margen que indica la literatura está dentro de la inhibición que produce el Captopril sobre esta enzima.

La inhibición de las enzimas α -glucosidasa, Lipasa y ECA se logró con una concentración baja de proteína.

Los péptidos obtenidos en su mayoría corresponden a los pesos de 2 y 5 kDa.

Los péptidos de hoja de moringa presentan capacidad antioxidante, así como inhibición de las enzimas α -glucosidasa, lipasa y ECA, y su mayoría son de peso molecular <5 kDa, por lo representan una viabilidad para ser estudiados para llegar a ser un medicamento alternativo para el tratamientos de las enfermedades crónico degenerativas con las que están relacionadas dichas enzimas.

8. RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos en el gel de electroforesis se recomienda que, para la obtención del concentrado proteico se realice un proceso que permita mayor purificación de proteínas, para lograr una mayor definición de las bandas que indican los pesos moleculares.

Se recomienda realizar la identificación de los aminoácidos presentes en los péptidos obtenidos.

Se recomienda realizar un ensayo de toxicidad de los péptidos obtenidos de la hoja de moringa, que mostraron capacidad antioxidante e inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa lipasa y ECA.

Se recomienda realizar ensayos *in vivo* con los péptidos de la hoja de moringa para poder determinar si los péptidos de hoja de moringa son eficientes para apoyar a contrarrestar los efectos de las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico o para coadyuvar con los medicamentos utilizados en el conjunto de estas enfermedades.

9. REFERENCIAS

- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S.T., Arvízu, S.M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., García-Almendarez, B., y Amaya-Llano, S.L. (2013) Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33 (2): 191-197.
- Aderinola, T.A., Fagbemi, T.N., Enujiugha, V., Alashi, A.M., y Aluko, R.M. (2018). Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysate, *Heliyon*, 4 (10): 1-17.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. *Elsevier*, London, 427 pp.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Paul Z. Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J-C., James, P. T., Loria, C. M., y Smith, S. C. (2009.). Harmonizing the Metabolic Syndrome. Joint Scientific Statement. (págs. 1640-1645.). Dallas, Texas.: Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>.
- Alfaro, V. y Martínez, W. (2006). Rendimiento y uso potencial de Paraíso Blanco, *Moringa oleifera* en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para la utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentaria-nutricional de Guatemala. *Proyecto Fodecyt.*, 26: 1-136.
- Álvarez-Dongo, D., Sanchez-Abanto, J., Gomez-Guizado, G., y Tarqui-Mamani, C. (2012). Sobrepeso y obesidad: prevalencia y determinantes sociales del exceso de peso en la población peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.*, 29 (3): 303-313.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC). (2018). Bone. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017: 471.
- Anwar F., Siddiq A., Iqbal S. y Rafique M. (2007). Stabilization of sunflower oil with *Moringa oleifera* leaves under ambient storage. *Journal of Food Lipids.*, 14:35-49.
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42, (2): 227-236.
- Bueno-Gavilá, E. (2017). Utilización de proteasas de *Cynara scolymus* L. para la obtención de péptidos bioactivos a partir de ovoalbúmina, caseína de leche. Murcia, España.: Universidad Católica de Murcia.
- Castillo-López, R.I., León-Félix, J., Angulo-Escalante, M.A., Gutiérrez-Dorado, R., Muy-Rangel, M.D., y Heredia, J.B. (2017). Nutritional and phenolic characterization of *Moringa oleifera* leaves grown in Sinaloa, México. *Pakistan Journal of Botany*, 49(1): 161-168.
- Cuéllar, O., y Sigüenza, N. (2019). Carbohidratos, biomoléculas carbohidratos. *UES-FMOcc* <https://sites.google.com/site/biomoleculascarbohidratos/polisacaridos>.
- Chang C., Yang M., Wen H., y Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal. Food Drug Analysis.*, 10: 178-182.

