

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DEL  
TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) MEDIANTE HIDRÓLISIS  
ENZIMÁTICA CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE,  
HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIHIPERTENSIVA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**ELISABETH MAGALY CERNA TRUJILLO**













**LIMA-PERÚ**

**2023**

## Document Information

Analyzed document	TESIS TARWI MAGALY CERNA_VF.docx (D156168077)
Submitted	2023-01-17 18:19:00
Submitted by	Rosana Chirinos
Submitter email	chiri@lamolina.edu.pe
Similarity	6%
Analysis address	chiri.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS VILLASANTE-MTAL_FINAL.docx</b> Document TESIS VILLASANTE-MTAL_FINAL.docx (D149812950) Submitted by: chiri@lamolina.edu.pe Receiver: chiri.unalm@analysis.arkund.com	 	46
<b>W</b>	URL: <a href="https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3055/Q04-O3-T-resumen.pdf?se...">https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3055/Q04-O3-T-resumen.pdf?se...</a> Fetched: 2023 01-17 18:18:49	 	4
<b>SA</b>	<b>Beneto.pdf</b> Document Beneto.pdf (D24945682)	 	3
<b>W</b>	URL: <a href="https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/232/1/VILLALOBOS%20RODRIGUEZ%20A...">https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/232/1/VILLALOBOS%20RODRIGUEZ%20A...</a> Fetched: 2020 03-24 06:17:51	 	1
<b>SA</b>	<b>URKUND PROYECTO DE INVESTIGACION PAULINA RODRIGUEZ BEGONIA 04052022.docx</b> Document URKUND PROYECTO DE INVESTIGACION PAULINA RODRIGUEZ BEGONIA 04052022.docx (D135487545)	 	1
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Grado-de-hidrolisis-del-plasma-de-sangre-de-bovino-hidroli...">https://www.researchgate.net/figure/Grado-de-hidrolisis-del-plasma-de-sangre-de-bovino-hidroli...</a> Fetched: 2021 03-11 21:48:54	 	3

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DEL TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIHIPERTENSIVA”**

Presentado por:

ELISABETH MAGALY CERNA TRUJILLO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS

Sustentada y aprobada antes el siguiente jurado:

---

Dra. Indira M. Betalleluz Pallardel  
PRESIDENTE

---

Dr. Luis A. Condezo Hoyos  
MIEMBRO

---

Mg. Sc. Silvia V. Melgarejo Cabello  
MIEMBRO

---

Dra. Rosana S. Chirinos Gallardo  
ASESORA

---

Dr. David C. Campos Gutiérrez  
CO-ASESOR

Lima- Perú  
2023

## **DEDICATORIA**

A mi alma máter, la UNALM,  
por ser mi hogar todos estos años.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a Dios por ser el motor de mi camino. En segundo lugar, a mis padres, Ana y Edmundo por guiarme a través de los años y apoyarme con mis estudios para sobresalir adelante.

A mi asesora y mi co-asesor, la Dra. Rosana Chirinos y el Dr. David Campos, por su constante apoyo durante la ejecución de este trabajo de investigación. También un agradecimiento especial a las técnicas Adelaida Pardo y Cinthya Huamán, del Instituto de Biotecnología área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

A mis compañeros de trabajo durante la tesis, a Andrés, Johana, Paola, Marianella, Mirtha y Carolina por su compañía, soporte durante la ejecución del presente trabajo.

A todas las personas que confiaron en mí con su aliento a terminar este gran desafío.

Al fondo Concytec - Banco Mundial por el financiamiento del proyecto “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora Fondecyt (Contrato N° 66-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV).

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1. GENERALIDADES SOBRE EL TARWI.....	4
2.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PRODUCCIÓN .....	4
2.1.2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y PROPIEDADES .....	5
2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRICIONAL DEL TARWI .....	7
2.1.4. CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI.....	9
2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	10
2.2.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS DE GRANOS Y SEMILLAS .....	11
2.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	13
2.3.1. PROPIEDAD ANTIOXIDANTE .....	14
2.3.2. PROPIEDAD ANTIHIPERTENSIVA .....	18
2.3.3. PROPIEDAD HIPOGLUCEMIANTE .....	23
2.4. ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS EN CONDICIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL .....	27
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	31
3.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS .....	31
3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....	32
3.3.1. MATERIALES .....	32
3.3.2. REACTIVOS .....	32
3.3.3. EQUIPOS .....	34
3.4. MÉTODO DE ANÁLISIS.....	35

3.4.1	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD, ACEITE Y PROTEÍNA TOTAL .....	35
3.4.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE .....	35
3.4.3	DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES .....	36
3.4.4	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS .....	36
3.4.5	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	37
3.4.6	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y EL VALOR IC <sub>50</sub> .....	38
3.4.7	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE .....	39
3.5.	METODOLOGÍA .....	42
3.5.1.	OBTENCIÓN DE LA HARINA DE TARWI DESAMARGADA Y DESGRASADA .....	42
3.5.2.	OBTENCIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI .....	43
3.5.3.	OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI.....	43
3.5.4.	ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI A LAS CONDICIONES DE DIGESTIÓN <i>in vitro</i> ...	48
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	49
3.7.	DISEÑO ESTADÍSTICO.....	50
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
4.1.	CARÁCTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA HARINA ENTERA, DESAMARGADA Y DESGRASADA Y DEL CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI .....	50
4.2.	HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI .....	52
4.2.1.	GRADO DE HIDRÓLISIS .....	52
4.2.2.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	57
4.2.3.	CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA .....	62
4.2.4.	CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE .....	67

4.3.	ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI A LAS CONDICIONES DE DIGESTIÓN <i>in vitro</i> ...	76
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>116</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición proximal del tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) .....	7
Tabla 2: Composición de aminoácidos de la fracción proteica de semillas de tarwi .....	8
Tabla 3: Porcentaje de alcaloides en grano de tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet).....	9
Tabla 4: Péptidos bioactivos obtenidos fuentes vegetales mediante hidrólisis enzimática	12
Tabla 5: Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos	14
Tabla 6: Enzimas y parámetros de hidrólisis enzimática para la obtención de hidrolizados proteicos a partir del concentrado proteico de tarwi .....	48
Tabla 7: Valores de humedad, contenido de aceite, proteína total y alcaloides totales de la harina entera, harina desamargada y desgrasada y el concentrado proteico de tarwi .....	50
Tabla 8: Grado de hidrólisis (por ciento) para cada tiempo de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas .....	53
Tabla 9: Capacidad antioxidante ABTS <sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) para cada tiempo de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas ...	58
Tabla 10: Inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina I o ECA (%) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática al concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas .....	63
Tabla 11: IC <sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la ECA para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas .....	66
Tabla 12: Inhibición de la enzima α-amilasa (por ciento) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas ...	68
Tabla 13: Inhibición de la enzima α-glucosidasa (por ciento) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas ...	71
Tabla 14: IC <sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la DPP-IV para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas .....	73
Tabla 15: Valores obtenidos para diferentes análisis durante la digestión in vitro del hidrolizado de tarwi con Alcalasa -Neutrasa a 180 minutos y Alcalasa 240 minutos .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales regiones productoras de tarwi en el Perú .....	5
Figura 2: Fases fenológicas del cultivo de tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) .....	6
Figura 3: Representación esquemática de la producción de hidrolizados proteicos mediante hidrólisis enzimática.....	11
Figura 4: Mecanismo secuestrador de radical del antioxidante.....	17
Figura 5: Mecanismos del sistema renina angiotensina y del sistema kinina-kallicreína y su interconexión a través de las reacciones catalizadas por la ECA .....	20
Figura 6: Detalle del centro catalítico de la ECA y de su interacción del sustrato .....	21
Figura 7: Estructura de la DPP-IV .....	25
Figura 8: Cinética unión (a) sustratos naturales de la DPP-IV y (b,c) potencial mecanismo de la inhibición de la DPP-IV .....	26
Figura 9: Flujograma para la obtención de concentrado proteico de tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet).....	44
Figura 10. Esquema experimental para la obtención de hidrolizados proteicos de tarwi .	50

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR PARA LOS MÉTODOS REALIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN .....	116
ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA GRADO DE HIDRÓLISIS POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	118
ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL GRADO DE HIDRÓLISIS POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO .....	124
ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS <sup>+</sup> POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	130
ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS <sup>+</sup> POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO .....	136
ANEXO 6: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS .....	141
ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ECA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	147
ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ECA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO .....	152
ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA IC <sub>50</sub> DE LA ECA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO .....	157
ANEXO 10: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC <sub>50</sub> DE LA ECA .....	159
ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	161
ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	167
ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	172
ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	177
ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV .....	179

ANEXO 16: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC <sub>50</sub> DE LA DPP-IV .....	180
ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL HIDROLIZADO SOMETIDO A CONDICIONES DE DIGESTIÓN <i>in vitro</i> .....	182
ANEXO 18: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC <sub>50</sub> DE LA ECA EN LA DIGESTIÓN <i>in vitro</i> .....	185
ANEXO 19: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC <sub>50</sub> DE LA DPP-IV EN LA DIGESTIÓN <i>in vitro</i> .....	189

## RESUMEN

Se evaluó las propiedades bioactivas *in vitro*: capacidad antioxidante, hipoglucemiante y antihipertensiva de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de un concentrado proteico de tarwi obtenidos mediante hidrólisis enzimática. Se trabajó con las enzimas comerciales Alcalasa®, Neutrasa® y Flavourzyme® considerando reacciones en una y dos etapas secuenciales. Los mayores valores del grado de hidrólisis (GH) se alcanzaron a los 240 min de reacción para todos los tratamientos evaluados; obteniéndose con la reacción secuencial Alcalasa-Flavourzyme el mayor valor (56.33 por ciento). Para todos los tratamientos, la capacidad antioxidante (CAOX) ABTS<sup>+</sup> aumentó a medida que progresó el tiempo de hidrólisis; obteniéndose los mayores valores con los tratamientos secuenciales Alcalasa, Alcalasa-Neutrasa y Alcalasa-Flavourzyme a 240 min (2.00, 2.01 y 2.18  $\mu\text{mol}$  equivalente trolox (TE)/mg de proteína, respectivamente). El efecto hipoglucemiante medido a través la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa alcanzó mayores valores en las reacciones secuenciales Neutrasa-Flavourzyme y Alcalasa-Neutrasa, ambos a 240 min de reacción (23.53 y 22.72 por ciento, respectivamente); en tanto para la inhibición  $\alpha$ -glucosidasa el tratamiento Neutrasa-Flavourzyme 240 min obtuvo el mayor valor (15.34 por ciento). Los mejores efectos antihipertensivos e hipoglucemiantes *in vitro* medidos a través de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) y la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), se obtuvieron con los tratamientos Alcalasa 240 min y la secuencia Alcalasa-Neutrasa 180 min con IC<sub>50</sub> de la ECA de 0.16 y 0.11mg/mL y con IC<sub>50</sub> para la DPP-IV de 2.14 mg/mL y 2.58 mg/mL, respectivamente. Al evaluar la estabilidad de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa 240 min y Alcalasa-Neutrasa 180 min frente a las condiciones de digestión gastrointestinales utilizando un modelo *in vitro* (hidrólisis con pepsina y pancreatina) se obtuvo al final de la digestión, valores CAOX de 2.92 y 3.02  $\mu\text{mol}$  TE/mg, IC<sub>50</sub> de la ECA de 0.17 y 0.13 mg/mL y valores IC<sub>50</sub> de la DPP-IV de 2.01 y 1.53 mg/mL, respectivamente; los resultados indican que el proceso digestivo *in vitro* tiende a potenciar las propiedades bioactivas evaluadas en los hidrolizados proteicos del tarwi producto de los péptidos presentes en los mismos.

**PALABRAS CLAVE:** péptidos, hidrólisis enzimática, concentración de inhibición, proteína, tarwi.

## ABSTRACT

The bioactive properties were evaluated *in vitro*: antioxidant, hypoglycemic and antihypertensive capacity of protein hydrolysates obtained from a tarwi protein concentrate obtained by enzymatic hydrolysis. It was worked with commercial enzymes Alcalase®, Neutrase® and Flavourzyme® considering one and two sequential reaction stages was evaluated. The highest degree of hydrolysis (DH) values were reached at 240 min of reaction in the treatments evaluated, obtaining with the sequential reaction Alcalase-Flavourzyme the highest DH value (56.33 percent). For all treatments, ABTS+ antioxidant capacity (AOX) increased as DH increased; obtaining the highest values with the sequential treatments: Alcalase-Neutrase and Alcalase-Flavourzyme 240 min (2.01 and 2.18  $\mu\text{mol}$  trolox equivalent (TE)/mg protein, respectively). The hypoglycemic effect measured through inhibition of the enzyme  $\alpha$ -amylase were achieved higher values in the sequential reactions Neutrase-Flavourzyme and Alcalase-Neutrase, both to 240 min of reaction (23.53 and 22.72 percent, respectively) as for inhibition  $\alpha$ -glucosidase, Neutrase-Flavourzyme 240 min treatment obtained the highest value (15.34 percent). The best antihypertensive and hypoglycemic effects *in vitro* measured through inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) were obtained with Alcalase 240 min, and the Alcalase-Neutrase 180 min sequence with ACE  $\text{IC}_{50}$  of 0.16 mg/mL and DPP-IV  $\text{IC}_{50}$  of 2.14 mg/mL and 2.58 mg/mL, respectively. When evaluating the stability of the hydrolysates obtained with Alcalase 240 min and Alcalase-Neutrase 180 min against gastrointestinal digestion conditions using an *in vitro* model (hydrolysis with pepsin and pancreatine) was obtained at the end of digestion, AOX values of 2.92 and 3.02  $\mu\text{mol}$  TE / mg,  $\text{IC}_{50}$  of the ACE of 0.17 and 0.13 mg / mL and  $\text{IC}_{50}$  values of the DPP-IV of 2.01 and 1.53 mg / mL, respectively, these results indicate that the digestive process *in vitro* tends to enhance the bioactive properties evaluated in the protein hydrolysates of the tarwi product of the peptides present in them.

**KEYWORDS:** peptides, enzymatic hydrolysis, inhibition concentration, protein, tarwi.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el estudio de los péptidos bioactivos, visto como componentes liberados por proteólisis, está siendo muy valorizado, pues además de aportar funciones nutricionales básicas, éstos pueden reducir el riesgo de enfermedades por las diversas actividades biológicas que se le atribuyen como: antimicrobiana, antihipertensiva, antitrombótica, hipocolesteromiante, inmunomoduladora, hipoglicémica, entre otras (Hernández-Ledesma *et al.*, 2006).