- Colantuono, A., Ferracane, R., y Vitaglione, P. (2016). *In vitro* bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies. *Food & Function*, 7: 4247–4258.
- Corona, A., Rocha, M., León, M., y Ozuna, C. (2017). Estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia para la obtención de péptidos bioactivos a partir de semillas de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma subsp. sororia*). *Jovenes en la Ciencia.*, 3: 1981-1985.
- Cuevas-Juárez, E., Yuriar-Arredondo, K.Y., Pío-León, J.F., Montes-Avila, J., López-Angulo, G., Díaz-Camacho, S.P., y 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.
- Darewicz, M., Dziuba, J., y Minkiewicz, P. (2007). Computational characterisation and identification of peptides for in silico detection of potentially celiac-toxic proteins. *Food science and technology international*, 13, 125-133
- Drent, M. L., Larsson, I., William-Olsson, T., Quaade, F., Czubayko, F., Strobel, W., y Sjöström, L. (1995). Orlistat (Ro 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19: 221-226.
- Ebrahimzadeh, M.A.; Ghasemi, K.; y Ghasemi, Y. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22: 277-281.
- Elizalde, A., Porrilla, Y., y Chaparro, D. (2009). Factors in eatable seeds. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7 (1): 45-54.
- Enríquez, R. (2013). Productos agroindustriales con alto valor nutricional en la Amazonía boliviana. *Tinkazos.*, 34: 119-131.
- Ezquerro, J.M., García-Carreno, F.L., Civera, R., Haard, N.F. (1997). pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157: 251-262.
- Fahey, J. (2005). *Moringa oleifera*: areview of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. Part 1. Recuperado el 14 de Enero de 2016, de *Trees life J.*: <http://www.tfljournal.org/article.php/20051201124931586>
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., y Greene, L.J. (1970). Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from *Bothrops jararaca* Venom. *Biochemistry*, 9 (13): 2583-2593.
- Foidl, N., Mayorga, L., y Vásquez, W. (1995). Utilización del marango (*Moringa oleifera*). *Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica"*, 1-4.
- Food and Drug. Administration. (28 de mayo de 2014). A veces, los medicamentos y el hígado no se llevan. Obtenido de FDA U.S. Food & Drug Administration: <https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ConsumerUpdatesEnEspanol/ucm399030.htm>
- Food and Drug. Administration. (14 de junio de 2016). La FDA refuerza las advertencias relacionadas con el riñón para los medicamentos para la diabetes canagliflozina (Invokana,