Betancur-Ancona *et al.* (2014) mencionan que la hidrólisis enzimática de las proteínas es una opción promisoriosa para modificar las propiedades biológicas y funcionales de las proteínas. Es uno de los métodos más comunes para obtener péptidos bioactivos además de la fermentación (Daliri *et al.*, 2017) ya que destacan por tener una amplia aplicación en la liberación de péptidos bioactivos multifuncionales (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020). Mora *et al.* (2018) indican que la vía más usual consiste en obtener péptidos bioactivos bajo condiciones de hidrólisis controlada a partir de proteínas alimentarias (aislados o concentrados proteicos) por medio de proteasas, actuando solas o en combinación. En los últimos años, hidrolizados proteicos, de diversas fuentes, con propiedades bioactivas han sido conducidos empleando proteasas comerciales destacando entre ellas: Alcalasa, Flavourzyme, Neutrasa, Corolasa, Papaína, entre otras (Aluko y Monu, 2003; Betancur-Ancona *et al.*, 2014; Coscueta *et al.*, 2016; Korczek *et al.*, 2018; Chirinos *et al.*, 2018). La hidrólisis enzimática presenta una notable selectividad de productos a través de rutas simplificadas de producción, baja o poca generación de péptidos amargos indeseables, alta calidad y productividad (Maluf *et al.*, 2019).

A la fecha las fuentes proteicas más estudiadas para la obtención de péptidos bioactivos, son las de origen vegetal (bajo la forma de concentrado/aislado proteico o a partir de un subproducto de la industria alimentaria), ello por ser una fuente más barata y más eco-amigable comparado a las proteínas de origen animal (León *et al.*, 2015; Colantoni *et al.*

2017). Así, en la búsqueda de potenciales fuentes proteicas vegetales de nuestra biodiversidad, nos encontramos con el tarwi (*Lupinus mutabilis*). El lupino, tarwi o chocho, es una leguminosa andina muy reconocida por el elevado contenido de proteínas que presenta (entre 41 a 51 por ciento), siendo incluso mayor que el de la soya (Gross, 1988 citado por Borja, 2014), el alto contenido proteico que presenta esta oleaginosa, resulta ser una ventaja dado que podría producir una mayor cantidad de péptidos bioactivos en comparación a otras fuentes de menor contenido en proteína. De otro lado, existen investigaciones donde se han evaluado propiedades bioactivas en hidrolizados de la familia *Lupinus*, lo que indicaría su potencial como fuente de péptidos bioactivos. Así se encuentra el estudio del efecto antihipertensivo de hidrolizados de la proteína del *Lupinus albus* empleando pepsina como proteína proteolítica (Boschin *et al.*, 2014a), también se encuentran la evaluación hipotensiva y antioxidante de hidrolizados proteicos del *L. albus* obtenidos con pepsina y pepsina-pancreatina realizada por Yoshie *et al.* (2004). Borja (2014), estudió la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de *L. mutabilis* empleando proteasas obtenidas por fermentación con *Bacillus sp* e Intiquilla *et al.* (2018a) exploraron las propiedades antioxidantes del hidrolizado proteico de *L. mutabilis* obtenido por hidrólisis con Alcalasa. Sin embargo, es aún limitada la información que aborde el potencial bioactivo del *Lupinus mutabilis* como fuente para la obtención de hidrolizados proteicos con propiedades multifuncionales. Por lo citado en párrafos anteriores y como alternativa para la valorización de este recurso, la presente tesis propone evaluar la obtención de hidrolizados proteicos a partir del tarwi con propiedades: antihipertensiva, antioxidante e hipoglucemiante, obtenidos mediante hidrólisis enzimática empleando proteasas comerciales de grado alimentario, con diferentes mecanismos de acción.

En función a lo expuesto, la presente tesis tuvo como objetivo general:

“Obtener péptidos a partir de un concentrado proteico de tarwi haciendo uso de enzimas proteolíticas de grado alimentario (Alcalasa, Flavourzyme y Neutrasa) y evaluar *in vitro*, sus propiedades antihipertensivas, hipoglucemiantes y antioxidantes”

Los objetivos específicos fueron:

Evaluar el proceso de hidrólisis de la proteína del tarwi, empleando las enzimas de grado alimentario: Alcalasa®, Flavourzyme®, Neutrasa® solas (una etapa de reacción) o en combinación (dos etapas de reacción secuencial); evaluar la propiedades antihipertensiva



(actividad inhibitoria de enzima convertidora de la angiotensina I, ECA), hipoglucemiante (actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y dipeptidil peptidasa IV, DPP-IV) y antioxidante (ABTS<sup>+</sup>) *in vitro* de los hidrolizados proteicos del tarwi y finalmente, evaluar la estabilidad de los hidrolizados proteicos del tarwi frente a la digestión gastrointestinal *in vitro*, a través de la determinación de capacidad antihipertensiva, hipoglucemiante y antioxidante *in vitro*.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. GENERALIDADES SOBRE EL TARWI**

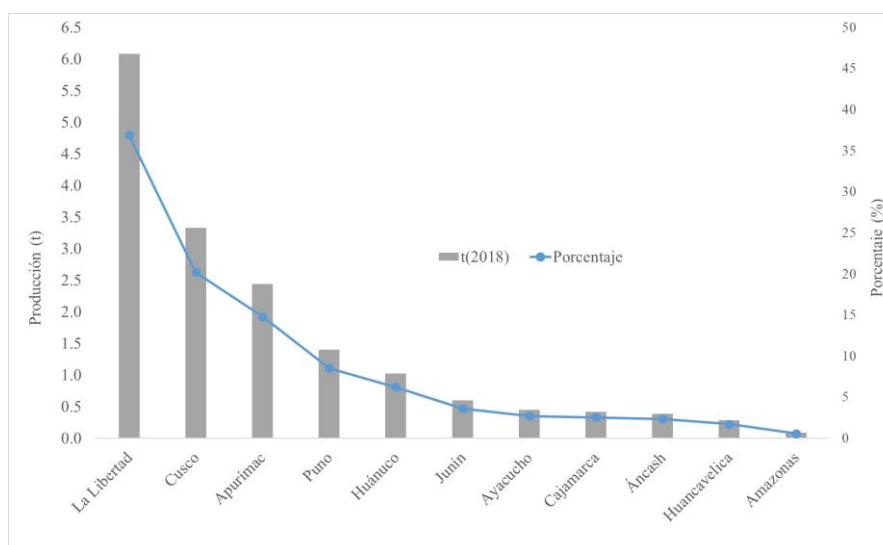
#### **2.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PRODUCCIÓN**

El tarwi es una leguminosa ampliamente cultivada en la Región Andina, crece desde Colombia hasta la Argentina, teniendo como principales productores a Perú, Bolivia y Ecuador. Se considera que este alimento, el cual probablemente se desarrolló de una mutación espontánea de una o más especies, puede florecer a los 4500 msnm, aunque su mayor distribución está en los niveles inferiores, entre los 2000 y 3500 msnm (Tapia, 2015). Asimismo, Tapia (2015) señala que, en el continente americano existen dos centros de mayor concentración de las especies del género *Lupinus*, éstos son: California en Estados Unidos, que constituye un centro de distribución en cuanto a número de especies y su diversidad, y los Andes Centrales, desde el sur de Colombia hasta el norte de Bolivia.

La capacidad de adaptabilidad a mayor altura se debería a genes con mayor resistencia al frío, mientras que los que se siembran a menor altura, resaltan importancia a su gran adaptabilidad agronómica en suelos infértiles, ellos pueden fijar nitrógeno atmosférico al suelo en grandes cantidades e influenciar en las condiciones nutricionales de éste, ser resistente a plagas y con requerimientos bajos en fertilizantes (Chávez y Untied, 1979; Gross, 1982; Jacobson y Mujica, 2006; ILC, 2005 citado por Ortega *et al.*, 2010; Tapia, 2015).

De acuerdo al MINAGRI (2018) La Libertad es la región con la mayor producción nacional de tarwi con 6083 toneladas, seguido de Cusco, Apurímac, Puno con: 3329, 2437 y 1401, respectivamente; éstos representan el 80 por ciento de la producción nacional (Figura 1). Las regiones que producen el resto porcentual del total nacional son Huánuco, Junín, Ayacucho, Cajamarca, Áncash, Huancavelica y Amazonas; éstas ubicadas en la extensión

de la Cordillera de los Andes.



**Figura 1: Principales regiones productoras de tarwi en el Perú**

FUENTE: Adaptado de MINAGRI (2018)

### 2.1.2. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y PROPIEDADES

El nombre común varía de acuerdo a las regiones, así se conoce como lupino, lupino amargo o chocho (Ecuador, Colombia y norte del Perú); tarwi o tarhui (nombre proveniente del quechua, llamado así en la parte central y sur del Perú); tauri (aymara, Puno y Bolivia); chuchus muti (del quechua, Cochabamba y Bolivia); otra denominación que se le ha dado en eventos internacionales es el de Andean lupin o pearl lupin (Tapia y Fries, 2007). El tarwi presenta la siguiente clasificación taxonómica (Camarena *et al.*, 2012).

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Clase: Dicotiledónea

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Tribu: Genisteae

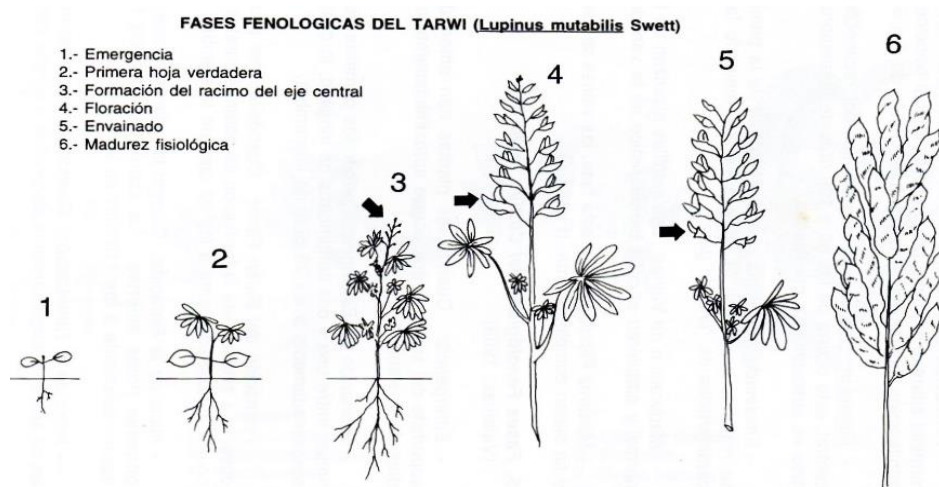
Género: *Lupinus*

Especie: *Lupinus mutabilis* Sweet

El tarwi, de acuerdo a Palacios *et al.* (2004), presenta una amplia variabilidad morfológica, de entre 300 a 400 especies, de las cuales las más representativas son:

- *Lupinus albus* o altramuz corriente (dulce)
- *Lupinus mutabilis* o tarwi, chocho (fuerte sabor amargo)
- *Lupinus arborous* (amargo)
- *Lupinus angustifolius* (dulce)
- *Lupinus luteus* (dulce)
- *Lupinus hispánicus* (dulce)

La planta de tarwi es una fabácea herbácea erecta, de raíz pivotante y profunda, pudiendo extenderse hasta los 3 metros. La maduración desigual dificulta la cosecha y se debe esperar que complete la maduración de las vainas. Su tallo puede variar de 0.5 a 2 m de altura teniendo una inflorescencia racimosa con flores zigomorfas, cálices bilabiados con corola grande de 1 a 2 cm, con alas, quillas y estandarte (cinco pétalos) de colores e intensidades distintas por lo general de amarillo, azul, púrpura a morado y rara vez blanco (Lezama, 2010; Gross *et al.*,1988). Las semillas pueden estar en número de 3 a 8 incluidas en una vaina y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), tamaño (0.5 a 1.5 cm) y colores como blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño y marrón (Aquino, 2018). En la Figura 2 se puede apreciar las fases fenológicas de una especie de *Lupinus*.



**Figura 2: Fases fenológicas del cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)**

FUENTE: Lescano (1994) citado por Tapia (2016)

La planta de tarwi presenta un gran potencial ornamental, pues en algunas especies sus flores cambian de color desde un azul claro hasta uno muy intenso, de ahí el nombre de la especie *mutabilis* (Chirinos-Arias, 2015).

### 2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRICIONAL DEL TARWI

La importancia de la semilla de lupino o tarwi radica en el alto contenido en lípidos y proteínas, que lo convierte en una fuente de valor nutricional alta, incluso más que la soya (Aguilar, 2015). La composición proximal del tarwi se detalla en la Tabla 1.

El contenido de grasa en el tarwi se encuentra en el rango de 17 y 23 por ciento, para la especie *L. mutabilis*, teniendo relevancia su aceite por su mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (oleico, linoleico y linolénico) que los ácidos grasos saturados (Kay, 1985 citado por Quispe, 2015).

**Tabla 1: Composición proximal del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)**

Componentes	Tarwi amargo	Tarwi desamargado
Proteínas (%)	47.80	54.05
Grasa (%)	18.9	21.22
Fibra (%)	11.07	10.37
Cenizas (%)	4.52	2.54
Humedad (%)	10.13	77.05
Alcaloides (%)	3.26	0.03
Azúcares totales (%)	1.95	0.73
Almidón (%)	4.34	2.88
K (%)	1.22	0.02
Mg (%)	0.24	0.07
Ca (%)	0.12	0.48
P (%)	0.6	0.43
Fe (ppm)	78.45	74.25
Zn (ppm)	42.84	63.21
Mn (ppm)	36.72	18.47
Cu (ppm)	12.65	7.99

FUENTE: Allauca (2005) citado por Delgado y Neira (2016)

Los carbohidratos totales representan el 26.1 a 28.2 por ciento de su peso, dentro de la cual los oligosacáridos representan su mayor composición (entre 7 a 15 por ciento), seguido del almidón (4.34 por ciento) (Quispe, 2015).