- Invokamet) y dapagliflozina (Farxiga, Xigduo XR). Obtenido de FDA U.S. Food & Drug Administration: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm507413.htm>
- Fox-Ira, S. (2017). Fisiología Humana, Capítulo 18: Sistema Digestivo. 14 Ed. McGraw-Hill,
- Fujita, H., Yamagami, T., y Ohshima, K. (2001). Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutrition Research*, 21: 1149–1158.
- García, J., y Alemán, J. (2014). Síndrome metabólico: una epidemia en la actualidad. *Revista Medica Hondureña*, 82 (3): 121-125.
- González-Garza, N., Chuc-Koyoc, J., Torres-Castillo, J., García-Zambrano, E., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., y Sinagawa-García, S. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal Food Scientists & Technologist*, 54 (13): 4268–4276.
- Gutiérrez-Grijalva, E., Antunes-Ricardo, M., Acosta-Estrada, B., Gutiérrez-Urbe, J., y Heredia, J.B. (2019). Cellular antioxidant activity and *in vitro* inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 116: 676-686.
- Guzmán, S. H., Zamarripa, A., y Hernández, L.G. (2015). Nutraceutical and nutritional quality of moringa leaf from trees of different height. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6: (2).
- International Diabetes Federation. (2017). IDF. Obtenido de Diabetes Atlas 8th edition: <https://www.idf.org/>
- Kang, M.G., Yi, S.H., y Lee, J.S. (2013). Production and Characterization of a New α -Glucosidase Inhibitory Peptide from *Aspergillus oryzae* NI 59-1. *Mycobiology*, 41 (3): 149-154.
- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, 41: 1961–1966.
- Karadag A., Ozcelik B., y Saner S. (2009). Riview of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2:41-60.
- Katzung, B.G., y Trevor, A.J. (2016). Farmacología básica y clínica, 13ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Keller, J., y Layer, P. (2005). Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*, 54(6): 1-28.
- Konrad, B., Anna, D., Marek, S., Marta, P., Aleksandra, Z., y Józefa, C. (2014). The evaluation of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV, α -glucosidase and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of whey proteins hydrolyzed with serine protease isolated from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20: 483-491.
- Korhonen, H., y Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lacroix, I., y Li-Chan, E. (2014). Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, 54: 39–48.
- Lanchero-Barrios, I. (2016). Estudio in silico e in vitro de compuestos inhibidores de la enzima lipasa pancreática: una contribución al reposicionamiento de fármacos antiobesidad. Universidad Nacional de Colombia, 9-18.
- Li, G-H., Liu, H., Shi, Y-H., y Le, G-W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 219–224.
- Lowe, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, 43(12): 2007-2016.
- Luna, B., y Feinglos, M.N. (2001). Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *American Family Physician*, 63:1747-56.
- Marrufo-Estrada, D.M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Hernández-Escalante, V. (2012). Angiotensin I-Converting Enzyme inhibition with protein hydrolysates from *Jatropha curcas*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46 (3): 385-92.
- Martínez-Castelao, A., Górriz, J., Sola, E., Morillas, C., Jover, A., Coronel, F., Navarro-González, J., y De Álvaro, F. (2012). Guías de práctica clínica y normativa legal en el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Revista Nefrología*, 32(4):419-26.
- Mauer-Díaz, K., Exaire-Murad, J.E., y Escalante-Acosta, B.A. (2001). Importance of angiotensin converting enzyme in coronary circulation. *SciELO*, 71 (4).
- Meisel, H., y FitzGerald, R. J. (2003.). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1289–1295.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., y Vioque, J. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1928-1932.
- Mojica, L., Chen, K., y González de Mejía, E. (2015). Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. *Journal of Food Science*, 80: 188-198.
- Moya-Zeledón, D., Madrigal-Sánchez, J.J., y Salazar-Sánchez, L. (2012). Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and its Association with Complications in Patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Acta Médica Costarricense*, 54 (2): 102-108.
- Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Kwak, C.J., Ikemura, K., Takaoka, M., Moriguchi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., y Matsumura, Y. (2006). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70:1118-1126.
- Nongonierma, A., y FitzGerald, R. (2016). Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides*, 79: 1–7.

- Organización Mundial de la Salud. (2008). Guías de ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: https://www.paho.org/mex/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=documentos-ops-y-oms&alias=424-guias-alad-de-diagnostico-control-y-tratamiento-de-la-diabetes-mellitus-tipo-2&Itemid=493
- Orqueda, M. E., Zampini, I. C., Torres, S., Alberto, M. R., Pino Ramos, L., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M. I. (2017). Chemical and functional characterization of skin, pulp and seed powder from the Argentine native fruit mistol (*Ziziphus mistol*). Effects of phenolic fractions on key enzymes involved in metabolic syndrome and oxidative stress. *Journal of Functional Foods*, 37: 531–540
- Power, O. J., Jakeman, P., y FitzGerald, R. J. (2012.). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44: 797–820.
- Roy, F., Boye, J., y Simpson, B. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43: 432–442.
- Saini, R. K., Shetty, N.P., Prakash, M. y Giridha, P. (2014). Effect of dehydration methods on retention of carotenoids, tocopherols, ascorbic acid and antioxidant activity in *Moringa oleifera* leaves and preparation of a RTE product. *Journal Food Science Technology*, 51: 2176–2182.
- Saito, K., Hao, J.D., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., y Nokihara, K. (2003). Antioxidative Properties of Tripeptide Libraries Prepared by the Combinatorial Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3668–3674.
- Samaranayaka, A., y Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods.*, 3: 229-254.
- Sevilla-Asencio, O., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L., y López-Martínez, L. (2013). Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa y α -amilasa de extractos acuosos de algunas especias utilizados en la cocina mexicana. *CienciaUAT*, 8(1): 42-47.
- Sewald, N., y Jakubke, H.D. (2002). Peptides: chemistry and biology. Wiley-VCH. <http://dx.doi.org/10.1002/352760068x>
- Shahidi, F., y Naczki, M. (2004). Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Inc. Boca Raton, *Fl. EUA*.
- Singh, S., y Singh, R.P. (2008). *In vitro* methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, 24(4): 392-415.
- Singleton V L., Orthofer R. y Lamuela 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.
- Sreelatha, S., y Padma, P.R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64 (4): 303-311.