La fibra constituye entre los valores entre 7.1 a 13 por ciento (Camarena *et al.*, 2012). El mineral predominante en el tarwi es el calcio (0.48 por ciento), seguida del fósforo (0.43 por ciento) (Villacrés *et al.*, 2006); mientras que, entre los microelementos, sobresale el Fe (61 ppm), Zn (92 ppm), entre otros (Camarena *et al.*, 2012; FAO, 2016; INIAP, 2001).

Con respecto a la proteína, autores como Villacreses (2011) y Villaverde (2011) señalan que varía de 41.4 a 47.21 por ciento siendo ésta, rica en globulina y albúmina. Es deficiente en triptófano y con mayor cantidad de aminoácidos azufrados que la mayoría de leguminosas (Camarena *et al.*, 2012). En el estudio de Hove *et al.* (1978), citado por Suca y Suca (2016) se comparó diferentes leguminosas (tarwi, soya, frijol, lenteja) en las que se analizó entre otros aspectos, el perfil aminoacídico, llegando a concluir que todas tienen como limitante la metionina. Dicho aminoácido azufrado no es la excepción en la proteína del tarwi, siendo especial que esta planta sea rica en cisteína y lisina como se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2: Composición de aminoácidos de la fracción proteica de semillas de tarwi**

<b>Aminoácido</b>	<b>Semillas de tarwi cocidas y desamargadas (g/16 g N)</b>	<b>Semillas crudas de tarwi (g/16 g N)</b>	<b>Proteína de referencia FAO</b>
Isoleucina	5.3	4.8	4.0
Leucina	7.9	7.0	7.0
Lisina	5.6	5.9	5.5
Metionina	0.5	0.4	2.0
Cisteína	1.4	1.2	
Met+ Cys	1.9	1.6	3.5
Fenilalanina	4.2	4.3	
Tirosina	3.9	3.6	
Phe + Tyr	8.1	7.9	6.0
Treonina	3.6	3.8	4.0
Triptófano	0.7	0.7	1.0
Valina	4.5	4.2	5.0

FUENTE: Suca y Suca (2016)

El principal inconveniente para el fácil aprovechamiento proteínico del tarwi, es el contenido de alcaloides (en su mayoría del tipo quinolizidínicos) en las semillas, que le da un sabor amargo y que es necesario eliminar para el consumo humano. Diversos reportes datan valores entre 2.56 a 4.14 por ciento (Araneda, 2012), por lo que un proceso de desamargado del tarwi es recomendado como una alternativa para reducir el riesgo de intoxicación en caso de consumo. El tarwi contiene más de 70 tipos de alcaloides, entre los que destacan los grupos de la lupanina y esparteína (Rodríguez, 2009). Hatzold *et al.* (1983) citado por Suca y Suca (2016) afirman que, el tarwi presenta un contenido de 53.6 por ciento de lupanina (del total de alcaloides que presenta) acompañada en menor medida de la tetrahidrorombifolina, 4-hidroxlupanina y 13-hidroxlupanina. Jarrín (2003) por su parte, reporta el contenido de lupanina en un 60 por ciento, seguido en menor cantidad de 13-hidroxlupanina, esparteína, 4-hidroxylupanina e isolupanina (Tabla 3).

Extensos estudios sobre el desamargado de lupino/tarwi incluyen una etapa inicial de remojo de hasta 20 horas, seguido de una etapa de cocción (entre 0.5 y 6.0 h). Posterior a estas dos etapas, los alcaloides se pueden remover de forma biológica, química o acuosa; siendo esta última la forma más utilizada y comercial (Gutiérrez *et al.*, 2016).

**Tabla 3: Porcentaje de alcaloides en grano de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)**

Alcaloides	Porcentaje (%)
Lupanina	60.0
13-Hidroxlupanina	15.0
Esparteína	7.5
4-Hidroxlupanina	9.0
Isolupanina	3.0

FUENTE: Jarrín (2003)

#### **2.1.4. CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI**

En la actualidad, se ha descrito que las proteínas del tarwi, debido a que presentan valores muy altos de proteínas, pueden ser una alternativa de sustitución de la soya (Lampart *et al.*

2003) por lo que su empleo en aislados y/o concentrados proteicos en la alimentación humana pueden ser altamente demandados. Un concentrado proteico es aquel cuyo contenido de proteínas es mayor al 70 por ciento y que las proteínas constituyentes deben ser exactamente las que se encontraban en la fuente orgánica inicial (Laurent, 2016); para ello se realiza una serie de etapas, de donde se la extrae, a partir de harina desgrasada, previo descascarillado y pulverizado, con la posterior eliminación de compuestos solubles no proteicos, obteniendo un producto rico en azúcares insolubles y proteínas. Por su parte, los aislados proteicos contienen entre 80 y 90 por ciento de proteína. Los procesos de obtención de un concentrado y/o aislado se basan en la extracción alcalina y precipitación isoeléctrica (Khalid *et al.*, 2003), solubilizando las proteínas en medios de alta fuerza iónica y diluyendo, lo que permite la precipitación de las proteínas (Cordero de los Santos, 2005).

## **2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

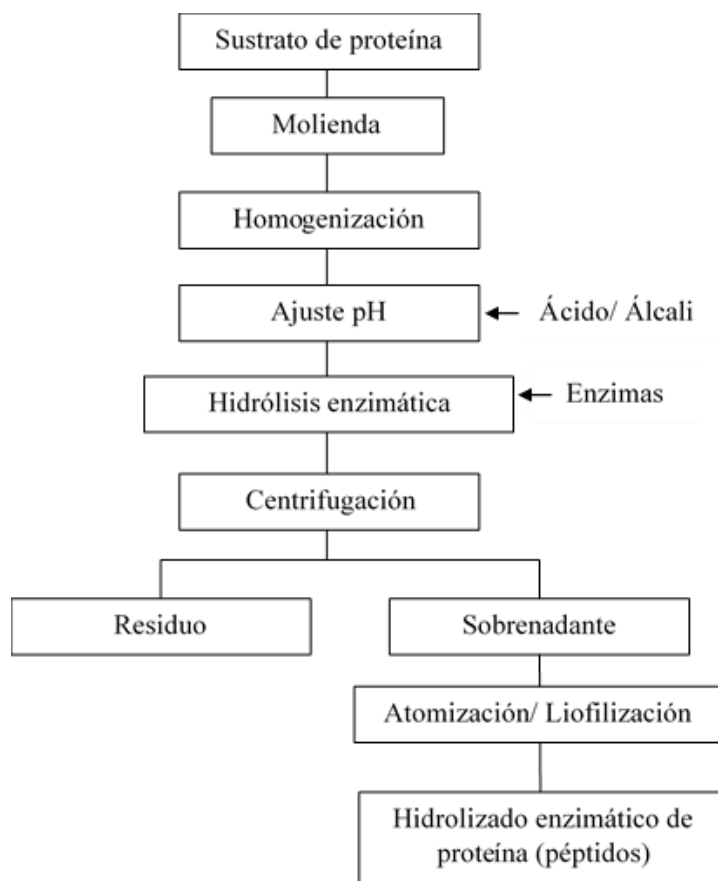
Los péptidos bioactivos son mezclas de fracciones proteínicas y cadenas peptídicas, que pueden ser encontrados en la composición de los alimentos, tal es el caso de la carnosina y anserina (dipéptidos ubicados en las carnes, huevos) o que pueden obtenerse por medio de diferentes procesos como la hidrólisis enzimática (Figura 3), fermentación, hidrólisis química, los que también pueden ser aplicados en proteínas alimentarias de origen animal y vegetal. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos, de escaso tamaño, entre 2-15 aminoácidos, inactivos dentro de la proteína intacta pero que, pueden activarse al ser liberados, bien durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado previo del mismo (Vioque y Millán, 2005).

Resulta entonces importante los diversos estudios que demuestran que, los péptidos bioactivos pueden provenir de cualquier proteína independiente de sus funciones y calidad nutricional, potenciando así el uso de proteínas de origen convencional, no convencional o subutilizadas tales como las provenientes de fuentes vegetales, residuos de pesquería, subproductos de la extracción de aceites, etc. (Ruiz *et al.*, 2013a).

Los péptidos, al ser liberados por hidrólisis (realizado por la digestión del organismo o por



otro proceso como el empleo de enzimas de grado alimentario) pueden ser absorbidos por los enterocitos y alcanzar el torrente sanguíneo desempeñando un efecto funcional más allá de aportar aminoácidos esenciales y aportar al metabolismo energético (Hartmann y Meisel, 2007).



**Figura 3: Representación esquemática de la producción de hidrolizados proteicos mediante hidrólisis enzimática**

FUENTE: Adaptado de Nasri (2016)

### 2.2.1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS DE GRANOS Y SEMILLAS

Las especies vegetales como granos y semillas han participado como fuentes de proteínas precursoras para la obtención de péptidos bioactivos, ya sea mediante el uso de enzimas durante el procesamiento de estos alimentos, digestión gastrointestinal o por procesos hidrolíticos específicos. Las enzimas proteolíticas como la Alcalasa, Flavourzyme, pepsina, pancreatina, papaína entre otras, han sido utilizadas para obtener péptidos bioactivos de vegetales (Sosa *et al.*, 2018). Dichos estudios y otros se detallan en la Tabla 4).

**Tabla 4: Péptidos bioactivos obtenidos fuentes vegetales mediante hidrólisis enzimática**

<b>Fuente vegetal</b>	<b>Péptidos</b>	<b>Tratamiento</b>
Garbanzo	Inhibidores de ECA	Diálisis diferencial, hidrólisis Alcalasa y ultrafiltración
Arroz	Inhibidores de ECA y antioxidantes	Alcalasa y posterior ultrafiltración
Trigo	Antioxidantes	Proteólisis activa y separación por ultrafiltración
Colza	Antioxidantes	Hidrólisis secuencial con tripsina, quimiotripsina y carboxipeptidasa A
Frijol Castilla	Inhibidores de ECA	Hidrólisis con Alcalasa, Flavourzyme, pepsina y pancreatina, separación por ultrafiltración
Semilla de cáñamo	Antioxidantes	Hidrólisis con Alcalasa
Maní	Inhibidores de ECA	Hidrólisis con Alcalasa, pepsina/pancreatina y separación con RPC
Amaranto	Inhibidores de ECA y antioxidantes	Hidrólisis con Alcalasa
Papa	Inhibidores de ECA y antioxidantes	Hidrólisis con Alcalasa, Neutrasa, Esperasa y posterior ultrafiltración
Maíz	Inhibidores de ECA	Digestión previa con amilasa, seguido de hidrólisis con Alcalasa y separación por ultrafiltración
Soya	Inhibidores de ECA	Hidrólisis con proteasa D3 seguido de separación RPC
Chía	Inhibidores $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa	Hidrólisis con Alcalasa y Flavourzyme
Quinoa	Inhibidores DPP-IV, $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa	Digestión pepsina-pancreatina y separación por ultrafiltración

FUENTE: Adaptado de García *et al.* (2013), Vilcacundo *et al.* (2017). RPC: Cromatografía en fase reversa por sus siglas en inglés

Es así, por ejemplo, Chirinos *et al.* (2018) identificaron péptidos en la semilla de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) con propiedades antioxidantes y antihipertensivas, obtenidos de la hidrólisis enzimática con Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme. La quinua (*Chenopodium quinoa*) registra propiedades biológicas antihipertensivas y antioxidantes (Campos *et al.*, 2012), así como hipoglucemiantes, al encontrar péptidos y polipéptidos a partir de la hidrólisis con papaína capaces de inhibir la enzima dipeptidil peptidasa IV (Nongonierma *et al.*, 2015). Trabajos en la kiwicha (semilla perteneciente a la familia *Amaranthaceae*), encontraron que al hidrolizarse con Alcalasa se incrementa la propiedad de captación de radicales libres en sus fracciones proteínicas (albúminas, globulinas y glutelinas) (Tironi y Añón, 2010).

Por otro lado, la soya, es una legumbre con alto contenido proteico, tiene la particularidad de que sus péptidos derivados hayan sido extensamente estudiados porque han demostrado que exhiben una variedad de propiedades funcionales entre las que destacan inmunomoduladores (Tsuruki *et al.*, 2003), antioxidantes (Xu *et al.*, 2006) y efectos hipocolesterolémicos (Tovar *et al.*, 2002). Asimismo, numerosas investigaciones existen sobre la actividad inhibitoria de la ECA en hidrolizados proteicos de soya, al analizar la mezcla de péptidos obtenidos del tratamiento con Alcalasa y posterior filtración, seguido del fraccionamiento en resinas de intercambio de cationes (Wu *et al.*, 2002). Barbana y Boye (2010) trabajaron con los hidrolizados de la proteína de garbanzo y guisantes empleando Alcalasa, pepsina, tripsina, quimiotripsina y papaína, reportando efectos antihipertensivos también relacionados con el efecto inhibitorio de la ECA.

### **2.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos bioactivos además de su papel nutricional, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema inmune, el sistema cardiovascular, el tracto gastrointestinal, etc. (Martínez y Martínez, 2006). Durante el proceso natural de la digestión gástrica e intestinal, las enzimas proteolíticas pueden liberar péptidos del seno de la proteína de origen, donde se encontraban inactivos y de esa manera actuar beneficiosamente, una vez liberados, en la consecutiva absorción intestinal (Ramos, 1995; citado por Borja, 2014). Se indica que su absorción intestinal es mejor que el de las proteínas intactas (Joye, 2019). Dicha absorción

circulación de los péptidos a través del torrente circulatorio, pueden seguir diferentes rutas, tales como se mencionan en la Tabla 5.

**Tabla 5: Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos**

<b>Ruta de transporte</b>	<b>Acción</b>	<b>Responsables</b>
Ruta paracelular	Difusión a través de las uniones entre células por un proceso de difusión pasiva independiente de energía	Péptidos grandes solubles en agua
Difusión pasiva	Difusión a través de un proceso de difusión pasiva transcelular independiente de energía	Péptidos hidrófobos
Vía transportadora	Salida de algunos péptidos del enterocito hacia la circulación porta a través de un transportador de péptidos localizado en la membrana basolateral intestinal.	Péptidos pequeños resistentes a hidrólisis
Endocitosis	Unión de las moléculas a la célula para su absorción hacia el interior de la célula vía vesiculización	Péptidos polares grandes
Sistema linfático	Absorción de péptidos del espacio intersticial hacia el sistema linfático intestinal	Péptidos altamente lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos por la circulación portal

FUENTE: Adaptado de Sarmadi e Ismail (2010)

### **2.3.1. PROPIEDAD ANTIOXIDANTE**

Los seres vivos, mantienen un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser

compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular (Dorado *et al.*, 2003). La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de ADN, aumento de la concentración de calcio intracelular, daño a proteínas, peroxidación de lípidos, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2007); además el daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes (Dorado *et al.*, 2003).

Se conoce que el exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO), que normalmente ocurre a causa de la oxidación metabólica de los organismos aeróbicos, pueden afectar a las enzimas, las membranas celulares y el material genético y, como consecuencia del daño se han relacionado diversas enfermedades, como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, así como el proceso de envejecimiento (Segura-Campos *et al.*, 2013) y diversas enfermedades crónicas. Bajo condiciones normales, el sistema antioxidante endógeno puede eliminar especies reactivas a través de los antioxidantes enzimáticos (como: el glutatión, el superóxido dismutasa, la catalasa) y los no enzimáticos (tales como las vitaminas, oligoelementos, cofactores) (Sarmadi e Ismail, 2010).

Por ejemplo, los radicales  $O_2^\bullet$ ,  $OH^\bullet$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobreproducidos en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y del miocardio, participan en la oxidación de la glucosa y en la glicación no enzimática de proteínas, lo cual se ha asociado al conjunto de anormalidades metabólicas que desencadenan en la diabetes (Aguilar, 2014). Ceriello (2008) menciona que la producción excesiva del radical  $O_2^\bullet$  en las células endoteliales pueden degradar al óxido nítrico y producir el radical libre  $ONOO^\bullet$ , que daña a las células endoteliales, dicho desequilibrio puede llevar a una vasodilatación reducida y con ello, contribuir al desarrollo de la hipertensión. Aguilar (2014), menciona que el exceso de oxidantes o especies reactivas tales como las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) pueden ser controlados con los antioxidantes que se adquieren de la dieta.

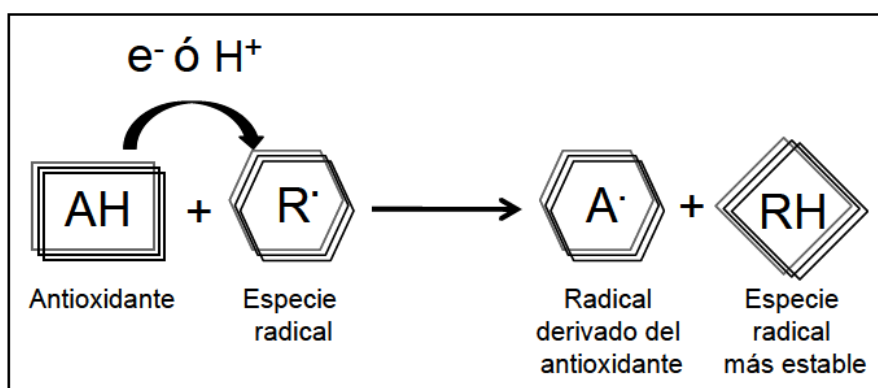
Entre los compuestos con propiedades antioxidantes se encuentran a los péptidos y que de acuerdo con Xie *et al.* (2008), poseen más ventajas que los antioxidantes enzimáticos; dado que presentan una estructura más simple y tienen más estabilidad en diferentes situaciones.

El potencial antioxidante de los péptidos radica en sus funciones reguladoras, tanto de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas como de las vías de señalización de éstas (Wen *et al.*, 2020) pero también en su actividad secuestradora de radicales libres, la quelación de metales demostradas al emplear ensayos *in vitro* y en modelos celulares (León *et al.*, 2015). Sobre el primero, los péptidos regulan la actividad de los antioxidantes endógenos, al eliminar los radicales libres y proteger las células contra el estrés oxidativo (Wen *et al.*, 2020). Las investigaciones empleando péptidos en la regulación de antioxidantes endógenos, a través de modelos establecidos de daños oxidativos, confirman su efectividad al incrementar las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa cuando se emplearon hidrolizados de tilapia (Wang *et al.*, 2013). Kong *et al.* (2012) observaron que los hidrolizados de la proteína de suero pueden inhibir eficazmente la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula MRC-5 aumentando la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

Los péptidos antioxidantes también pueden eliminar radicales libres activando las rutas de señalización de algunas vías antioxidantes, como por ejemplo la vía Nrf2-keap1 la cual al expresarse se mejora la capacidad de resistencia al estrés oxidativo de las células (Kensler *et al.*, 2007). Lo anterior mencionado se revela en los estudios de Tonolo *et al.* (2020) quienes al emplear péptidos de leche se logró proteger las células Caco-2 del daño oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activando la vía Nrf2-keap1, lo que permitió la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, tiorredoxina y tiorredoxina reductasa. Del mismo modo, Erdmann (2006) citado por Sánchez-Mendoza *et al.* (2016) observaron que con el dipéptido Metionina-Tirosina, obtenido de músculo de sardina, se previene el estrés oxidativo estimulando la expresión de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y ferritina en células endoteliales.

Entre los mecanismos de la actividad antioxidante de los péptidos también incluye la actividad secuestradora de radicales libres, la quelación de metales, entre otros (León *et al.*, 2015). Si se basa en el mecanismo de eliminadores/secuestrantes de radicales libres, se

debe tener como característica básica que el antioxidante debe generar un radical más estable y menos dañino después de reaccionar con las especies radicales libres de oxígeno y las especies reactivas del oxígeno (Ugartondo, 2009). Esta reacción según Ugartondo (2009) se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 4). La acción del péptido antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas -lípidos, proteínas, ADN, etc.- funcionalmente vitales o más importantes. De esta manera, se mantiene el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Avello y Suwalsky, 2006).



**Figura 4: Mecanismo secuestrador de radical del antioxidante**

FUENTE: Ugartondo (2009)

Las propiedades antioxidantes del péptido bioactivo se relacionan mucho con la estructura, composición e hidrofobicidad de dichos péptidos, la posición que ocupan en la secuencia del péptido y la estructura secundaria, que tiene un papel importante en la capacidad de las secuencias de péptidos para formar un radical estable (León *et al.*, 2015).

Reportes de péptidos con residuos de cisteína han demostrado un gran efecto antioxidante, otros incluyen residuos de aminoácidos como valina y leucina en el extremo N-terminal y residuos de prolina, histidina, tirosina, triptófano, metionina en sus secuencias (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016). Saito *et al.* (2003) demostraron la efectividad de péptidos antioxidantes de la soya a partir de composición de los tripéptidos que contienen residuos de triptófano o tirosina en el extremo C-terminal con fuerte actividad captadora de

radicales pero débil actividad frente al radical peroxinitrito; por otro lado, los tripéptidos que contienen cisteína sí demostraron actividad secuestrante de este radical.

Otros ejemplos de péptidos antioxidantes son como los encontrados en el frejol sometido a hidrólisis enzimática con Alcalasa y Flavourzyme, cuyos péptidos demostraron actividad secuestradora del radical DPPH y poder reductor del hierro (Herrera-Chalé *et al.*, 2014). Gu *et al.* (2015) encontraron en los hidrolizados con pancreatina de la semilla *Juglans sigillata* péptidos de 2 a 4 residuos ricos en cisteína y tirosina, con poder secuestrador de radicales ABTS, oxígeno y gran quelación de hierro. Por su parte, en los hidrolizados de la semilla de maní con Alcalasa se demostró que sus péptidos de bajo peso molecular (< 3 kDa) mostraron un mejor poder reductor que los de mayor PM (> 3 kDa) además que los aminoácidos hidrofóbicos de estos péptidos le conferían la mayor capacidad antioxidante (Ji *et al.*, 2014).

### **2.3.2. PROPIEDAD ANTIHIPERTENSIVA**

La hipertensión arterial es la elevación patológica de la presión que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre los vasos sanguíneos (Hong *et al.*, 2003) y está asociada con daño en las arterias y en diversos parénquimas (conglomerados de células de igual diámetro formando meatos o canales en el cuerpo entre sí y que pueden elaborar y almacenar sustancias) (Torruco-Uco *et al.*, 2008). La hipertensión por ende involucra un padecimiento multifactorial que puede dañar órganos vitales tales como el corazón, el cerebro, retina y riñón, por lo que está considerada como un problema importante de salud pública (Velásquez *et al.*, 2003).

El sistema renina angiotensina (SRA), uno de los mecanismos que controlan la presión arterial, es llevada a cabo por el sistema de control renal de los líquidos corporales de lo que forman también parte el sistema cinina-calicroína (kinina-kalikreína). Estos sistemas generan diversos péptidos vasorreguladores que, de forma colectiva y a través de su unión a receptores específicos localizados en diferentes tejidos, modulan la presión, los fluidos y el balance de electrolitos (Fernández, 2015). El SRA regula la función renal y cardiovascular y su funcionamiento, de acuerdo a Carey y Siragy (2003) citado por Fernández (2015) es así, cuando la presión arterial disminuye, se libera al torrente



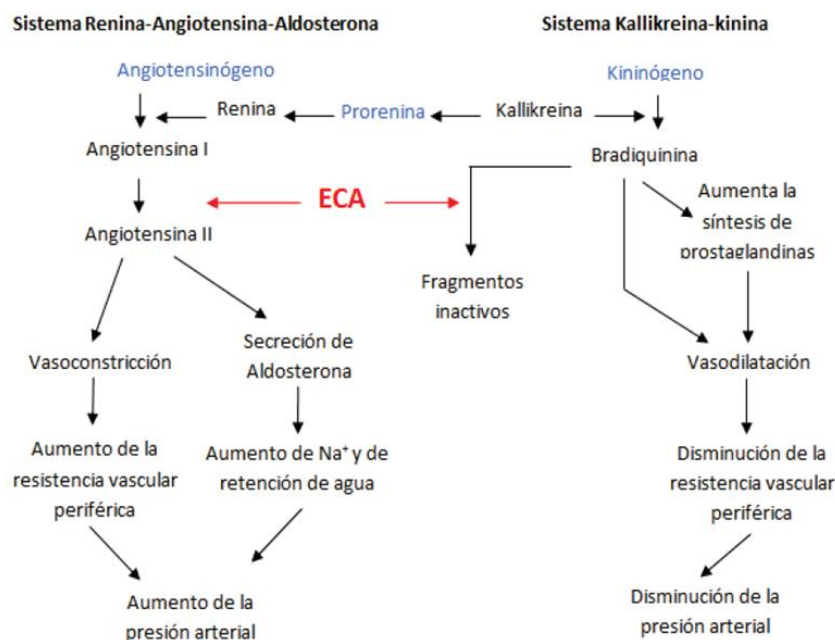
sanguíneo la renina, proteasa sintetizada en el aparato yuxtaglomerular del riñón; en los vasos sanguíneos, la renina actúa sobre el angiotensinógeno (una alfa globulina de 14 aminoácidos) sintetizado en el hígado, liberando un decapeptido, la angiotensina I (que al parecer no tiene actividad fisiológica), luego se escinde el dipéptido carboxilo terminal de la angiotensina I por acción de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y se convierte en angiotensina II, el más potente vasoconstrictor (Ibáñez, 2010), lo que ocurre a nivel del lecho vascular pulmonar.

La angiotensina II actúa en varios tejidos mediante la unión selectiva a dos subtipos de receptores acoplados a la proteína G: el receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) (Fernández, 2015). La casi totalidad de las funciones de la angiotensina II se lleva a cabo interactuando con el receptor AT1, estas funciones están vinculadas con la estimulación de secreción de vasopresina, estimulación de la sed, vasoconstricción, estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal y modula la excreción renal de  $\text{Na}^+$  (Ruiz *et al.*, 2013b). La interacción con el receptor AT2 aporta a funciones aún desconocidas, aunque actualmente hay evidencias de que juega un rol en la regulación del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y regeneración de tejidos nerviosos (Steckelings *et al.*, 2005).

Conociendo los componentes de la cascada del SRA, se han planteado medicamentos que luchan contra la hipertensión. La interferencia de la cascada del SRA, a nivel de la renina, de la enzima convertidora y de los receptores de angiotensina II, originan tres grupos de antihipertensivos: los inhibidores de reninas, los inhibidores de la ECA y los antagonistas de los receptores de angiotensina II (Ibáñez, 2010). La renina es la enzima que cataliza el primer paso del SRA, por lo que su inhibición podría suponer un descenso de los niveles circulantes de angiotensina I; esta misma analogía ocurre con los siguientes puntos de la cascada. Al inhibir la acción de la ECA, disminuye los niveles de angiotensina II y más debajo de la cascada, los antagonistas de los receptores AT1 bloquean la respuesta desencadenada por las proteínas G acopladas a dichos receptores, impidiendo la vasoconstricción asociada (Fernández, 2015).

En el mercado farmacéutico existen medicamentos que inhiben a la ECA, los diuréticos y también los bloqueadores de los receptores de angiotensina II. No obstante, una de las

desventajas que presentan estas sustancias sintéticas es que pueden producir ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo en su uso como la tos, perturbación en el sabor y salpullidos en la piel (Atkinson y Robertson, 1979 citado por Torruco-Uco *et al.*, 2008). Una de las formas de evaluar las propiedades antihipertensivas de diversas moléculas, entre ellos los péptidos, es a través de la medida de la inhibición de la ECA. La ECA o kininasa II, es una peptidil carboxipeptidasa (EC 3.4.15.1) que se encuentra en su mayor parte (90 por ciento) como ectoenzima ligada a membranas en células endoteliales (Espejo, 2012) y está ubicado en múltiples zonas del organismo como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino (Vioque *et al.*, 2000). Puede actuar como una endoenzima y exoenzima dependiendo de la naturaleza del sustrato (Sturrock *et al.*, 2004 citado por Ramos, 2016). La ECA posee dos dominios (terminal amino y carboxilo) de las que se ha reportado que inhibiendo el terminal amino no logra un impacto en la regulación de la presión, en cambio atacando al terminal carboxilo, es suficiente para controlar la presión sanguínea, de ahí que todos los medicamentos inhibidores atacan a este sitio (Liu *et al.*, 2020). En la actualidad, se han probado péptidos que funcionan como inhibidores de la ECA, evitando la conversión de la angiotensina I en la potente vasoconstrictora: la angiotensina II y a la vez aumentando los niveles de la bradiquinina vasodilatadora (Figura 5).