- Suwailem, A. K., Tamimi, S., Omar, M. A., y Suhibani, M. S. (2006). Safety and Mechanism of Action of Orlistat (Tetrahydrolipstatin) as the First Local Antiobesity Drug. *Journal of Applied Sciences Research*, 2 (4): 205–208. Retrieved from <http://repository.ksu.edu.sa/jspui/handle/123456789/2280>
- Swain T. y Hillis W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 63-68.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevalos, y 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 and Analysis*, 669-675.
- Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) (2015). Boletín UAM. Obtenido de Comunicación social UAM: <http://www.comunicacionsocial.uam.mx/boletinesuam/050-15.html>
- Wang, W., y González de Mejía, E. (2005). A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*., 4: 63-78.
- Whitcomb, D., y Lowe, M. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(1): 1-17.
- Winkler, U. K., y Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138: 663-670.
- Wu, J., y Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35: 367–375.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., y Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111: 370–376.
- Yamamoto, N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, 43(2), 129–134.
- Yang R.Y., y Tsou, S. C. S. (2006). Enhancing Iron Bioavailability of Vegetables through Proper Preparation—Principles and Applications. *Journal International Cooperation*, 107-119.

10. ANEXOS

Anexo 1 Tabla de ECA

Reactivos	Muestra A (μL)	Muestra B (μL)	Muestra C (μL)
ECA (200 mU/mL)	-	-	10
HCl (1 M)	-	-	20
H-H-L (5 mM)	50	50	50
Inhibidor de ECA	20	-	20
Amortiguador (tetraborato 0.1 M, NaCl 0.3 M)	-	20	-
Incubar a 37 °C por 5 min.			
ECA (200 mU/mL)	10	10	-
Incubar a 37 °C por 30 min.			
HCl (1 M)	20	20	-
Quinolina 98%	150	150	150
BSC 99%	50	50	50
Incubar a 30 °C por 30 min. en oscuridad			
Etanol	150	150	150
Incubar a 30 °C por 30 min. en oscuridad			

Anexo 2 Poliacrilamida 30%

Componentes	Cantidad
Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Agua UP	100 mL

Anexo 3 Gel de poliacrilamida continuo 20 %, 0.75 mm

Componentes	Cantidad μL
Poliacrilamida	3,333.4
Agua UP	604.6
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1,000
SDS (sodium dodecyl sulfate) 10 %	40
PSA (Persulfato de amonio) 10 %	20
TEMED	2
Volumen total	5,000

Anexo 4 Amortiguador de electroforesis

Componentes	Concentración final	Cantidad
Tris base	25 mM	3.03 g
Glicina	192 mM	14.4 g
SDS	0.1 %	1 g
Agua UP		1 L

Anexo 5 Solución de teñido

Componentes	Cantidad
Azul de Comassie G-250	0.25 g
Metanol	45 mL
Ácido acético	10 mL
Agua UP	45 mL

Anexos 6 Solución de desteñido

Componentes	Cantidad
Metanol	50 mL
Ácido acético	150 mL
Agua UP	500 mL