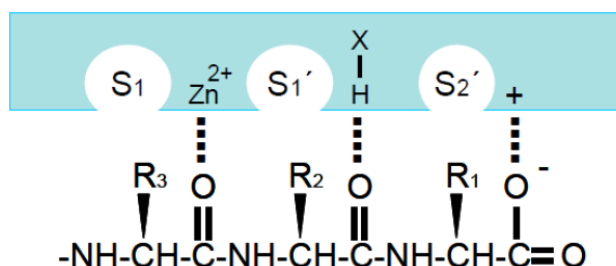


**Figura 5: Mecanismos del sistema renina angiotensina y del sistema kinina-kalicreína y su interconexión a través de las reacciones catalizadas por la ECA**

FUENTE: Ruiz *et al.* (2013b)

El mecanismo de estos inhibidores resalta en que se unen al sitio activo de la ECA compitiendo con la angiotensina I por ocuparla, lo que trae como consecuencia la inhibición del ECA y un descenso de los niveles de angiotensina II (Arnoldi *et al.*, 2015).

Los sustratos peptídicos de la ECA se unen al centro activo de la enzima, a través del tripéptido C-terminal. En dicho centro activo, la cual está dividido en tres subunidades o subsitios S1, S1', S2' (Figura 6), donde específicamente interaccionan las cadenas laterales de los aminoácidos. El subsitio S1 presenta una buena afinidad con las cadenas aromáticas, el subsitio S1' no interacciona de forma efectiva con la prolina y el subsitio S2' no acepta las cadenas ácidas de los aminoácidos dicarboxílicos. Es más, en el centro activo de la enzima existe un grupo cargado positivamente que forma un enlace iónico con el grupo C-terminal del sustrato cargado negativamente lo que provoca el alineamiento correcto del tripéptido C-terminal del sustrato con los subsitios. El ion  $Zn^{2+}$ , fuertemente unido a la ECA, se localiza entre los subsitios S1 y S1' y participa en la hidrólisis del enlace peptídico entre los residuos antepenúltimo y penúltimo del sustrato, liberándose el dipéptido C-terminal (Cushman *et al.*, 1981 citado por Fernández, 2015).



**Figura 6: Detalle del centro catalítico de la ECA y de su interacción del sustrato**

FUENTE: Fernández (2015)

Cheung y Cushman (1973) citado por Torruco-Uco *et al.* (2008) enfatizaron la importancia de los tres últimos residuos de aminoácidos en el grupo C-terminal tanto para los sustratos como para los inhibidores que pueden interactuar con tres regiones del centro activo de la ECA. Con respecto a los inhibidores que Cheng y Cushman (1973) analizaron en el veneno de serpiente *Bothrops jaracaca*, notaron que todos presentaron un residuo de Prolina (Pro) en la penúltima posición de la molécula del grupo C-terminal. No por ello, se debe generalizar que la capacidad antihipertensiva se deba solo a este aminoácido, porque

también se han demostrado que la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos y ramificados) en su grupo C-terminal determina el efecto sobre la inhibición de la ECA (Kuba *et al.*, 2003). Cheung *et al.* (1980) citado por Ramos (2016) agregan que la carga positiva de arginina o lisina contribuyen a la potencia inhibidora de la ECA, así como la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o prolina como penúltimo aminoácido puede disminuir incluso anular la actividad inhibitoria de la ECA.

El extremo N-terminal también influye en la capacidad antihipertensiva, de modo que la presencia de valina o de isoleucina en esta posición incrementa el potencial inhibitorio de la ECA en el péptido. La longitud del péptido, es considerado otro factor clave la inhibición de la ECA, aludiendo a que cuanto menor longitud, mayor es su función inhibidora (Ramos, 2016).

Por otro lado, un mecanismo por el cual también los péptidos pueden disminuir los niveles de presión arterial se debe a que algunas secuencias de péptidos tienen la capacidad para quelar minerales, los cuales pueden formar sales solubles de fosfato y facilitar la absorción del calcio al impedir su precipitación en el intestino. El consumo de una dieta rica en calcio ha sido relacionado con una disminución de la presión arterial (Quirós del Bosque, 2007).

Estos péptidos antihipertensivos se pueden encontrar en las proteínas de varias especies vegetales ampliamente consumidos tales como la soya, trigo, maíz, arroz que han demostrado efecto inhibitorio de la ECA cuando sus péptidos derivados se suministraron en ratas mediante ensayos *in vivo* (Martínez-Maqueda *et al.*, 2012), indicando que la mayoría de éstos presentaban cadenas cortas de entre 2 a 12 aminoácidos o que contenían residuos de prolina, lisina y arginina en el extremo C-terminal.

Por consiguiente, el uso de péptidos antihipertensivos resulta de importancia general, existiendo ya en el mercado diversos productos como el Evolus®, siendo éste el primero en ser comercializado en Finlandia en el año 2000 o el Vita de Kaiku® en España, que básicamente son leches fermentadas por diferentes especies de lactobacilos que actúan sobre la caseína, el principal componente de la leche (Jauhiainen *et al.*, 2002). La acción antihipertensiva se ha debido a la presencia de los tripéptidos formados por Val-Pro-Pro

(VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) los cuales han demostrado su efectividad para bajar la presión arterial en humanos después de entre 2 a 7 semanas de consumir el producto (Rasmussen, 2005).

### **2.3.3. PROPIEDAD HIPOGLUCEMIANTE**

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2, diabetes no insulino dependiente) es una enfermedad crónica y progresiva que se caracteriza por la resistencia de los tejidos periféricos a los efectos metabólicos de la insulina o por un defecto en la secreción de insulina por parte del páncreas o la suma de ambos factores (Pérez y Sainz de Vicuña, 2016). La hiperglicemia postprandial es una de las primeras anormalidades detectables en pacientes con DM2, así como ser la responsable en inducir el estrés oxidativo que se reconoce como un vínculo fisiopatológico entre las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Raju *et al.*, 2010).

Una alternativa tradicional para el tratamiento de esta enfermedad es la de reducir en el paciente la absorción de carbohidratos para su posterior hidrólisis en azúcares empleando inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Romo, 2013). Las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa se encargan de hidrolizar los oligosacáridos de la dieta en disacáridos y monosacáridos, los que posteriormente son absorbidos en el intestino hacia el torrente sanguíneo. Al inhibir a estas enzimas, se retarda, pero no se impide la absorción de los carbohidratos ingeridos, se reducen los niveles de insulina y de glucosa postprandial, y, por lo tanto, se controlan y/o retardan las complicaciones debidas a la hiperglucemia (Andrade *et al.*, 2008).

De acuerdo a Pinto *et al.* (2015), la enzima  $\alpha$ -amilasa se encarga de hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) de almidón a través de un mecanismo de doble desplazamiento de forma secuencial que involucra los residuos catalíticos D197, E233 y D300, las cuales actúan activamente durante la glucosilación. El péptido hipoglucemiante participaría como inhibidor competitivo de la  $\alpha$ -amilasa uniéndose al sitio activo de dichos residuos para dificultar las interacciones catalíticas con cualquier molécula de almidón entrante (Yap y Gan, 2020). Es más, el péptido también podría ejercer su función inhibidora de forma no competitiva ya que según Ibrahim *et al.* (2018), puede unirse alostéricamente a la  $\alpha$ -

amilasa para alterar la conformación del bolsillo de unión del sustrato y así, no interactuaría necesariamente con ninguno de los residuos catalíticos en mención.

Por otro lado, la enzima  $\alpha$ -glucosidasa escindiría aún más el producto de la hidrólisis de  $\alpha$ -amilasa a través de un mecanismo de doble desplazamiento, similar al mecanismo catalítico de  $\alpha$ -amilasa, donde D518, D616 y W516 son los residuos catalíticos para producir  $\alpha$ -D-glucosa que es absorbida por el intestino (Yap y Gan, 2020). Se ha estudiado que los péptidos inhibidores de esta enzima pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos catalíticos mencionados (Jiang *et al.*, 2018) así como también pueden unirse a las subunidades del sitio activo de la enzima posibilitando su inhibición (Wang *et al.*, 2018).

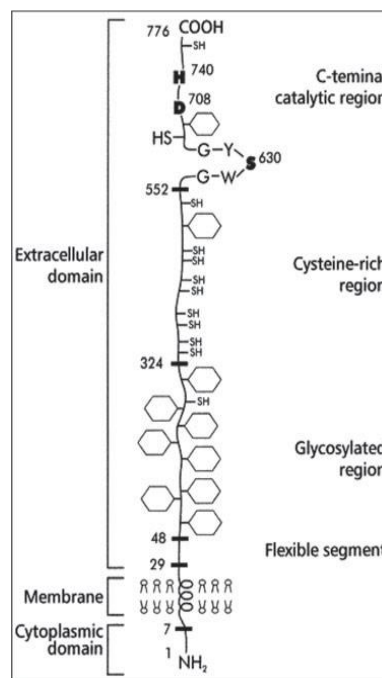
Por consiguiente, los péptidos hipoglucemiantes inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa presentan efectos positivos al reducir niveles de glucosa. Es así que encontramos en los provenientes de especies vegetales tales como *Momordica charantia*, *Gymnema silvestre*, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge y las gomas guar (Tránsito-López, 2006) péptidos que ofrecen una buena estrategia para controlar la hiperglucemia y proporcionar beneficios sin los efectos adversos de los fármacos como hipoglucemia, hepatotoxicidad, acidosis láctica, que traen como consecuencia daños en órganos y tejidos que no fueron afectados por la enfermedad, conduciendo a una progresión acelerada de la enfermedad (Wan *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los últimos años se han propuesto nuevas estrategias para tratar la DM2, debido que al tratamiento con medicamentos convencionales deja sin tratar otros aspectos importantes como la reducción de la sensibilidad de las células beta a la glucosa, el incremento de la producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis, a causa de un incremento en la secreción de glucagón. Además, los tratamientos convencionales suponen un serio riesgo de inducir episodios de hipoglucemia (Pérez y Sainz de Vicuña, 2016). Por ende, la mayoría de estas estrategias se centran en el uso de terapias de incretinas incluyendo análogos al péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), agonistas del receptor GLP-1 e inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Power *et al.*, 2014).

Se conoce también que la ingesta oral de glucosa proporciona una respuesta insulínica en mayor nivel en comparación de la vía intravenosa, conocida como efecto incretina, llamada

así por las hormonas que ocasionan este fenómeno: el péptido similar al glucagón (GLP-1), sintetizada por las células L del íleon y colon y el polipéptido insulínotropico dependiente de la glucosa (GIP), producido por las células K del duodeno y parte del yeyuno (Drucker, 2006). La desventaja de dichas hormonas es su corta vida media, ya que por un lado el GLP-1 está activa en el período de 2 a 4 min, mientras que el GIP se eleva dentro de los primeros 5-10 min del período postprandial y picos entre 30 y 60 min después de la ingestión de nutrientes (Rijkelijhuizen *et al.*, 2010), siendo posteriormente degradados por acción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) en el resto del aminoácido N-terminal.

La Figura 7 describe la estructura de la dipeptidil peptidasa IV, DPP-IV o CD26, también conocido como proteína serina (EC 3.4.14.5).



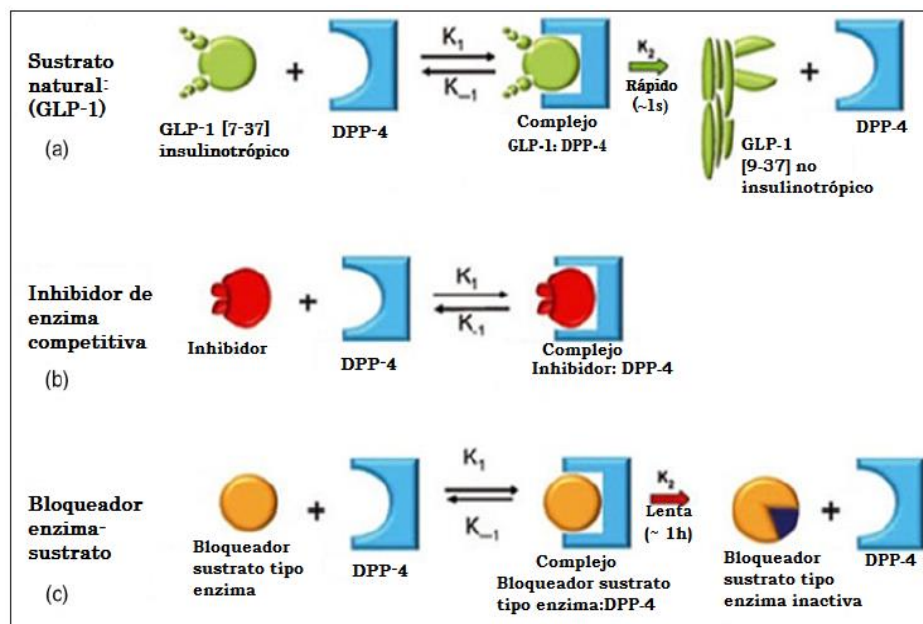
**Figura 7: Estructura de la DPP-IV**

FUENTE: Power *et al.* (2014)

La DPP-IV, es una aminodipeptidasa omnipresente, distribuida en la superficie de varios tipos de células incluyendo linfocitos, monocitos y en tejidos del páncreas, riñón, hígado y tracto gastrointestinal y cuya acción está asociado con una variedad de funciones fisiológicas incluyendo inmunoregulación, actividad endocrina y la degradación de las hormonas peptídicas (Mentlein, 1999 citado por Power *et al.*, 2014).

La glicoproteína DPP-IV (220 kDa–2110 kDa) existe como un dímero formado por 766 aminoácidos con una región citoplasmática de seis residuos, una región transmembrana de 22 residuos, y la parte extracelular con los 738 residuos restantes. La parte extracelular se compone de un dominio poco frecuente de ocho  $\beta$ -hélices en láminas y un dominio catalítico que contiene la tríada catalítica Ser-Asp-His (serina- ácido aspártico- histidina) localizada en la región C-terminal de la enzima (Pérez y Sainz de Vicuña, 2016).

El mecanismo inhibitorio de la DPP-IV se observa en la Figura 8. El GLP-1, sustrato por naturaleza, se une al sitio activo de la enzima formando un complejo e inactivándose propiamente. Ello ocurre debido a que la DDP-IV lleva a cabo la degradación de péptidos que tienen una prolina o alanina en la penúltima posición del extremo N-terminal por escisión de un fragmento correspondiente a los dos últimos aminoácidos (Pérez y Sainz de Vicuña, 2016).



**Figura 8: Cinética unión (a) sustratos naturales de la DPP-IV y (b,c) potencial mecanismo de la inhibición de la DPP-IV**

FUENTE: Ahren *et al.* (2011) citado por Power *et al.* (2014)

Al incluir un inhibidor de la enzima, éste compite con el sustrato para la unión al sitio activo de la enzima DPP-IV (Power *et al.*, 2014). En consecuencia, se logra el incremento de la concentración de GLP-1 como de GIP en el plasma que finalmente se traduce en lo siguiente: a nivel de las células  $\beta$  del páncreas aumenta la síntesis de insulina, estimula el



crecimiento de esta célula y evita la apoptosis y una disminución de la secreción de glucagón (Alfonso *et al.*, 2016).

La inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) por consiguiente, se está considerando una estrategia terapéutica novedosa para el manejo de la DM2 (Mulvihill, 2018). En el mercado ya se comercializan fármacos inhibidores de la DPP-IV como la sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina y linagliptina, pero también se ha hablado de péptidos hipoglucemiantes (Rodríguez *et al.*, 2017). Estas alternativas naturales a los compuestos inhibidores de DPP-IV, incluyen fragmentos de péptidos inhibidores de la DPP-IV que pueden liberarse tras la hidrólisis de proteínas alimentarias (Nongonierma y Fitzgerald, 2013).

Algunas especies vegetales han sido reportadas como fuentes de péptidos inhibidores de la DPP-IV, entre ellas la avena (Wang *et al.*, 2018), amaranto (Reyes *et al.*, 2011), quinua (Vilcacundo, 2017) y también el *Lupinus mutabilis* Sweet (Muñoz *et al.*, 2018), aunque de esta última su estudio sigue en curso. Por ejemplo, Aiello *et al.* (2018) encontraron en la secuencia LPYP (leucina-prolina-tirosina-prolina) de la proteína de la soya potencial inhibitorio de la DPP-IV. Por su parte Lammi *et al.* (2016) identificaron en la hidrólisis de la  $\beta$ -conglutina del lupino el nonapéptido LTFPGSAED (leucina-treonina-fenilalanina-prolina-glicina-serina-alanina-ácido glutámico-ácido aspártico) con este mismo potencial. Lammi *et al.* (2019) señalan que para un efectivo inhibidor DPP-IV, el péptido debe contener un residuo prolina en la primera, segunda, tercera o cuarta posición del amino terminal, esto además de que el péptido debe ser de carácter hidrófobo y/o presentar aminoácidos como alanina, glicina, leucina e isoleucina. Dipéptidos como TG (treonina-glicina) fue documentado por Lan *et al.* (2015) por inhibir la actividad humana DPP-IV en un 39.5 por ciento. Dichos autores señalan que la presencia de tirosina, triptófano, asparagina y residuos de valina en el N-terminal del péptido contribuyen a la inhibición de esta enzima.

#### **2.4. ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS EN CONDICIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL**

La digestibilidad es definida por Manríquez (1993) citado en Espinoza y Herrera (2019):

El aprovechamiento de un alimento en ser convertido en sustancias útiles para la nutrición a través del aparato digestivo, lugar que ocurre en dos fases: el de la digestión, donde se hidroliza las moléculas complejas; y el de la absorción de moléculas pequeñas que pasan finalmente a la sangre.

En general, la digestión de proteínas puede ser distinguida en tres fases a través del tracto intestinal (Erickson *et al.*, 1990 citado por Joye, 2019):

- Fase estomacal, donde se produce la hidrólisis de proteínas debido a dos tipos de pepsinas activadas a ciertas condiciones de pH. El producto de esta hidrólisis inicial incluye grandes polipéptidos, péptidos más pequeños e incluso algunos aminoácidos libres.
- Fase pancreática, en la cual el pH ha sido incrementado inactivando las peptidasas gástricas. Aquí se hace uso de una mezcla de enzimas proteolíticas producidas por el páncreas, como la tripsina, la quimotripsina, la elastasa (endopeptidasas) y carboxipeptidasa A y B (exopeptidasas). Los productos de hidrólisis resultantes son una mezcla heterogénea de oligopéptidos y aminoácidos libres.
- Fase intestinal, en la cual la pared del intestino delgado contiene varias aminopeptidasas, entre ellas, la aminopeptidasa N que hidroliza los oligopéptidos cortos removiendo secuencialmente el aminoácido N-terminal. Las aminopeptidasas del intestino delgado son importantes porque hidrolizan péptidos que contienen prolina, caso que no ocurre con las enzimas del páncreas por su baja especificidad. Además de las enzimas mencionadas, también se encuentran las metalo-endopeptidasas que pueden completar la hidrólisis de las proteínas en sus constituyentes aminoácidos. En esta fase también se realiza lo que es la absorción en la parte media del intestino, llamado también el yeyuno.

Recientes investigaciones señalan que los aminoácidos consiguen llegar a la sangre a los 10 a 20 minutos después de la ingestión de aminoácidos simples y/o de aislados proteicos, mientras que, a partir de proteínas intactas, las cuales son comúnmente encontradas en la

dieta diaria (carnes, huevos, lácteos, etc.) requiere alrededor de dos horas para que los aminoácidos lleguen a la sangre (Paddon-Jones *et al.*, 2015).

Por otro lado, el estudio del proceso digestivo de las proteínas es esencial para conocer los distintos péptidos que se forman y su interacción con el organismo (Vilcacundo, 2017). Mediante el análisis de la digestión *in vivo* de los alimentos, ya sea en humanos o animales, se obtienen los resultados más relevantes, pero demandan un elevado número de individuos, grandes cantidades de la muestra en estudio, mucho tiempo y análisis complejos, además de ser muy costosos, por lo que se recurre a la evaluación *in vitro* (Orsini *et al.*, 2016). Por medio de ello, se simulan condiciones fisiológicas que es una herramienta muy útil para evaluar la liberación y estabilidad de los péptidos frente a las enzimas digestivas (Matsui *et al.*, 2002). De esta forma, se emula en dos etapas el proceso de digestión que tiene lugar en el organismo, efectuando en primer lugar una hidrólisis con pepsina (endopeptidasa que actúa a nivel de estómago) a pH ácido y a continuación una digestión con extracto pancreático (pudiendo estar compuesto de tripsina,  $\alpha$ -quimiotripsina, carboxipeptidasa A y B, o una mezcla de ellas, que actúan a nivel intestinal) a pH alcalino (Roufik *et al.*, 2006, González-García *et al.*, 2015).

Segura-Campos *et al.* (2010) señalan que la resistencia de algunos péptidos a las barreras enzimáticas depende en parte de su composición aminoacídica como, por ejemplo, péptidos con residuos de prolina e hidroxiprolina aislados de la caseína y la gelatina han resistido la degradación de las enzimas digestivas. Sin embargo, estudios *in vitro* demuestran no solo una reducción del potencial biológico por efecto de la hidrólisis, sino también puede presentarse un incremento del mismo por efecto de la digestión. Por ejemplo, el heptapéptido conformado por lisina-valina-leucina-prolina-valina-prolina-glutamina el cual después de la acción de la enzima pancreática carboxipeptidasa A, presentó un incremento significativo del poder de inhibición al eliminar el residuo terminal glutamina; mientras que el hexapéptido tirosina-lisina-valina-prolina-glutamina-leucina derivado de la caseína perdió su poder antihipertensivo después de ser sometido a la degradación pancreática (Maeno *et al.*, 1996 citado por Segura-Campos *et al.*, 2010). Por lo tanto, la simulación de la digestión gastrointestinal es una alternativa viable para evaluar no solo la biodisponibilidad de los péptidos, sino también la forma activa y el mecanismo de acción de los mismos.

Entre los trabajos donde se ha evaluado péptidos liberados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* figuran trabajos como los realizados en semillas de soya y leche de soya, los cuales experimentaron una degradación durante la digestión, generando un gran número de péptidos bioactivos, algunos con actividad antimicrobiana (Singh *et al.*, 2014 citado por Vilcacundo, 2017). También está el trabajo de García-Mora *et al.* (2017) analizaron el hidrolizado de la proteína de lenteja con Savinasa®, el cual después de la digestión gastrointestinal *in vitro* registró mayor poder antioxidante e inhibitoria de la ECA, indicando que la liberación de fragmentos de péptidos más pequeños y aminoácidos podría dar lugar a efectos biológicos aditivos y sinérgicos. Dos tripéptidos se obtuvieron por hidrólisis de proteínas de arroz con Alcalasa® y tripsina, los cuales fueron inhibidores de la ECA y estables frente a las proteasas gastrointestinales pepsina y quimotripsina (Chen *et al.*, 2013). Vilcacundo *et al.* (2017) identificaron péptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de un hidrolizado de quinua, señalando que aquellos péptidos liberados durante la fase duodenal fueron los que mostraron los efectos inhibidores más potentes. Similarmente, se ha investigado el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas sobre la liberación de péptidos multifuncionales a partir de la proteína de kiwicha (*Amaranthus caudatus*), donde el digerido obtenido al final de la fase gástrica presentó el mayor efecto inhibidor de la ECA, mientras que el digerido duodenal obtenido tras 60 minutos de incubación con la pancreatina mostró la mayor actividad antioxidante, inhibidora de las enzimas dipeptidil peptidasa IV y  $\alpha$ -amilasa (Vilcacundo *et al.*, 2019).

No obstante, a pesar de las favorables respuestas de algunos péptidos obtenidos luego de la simulación gastrointestinal *in vitro*, se debe asegurar el efecto biológico de los péptidos, para ello es importante realizar estudios *in vivo* que confirmen su estabilidad, capacidad de absorción y mecanismo de acción que incrementen y diversifiquen las aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas de los mismos (Segura-Campos *et al.*, 2010).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología (IBT) en el área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

#### **3.2. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

Se empleó el tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) ecotipo Cholo Fuerte, de procedencia de la región Áncash, Perú. Éste fue escogido por su alto contenido de proteínas (varía entre 41.1 a 43.7 por ciento en base seca) y su alto rendimiento por hectárea, que lo convierte en una fuente valiosa para la obtención de concentrado proteico (Camarena *et al.*, 2018). Esta evaluación y la materia prima fueron proporcionados por el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas de Grano y Oleaginosas de la UNALM.

A continuación, se describen las enzimas de grado alimentario empleadas:

- Alcalasa® 2.4 L (Novo Nordisk, Dinamarca): Es una endoproteasa bacteriana altamente eficaz, desarrollada especialmente para la hidrólisis de todo tipo de proteínas cuya presentación es líquida clara y translúcida, de color marrón rojizo, completamente solubles en agua y cumplen con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.
- Flavourzyme® 500L (Novo Nordisk, Dinamarca): Es una proteasa, desarrollada para la hidrólisis de todo tipo de proteínas y presenta actividad endoproteasa y exoproteasa es líquida y cumple con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS.

- Neutrasa® 4.5 BG (Novo Nordisk, Dinamarca): Es una proteasa aplicable en la mayoría de los casos en que deba degradarse, de manera moderada o extensa, una sustancia proteica en péptidos. Es un polvo aglomerado de color marrón claro, fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones de uso normal y cumplen con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.

### **3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

#### **3.3.1. MATERIALES**

- Columna C18 Kinetex (1.7  $\mu\text{m}$ , 50 x 4.6 mm) (Phenomenex)
- Filtros de jeringa no estéril 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex, Merck, Alemania)
- Materiales de plástico: Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL, eppendorf de 1.5, 2.0 y 5 mL, puntas para micropipeta de 10, 200, 1000 y 5000  $\mu\text{L}$ , entre otros.
- Materiales de vidrio: Placas Petri, bureta, matraz Erlenmeyer, matraz Kitasato, embudo, vaso precipitado, pipetas graduadas, fiolas, tubos de ensayo, probetas graduadas.
- Micropipetas de 0.5 - 10; 20 - 200; 100 - 1000; 1000 - 5000  $\mu\text{L}$ .
- Papel de filtro Whatman N°1
- Papel filtro de lento y rápido paso
- Tamices de malla de 500  $\mu\text{m}$
- Termómetro
- Tips de micropipetas de 100 - 1000  $\mu\text{L}$  y 20 - 200  $\mu\text{L}$ .
- Otros materiales: Cuchillos, tabla de picar, papel de aluminio, bolsas de polietileno de baja densidad (tipo Ziploc), magneto para agitador magnético, mortero.

#### **3.3.2. REACTIVOS**

- Acarbosa 95 % (Sigma, USA)
- Acetonitrilo (J.T. Baker, USA)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker, México)
- Ácido hipúrico 98% (Sigma, USA)

- Ácido picrilsulfónico 5% (Sigma, USA)
- Ácido trifluoroacético (Sigma, USA)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma, USA)
- Almidón soluble (J.T. Baker, USA)
- Carbonato de sodio anhidro (Merck, Alemania)
- Cloroformo (Fermont, México)
- Cloruro de potasio (Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich, USA)
- Éter de petróleo (J.T. Baker, USA)
- Enzimas:  $\alpha$ -amylase de páncreas de porcine Type VI-B (Sigma Aldrich, USA),  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* Tipo I (Sigma Aldrich, USA), Enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA) de pulmón de conejo (Sigma Aldrich, USA) y dipeptidil peptidasa IV humana recombinante (Sigma Aldrich, USA)
- Folin Ciocalteau 2N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Fermont, México)
- Fosfato de potasio dibásico (Fermont, México)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Gly-Pro *p*-nitroanilide hydrochloride (Sigma Aldrich, USA)
- Hidróxido de sodio en perlas (Fermont, México)
- Hidróxido de potasio (Merck, Alemania)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratada 95% (Sigma Aldrich, USA)
- L-leucina 99% (Sigma Aldrich, USA)
- Óxido de aluminio (Merck, Alemania)
- *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (Sigma Aldrich, USA)
- Pancreatina de páncreas de porcino (Sigma Aldrich, USA)
- Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma Aldrich, USA)
- Púrpura de bromocresol (Merck, Alemania)
- Sulfato cúprico pentahidratado (Sigma Aldrich, USA)
- Tartrato de sodio y potasio (Merck, Alemania)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99% (Sigma Aldrich, USA)

- Tris base (Sigma Aldrich, USA)
- 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS) (Sigma Aldrich, USA)
- 3,5-ácido dinitrosalicílico (Sigma Aldrich, USA)

### 3.3.3. EQUIPOS

- Agitador magnético con sensor de temperatura (Heidolph, modelo 505, Alemania)
- Agitador Orbital (Heidolph, modelo Polymax 2040, Alemania)
- Agitador Vórtex (VELP Scientific, modelo F202A0175, Europa)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2 140, Alemania)
- Bomba de vacío (KNF LABOPORT, modelo N 810 FTP, USA)
- Centrífuga a temperatura ambiente (Hettich, modelo Rotina 420, Alemania)
- Centrífuga refrigerada (Hettich, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (modelo CMM-15, Miray, China)
- Congeladora (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo líquido UPLC compuestos de un módulo de separación Aquity HClass equipado con un autoinyector, un detector de fotodiodo Aquity (PDA eλ) y el software Empower. (Waters, Milford, USA)
- Espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific, modelo Genesys 10 UV, USA)
- Estufa (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Venticell, Alemania)
- Lector de microplacas (BioTek Instruments Eon, Winooski, VT, USA)
- Liofilizador (Labconco, modelo Freezone Benchtop, USA)
- Molino (IKA, modelo A11, Brasil)
- Potenciómetro (Thermo Scientific, Genesys 10 UV, USA)
- Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea)
- Rotavapor (Heidolph, modelo Laborotta 4000, Alemania)
- Sistema de digestión según Kjeldahl (Behr Labor Technik, modelo Inkjel 1225P, Alemania)
- Sonicador (Branson, modelo 3510MT, USA)



### **3.4. MÉTODO DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD, ACEITE Y PROTEÍNA TOTAL**

La humedad se determinó por el método AOAC (930.15, 2007), donde los resultados se expresaron en g de agua/100 g muestra (base seca, b.s). El contenido de aceite se determinó por el método de Soxhlet recomendado por la AOAC (2003.05, 2007) con éter de petróleo por 6 horas a temperatura no mayor a 40°C. Los resultados se expresaron como g de aceite/100 g de muestra seca (b.s).

Por su parte, la proteína total se determinó por el método de la AOAC método Kjeldahl (920.87, 2007), empleándose como factor de conversión de nitrógeno a 5.98 de acuerdo a lo recomendado por Romo (2008) para el caso de leguminosas; los resultados se expresaron en g de proteína/100 g muestra (b.s).

#### **3.4.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE**

El contenido de proteína soluble fue determinado según la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951) con algunas modificaciones. El análisis se realizó mezclando 400 µL de la muestra diluida en solución salina al 0.9 por ciento con 2 mL del reactivo C. El reactivo C está compuesto por una mezcla de las soluciones A: B<sub>1</sub>: B<sub>2</sub> en proporciones de 100:1:1 (donde A es una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 por ciento en 0.1 M de NaOH; B<sub>1</sub> es una solución de CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O al 0.5 por ciento en agua destilada y B<sub>2</sub> es una solución de tartrato de sodio al 1 por ciento en agua destilada). Después de 10 min, a la mezcla se le añadió 200 µL del reactivo Folin Ciocalteau 1 N y el conjunto se agitó e incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 650 nm. Los resultados se expresan en mg proteína/mL. La cantidad de proteínas en la muestra se estimó a partir de una curva estándar de una solución proteica estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Anexo 1A).

### 3.4.3 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES

Los alcaloides totales fueron determinados por el método colorimétrico de púrpura bromocresol propuesto por Von Baer (1978), citado por Sosa (2000). Brevemente, se mezcló 50 mg de muestra con 50 µL de KOH (15%) y 150 mg de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y se agregó 5 mL de cloroformo dejando agitar por 30 min a temperatura ambiente en el agitador orbital. Se recuperó el sobrenadante después de filtrar y el residuo se filtró 2 veces más con 2.5 mL de cloroformo. Se juntó el sobrenadante recuperado y se llevó con cloroformo hasta 12.5 mL de volumen (volumen de extracto de muestra). Para la reacción se preparó 0.5 mL del extracto, 4.5 mL de cloroformo y 50 µL de colorante púrpura de bromocresol (BKP) y se dejó en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en espectrofotómetro UV a 410 nm contra un blanco (5 mL de cloroformo y 50 µL de BKP). Los cálculos se realizan bajo la siguiente ecuación:

$$\text{Alcaloides} = \frac{(A_{\text{muestra}} * F * PM * V_t) * 0.1}{P * V_p}$$

Donde:

A<sub>muestra</sub>= Absorbancia de la muestra analizada a 410 nm

F= factor de calibración (para lupanina 0.422)

PM= peso molecular del alcaloide (para la lupanina es 248.36 mg/mmol)

V<sub>t</sub> = volumen total del extracto (mL)

P = peso de la muestra (mg)

V<sub>p</sub> = volumen alícuota del extracto que se utilizó para la reacción con la solución púrpura bromocresol (mL)

Los resultados se expresaron como g de alcaloide/100 g (b.s).

### 3.4.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis de los hidrolizados proteicos (GH) se determinó mediante el método de Adler-Nissen (1979). Brevemente, 0.063 mL de muestra se mezclaron con 0.5 mL de

buffer fosfato de sodio 0.20 M (pH 8.2) y 0.5 mL de ácido picrilsulfónico o TNBS (1 mg/mL) y se dejó incubando en oscuridad a 50 °C por 60 min en un baño maría. La reacción se detuvo agregando 1 mL de HCl 0.1 N y se mantuvo a temperatura ambiente por 20 min, luego se agregó 2 mL de agua y se dejó reposar por 10 min. La lectura de absorbancia se realizó a 340 nm. Los resultados se obtuvieron a partir de una curva estándar utilizando leucina como patrón (Anexo 1B), dado a que se encuentra en casi todas las proteínas y que comúnmente constituye una parte apreciable de la molécula proteica (Ryan y Brand, 1944). Es más, el espectro de absorción obtenido de una mezcla de aminoácidos después de la reacción con TNBS es idéntica a como si se emplease leucina sola como estándar (Bateson, 1970). Cabe mencionar que el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) depende del tipo de aminoácido empleado, por lo que junto a la concentración ( $c$ ) influye en la Absorbancia ( $A = \epsilon c L = \epsilon c$ , cuando  $L = 1$  cm).

$$GH (\%) = \frac{[AN_2 - AN_1]}{Npb} * 100$$

Donde:

GH: grado de hidrólisis

AN<sub>1</sub>: nitrógeno amínico en la proteína antes de la hidrólisis, esto es la muestra tomada antes de agregar la enzima, considerada como el tiempo 0 (mg/g de proteína)

AN<sub>2</sub>: nitrógeno amínico en la proteína después de la hidrólisis (mg/g de proteína)

Npb: nitrógeno amínico de los enlaces peptídicos en el sustrato (muestra proteica), el cual fue determinado después de la hidrólisis total con HCl 6 M a 110 °C por 24 horas seguido de una filtración en papel Whatman N° 40 y la posterior neutralización con NaOH 6 M

Los resultados se expresaron en porcentaje.

### **3.4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Se determinó la capacidad antioxidante utilizando el ensayo del secuestro del radical ABTS<sup>•+</sup> propuestos por Torruco *et al.* (2009) y adaptado por Chirinos *et al.* (2018). Brevemente, la solución de ABTS<sup>•+</sup> (preparada de acuerdo a los descrito por Re *et al.*,

1999) fue diluida en buffer fosfato salino (PBS) de pH 7.4 en una proporción de ~ 1:50 respectivamente hasta alcanzar la absorbancia de 0.70 a 734 nm. Unos 40  $\mu\text{L}$  de la muestra se mezcló con 4 mL de la solución diluida de ABTS $\bullet^+$ . Después de una hora de reacción (bajo oscuridad) el decrecimiento de la absorbancia a 734 nm fue calculada. Los resultados se determinaron a partir de una curva estándar preparada con trolox (Anexo 1C). Un blanco fue empleado usando al PBS en reemplazo de la muestra. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol}$  de trolox equivalente (TE)/mg de proteína soluble.

### **3.4.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y EL VALOR IC<sub>50</sub>**

La capacidad antihipertensiva se determinó a través de la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) utilizando el método propuesto por Wu *et al.* (2002) y adaptado por Chirinos *et al.* (2018). La reacción fue llevada a cabo mezclando 50  $\mu\text{L}$  de solución de hipuril histidil leucina (HHL) 2.17 mM (preparada de acuerdo a los descrito por Wu *et al.*, 2002), 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y 10  $\mu\text{L}$  de 2 mU de ECA (preparados en buffer borato salino BBS 100 mM, conteniendo 300 mM de NaCl, pH 8.3) a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando 85  $\mu\text{L}$  de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco, sometidas a las mismas condiciones de reacción. El control y blanco estuvieron compuestos por la misma mezcla de reacción, donde para el control los 10  $\mu\text{L}$  de la muestra fue reemplazada 10  $\mu\text{L}$  de buffer borato y para el blanco se usó 10  $\mu\text{L}$  de la solución de ECA inactivada (con 1N HCl). Las soluciones fueron filtradas en un filtro 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore, tipo GV (Millex, Merck, Alemania) para el análisis por UPLC-PAD.

La detección y cuantificación del ácido hipúrico (AH) y HHL, se realizó a la longitud de onda de 229 nm, empleando un sistema UPLC compuesto de un módulo de separación Aquity HClass (Waters, Milford, USA) con un autoinyector, un detector de fotodiodo Aquity (PDA  $\epsilon\lambda$  detector) y el software Empower. Las muestras (2  $\mu\text{L}$ ) fueron analizadas en una columna Kinetex C<sub>18</sub> RP (1.7  $\mu\text{m}$ , 50 x 4.6 mm) (Waters, Milford, USA) y una guarda columna. La columna fue eluída con dos solventes: (A) 0.05 % ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 0.05 % TFA en acetonitrilo. Las condiciones de corrida fueron: se inició con 95 % A por 1.5 min, luego un gradiente del solvente B fue

usado como sigue: 60 % B en 4.0 min, 90 % B en 4.5 min, 90 % B en 6.0 min. La corrida total se realizó en 6 min, a 30 °C bajo un flujo de 0.5 mL/min. La actividad inhibitoria de la ECA fue calculada de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria de la ECA (\%)} = \frac{[(C_c - C_m)]}{(C_c - C_b)} * 100$$

Donde:

C<sub>c</sub> = Concentración del ácido hipúrico del control

C<sub>m</sub> = Concentración del ácido hipúrico de la muestra

C<sub>b</sub> = Concentración del ácido hipúrico del blanco

Los resultados se expresaron en porcentaje a una determinada concentración de proteína (en este estudio a 1 mg proteína/mL).

El valor IC<sub>50</sub> se define como la concentración de hidrolizado proteico que permite una inhibición del 50 por ciento de la actividad inhibitoria de la ECA expresada en mg proteína/mL. Para su determinación se evaluaron concentraciones en un rango de 0.1 a 1 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinó mediante un análisis de regresión entre los valores inhibición de la ECA (porcentaje) frente al log de la concentración de la proteína (mg proteína/mL).

### **3.4.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE**

La medida de la capacidad hipoglucemiante fue determinada por tres métodos; el método de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

Las capacidades inhibitorias de la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa fueron determinadas de acuerdo al Manual de Enzima Worthington (MEW) (Worthington Biochemical Corp., 1993). El ensayo de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa, se realizó tomando medidas en las muestras de reacción de acuerdo al MEW, utilizando un espectrofotómetro a la longitud de onda de 540 nm. Brevemente, se procedió de la siguiente forma: A 500  $\mu$ L de muestra se le añadió 500  $\mu$ L de buffer fosfato de sodio 0.02 M (pH 6.9) que contiene una solución de  $\alpha$ -amilasa

(0.5 mg/mL), el conjunto se incubó a 25 °C por 10 min. Luego se agregó 500 µL de una solución de almidón al 1 por ciento y se incubó a 25 °C por 10 min. La reacción se detuvo con 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se llevó a ebullición por 10 min, con posterior enfriado a temperatura ambiente. La reacción fue diluida añadiéndose 15 mL de agua destilada, para luego medir su absorbancia a 540 nm. Las muestras fueron comparadas con un control (buffer en lugar de la muestra) y un blanco de muestra (buffer en lugar de solución enzimática), sometidas a las mismas condiciones de reacción. Se usó acarbosa como control positivo. Los resultados de inhibición  $\alpha$ -amilasa fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición } \alpha\text{-amilasa (\%)} = \frac{[A_{540 \text{ nm (control)}} - (A_{540 \text{ nm(muestra)}} - A_{540 \text{ nm (blanco muestra)})]}{A_{540 \text{ nm(control)}}} * 100$$

Donde:

$A_{540 \text{ nm (control)}}$  = Absorbancia de la solución control a 540 nm donde en lugar de muestra hay una solución buffer

$A_{540 \text{ nm (muestra)}}$  = Absorbancia de la solución de reacción a 540 nm que considera a la muestra a evaluar

$A_{540 \text{ nm (blanco de muestra)}}$  = Absorbancia de la solución de reacción a 540 nm donde en lugar de enzima hay una solución buffer

Los resultados se expresaron en porcentaje a una determinada concentración de proteína (mg/mL).

El ensayo de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa, se realizó tomando medidas en las muestras de reacción de acuerdo al MEW de Worthington (1993) Brevemente, se procedió de la siguiente forma: A 50 µL de muestra se le añadieron 50 µL de buffer fosfato 0.1 M (6.9) y 100 µL de buffer fosfato 0.1 M que contenía solución enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa (1.0 U/mL) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Luego se agregó 50 µL de del sustrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosa (5 mM) contenida en solución de buffer fosfato 0.1 M (pH 6.9). La reacción se incubó en el lector de microplacas de 96 pozos (Biotek Instrument, Eon) a 25 °C por 5 min a 405 nm. Antes y después de la incubación se tomaron

las lecturas a 405 nm y se compararon con un control, el cual contenía 50  $\mu$ L de buffer en lugar de muestra. Se usó acarbosa como control positivo. Los resultados de inhibición fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de la } \alpha\text{-glucosidasa (\%)} = \frac{[\Delta A_{405 \text{ nm (control)}} - \Delta A_{405 \text{ nm (muestra)}}]}{\Delta A_{405 \text{ nm (control)}}} * 100$$

Donde:

$\Delta A_{405 \text{ nm (control)}}$  = Diferencia de las absorbancias obtenidas a 405 nm de la solución de reacción (entre el tiempo cero y tiempo final de reacción de 5 min), donde en lugar de muestra hay una solución buffer

$\Delta A_{405 \text{ nm (muestra)}}$  = Diferencia de las absorbancias obtenidas a 405 nm de la solución de reacción (entre el tiempo cero y el tiempo final de reacción de 5 min) que considera a la muestra a evaluar

Los resultados se expresaron en porcentaje a una determinada concentración de proteína (mg/mL).

La inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) fue medida siguiendo el protocolo descrito por Vilcacundo *et al.* (2017), con ligeras modificaciones. Brevemente, una solución de la DPP-IV humana (0.26 mU por pozo; 15  $\mu$ L) fue incubada a 37 °C en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de muestra (para llegar a volumen final de 50  $\mu$ L por pozo). Un volumen de 50  $\mu$ L del buffer (TRIS-HCl 0.1 M pH 8.0) conteniendo H-Gly-Pro-*p*-nitroaniline (sustrato) fue adicionado a cada pozo para alcanzar una concentración de 100  $\mu$ M. Se consideró un control, donde la muestra se reemplazó por el buffer. La absorbancia fue leída a 405 nm en un lector de microplaca (Biotek Instrument, Eon) a intervalos de 2 min, por un tiempo de hasta 20 min. Los valores de absorbancia fueron ploteados versus el tiempo. Para los cálculos se tomó la porción de la línea recta tanto de la reacción de las muestras, como del control. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la siguiente forma:

$$\text{Inhibición de la DPP-IV (\%)} = \frac{[P_{405 \text{ nm (control)}} - P_{405 \text{ nm(muestra)}}]}{P_{405 \text{ nm(control)}}} * 100$$

Donde:

$P_{405 \text{ nm (control)}}$  = pendiente del control obtenido a 405 nm (donde en lugar de muestra está la solución buffer)

$P_{405 \text{ nm (muestra)}}$  = pendiente de muestra a evaluar obtenido a 405 nm

El valor  $IC_{50}$  también fue calculado y similar al caso de la capacidad antihipertensiva, para su determinación se evaluaron concentraciones de los hidrolizados en un rango de 0.5 a 5 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinó mediante un análisis de regresión entre los valores inhibición de la DPP-IV (porcentaje) frente al log de la concentración de la proteína (mg proteína/mL).

Todos los análisis fueron realizados por triplicado considerando muestras independientes.

### **3.5. METODOLOGÍA**

#### **3.5.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE TARWI DESAMARGADA Y DESGRASADA**

Las semillas secas del tarwi fueron desamargadas siguiendo el método Cuzco modificado reportado por Sosa (2000), el cual consistió de una cocción de 30 min en una suspensión de cal (50 g por cada 10 kg de semilla) en una relación de agua: materia prima de 5:1 y un remojo posterior de 12 h con cambio de agua cada 6 h. Posteriormente, se procedió con el descascarado y las semillas pasaron a un secado en estufa por circulación forzada (Venticell, Alemania) a 50 °C por 5 h. Las semillas secas fueron molidas y tamizadas (malla 0.5 mm) obteniéndose así la harina de tarwi desamargada.

Para el desgrasado se siguió el procedimiento reportado por Sosa (2000) con ligeras modificaciones, para ello la harina de tarwi desamargada se mezcló con éter de petróleo en una relación de solvente: harina desamargada de 20:1, el conjunto fue mezclado bajo



agitación lenta por 16 h, posterior a esta etapa se procedió a retirar el sobrenadante (filtración al vacío) y el residuo fue sometido a una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Se procedió a recuperar el residuo de la segunda extracción y se oreó a temperatura ambiente para evaporar el éter residual resultando como producto final la harina de tarwi desgrasada y desamargada (HDD). Al tarwi inicial y al producto obtenido después del desamargado y desgrasado, se les determinó: humedad, proteína total, proteína soluble y alcaloides totales.

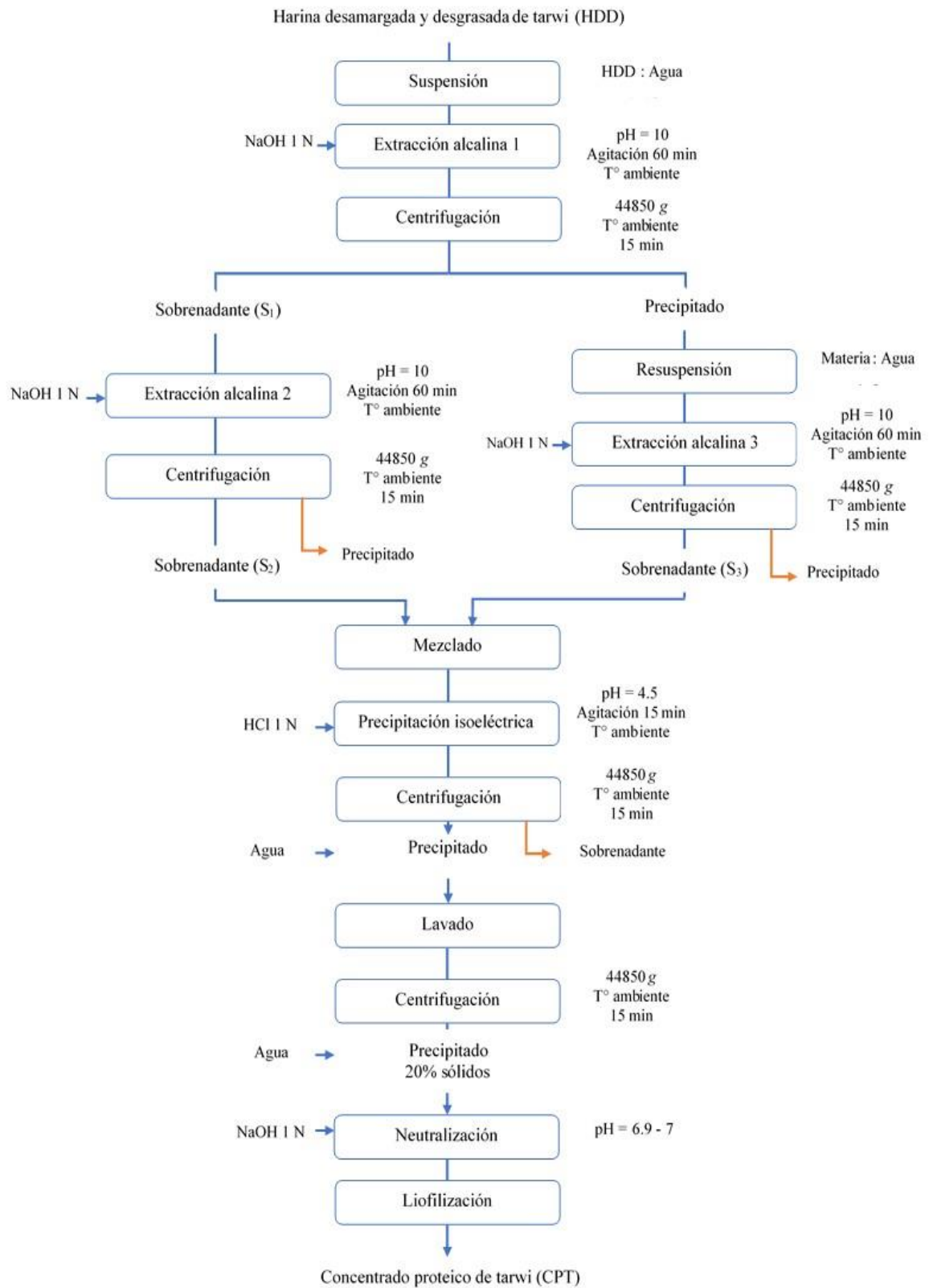
### **3.5.2. OBTENCIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI**

Se siguió el flujo de operaciones que se presenta en la Figura 9 y que se detalla a continuación:

Inicialmente, la harina desamargada y desgrasada de tarwi se suspendió en agua destilada (relación 1/15) y se reguló el pH a 10 con NaOH 1N, manteniéndose a temperatura ambiente bajo agitación lenta por 60 min. Luego se centrifugó a 25 °C a 44850 g por 15 min y se recuperó el sobrenadante (S<sub>1</sub>). La torta remanente, así como el sobrenadante obtenido fue sometida nuevamente a un proceso de extracción bajo las condiciones utilizadas previamente. El sobrenadante obtenido (S<sub>2</sub>) de la segunda extracción, se mezcló con el sobrenadante de la primera extracción, obteniéndose la mezcla (S<sub>3</sub>). El pH del sobrenadante (S<sub>3</sub>) fue ajustado a 4.5 con HCl 1 N, bajo agitación lenta por 15 min y se centrifugó 25 °C a 44850 g por 15 min, procediendo a recuperar el precipitado, el cual fue lavado en agua destilada para luego ser centrifugado a las condiciones previamente señaladas. El precipitado recuperado se resuspendió en agua destilada hasta tener 20 por ciento de sólidos y se ajustó el pH ~ 7 con NaOH 1 N. Finalmente, el producto fue llevado a liofilización. El producto final correspondió al concentrado proteico de tarwi (CPT). Se le determinó humedad, contenido de proteína total y alcaloides totales.

### **3.5.3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI**

Para la obtención de los hidrolizados proteicos a partir del concentrado proteico de tarwi, se utilizó la metodología de Fritz *et al.* (2011) con modificaciones. Los hidrolizados proteicos obtenidos, tendrán como uno de los principales productos a los péptidos, quienes



**Figura 9: Flujograma para la obtención de concentrado proteico de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)**

FUENTE: Sosa (2000)

serán responsables de las propiedades bioactivas antioxidantes, antihipertensivas e hipoglucemiantes evaluadas *in vitro*. Dependiendo del modo de acción de la enzima empleada, diferentes péptidos en cantidad y propiedad bioactiva estarán presentes en los hidrolizados proteicos obtenidos.

La hidrólisis enzimática se realizó en una y en dos etapas por un tiempo total de 240 min, siguiendo las condiciones mostradas en la Tabla 6. Se emplearon tres enzimas de grado alimentario: a) Alcalasa® (endopeptidasa alcalina), b) Neutrasa® (endopeptidasa) y c) Flavourzyme® (exo- y endo-peptidasa). El CPT se mezcló con buffer fosfato de sodio 0.2 M a pH 8.2 para la hidrólisis con Alcalasa® y buffer fosfato de sodio 0.2 M a pH 7 para las hidrólisis con Neutrasa® y Flavourzyme®, llevándose a la concentración de 2.5 por ciento de la relación proteína: buffer (p/v). Todas las hidrólisis fueron llevadas a cabo bajo agitación constante y a una temperatura controlada de 50 °C, se tomó una alícuota a los 0 min (sin enzima) y enseguida la solución enzimática fue agregada, siendo las concentraciones de éstas: 0.385 Unidades Anson (UA) para la Alcalasa y Neutrasa mientras que, para la Flavourzyme, 50 Unidades Leucina aminopeptidasa (LAPU) (Tabla 6).

Luego de la adición de la enzima, se tomaron alícuotas a los 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min, las que fueron inmediatamente inactivadas a 100 °C por 10 min y luego centrifugadas a 16270 g por 5 min y a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (es el que contiene los péptidos), el cual pasó por una filtración y se conservó a -20 °C hasta su evaluación. Para las reacciones en dos etapas, la segunda enzima se agregó a los 60 min de reacción enzimática de la primera enzima. A las muestras, se les determinó el grado de hidrólisis, proteína soluble y sus capacidades: antioxidante, antihipertensiva, hipoglucemiante, así como sus respectivos valores IC<sub>50</sub>. Todas las hidrólisis se realizaron por triplicado de forma independiente.

**Tabla 6: Enzimas y parámetros de hidrólisis enzimática para la obtención de hidrolizados proteicos a partir del concentrado proteico de tarwi**

<b>Enzima</b>	<b>Concentración de enzima</b>	<b>pH inicial y temperatura</b>
Hidrólisis en una etapa		
<b>Alcalasa®</b>	0.385 UA <sup>(a)</sup> /g de proteína	8.2 y 50 °C
<b>Neutrasa®</b>	0.385 UA/g de proteína	7.0 y 50 °C
<b>Flavourzyme®</b>	50 LAPU <sup>(b)</sup> / g de proteína	7.0 y 50 °C
Hidrólisis en dos etapas		
<b>Primera etapa Alcalasa® Segunda etapa Neutrasa®</b> (Alcalasa y Neutrasa)	0.385 UA/g de proteína	8.2 y 50 °C
<b>Primera etapa Alcalasa® Segunda etapa Flavourzyme®</b> (Alcalasa y Flavourzyme)	0.385 UA/g de proteína 50 LAPU/ g de proteína	8.2 y 50 °C 7.0 y 50 °C
<b>Primera etapa Neutrasa® Segunda etapa Flavourzyme®</b> (Neutrasa y Flavourzyme)	0.385 UA/g de proteína 50 LAPU/ g de proteína	7.0 y 50 °C 8.2 y 50 °C

(a) Unidades Anson (UA)

(b) Unidades Leucina aminopeptidasa (LAPU)

### **3.5.4. ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI A LAS CONDICIONES DE DIGESTIÓN *in vitro***

La estabilidad de los péptidos bioactivos del hidrolizado proteico a las condiciones de digestión *in vitro* se evaluó a través de las mediciones de sus capacidades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante a los hidrolizados proteicos seleccionados.

Para ello, la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo usando secuencialmente las enzimas digestivas pepsina y pancreatina, tomando como referencia el método reportado por Tiengo *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Brevemente, los hidrolizados proteicos seleccionados fueron liofilizados y almacenados herméticamente

para su posterior preparación. Para ello, se tomó 150 mg de hidrolizado y se diluyó con agua miliQ (al 4 % p/v) bajo agitación lenta a 37 °C y se tomó 500 µL de solución inicial, antes de añadir la enzima. Luego se ajustó el pH de la solución a 2.5 con HCl 2 N y se agregó la pepsina (relación enzima: sustrato 1:100 p/v) y se llevó bajo agitación por 2 h a 37 °C. Inmediatamente después, se inactivó la pepsina ajustando nuevamente el pH ~ 7 con NaOH 2 N y se tomaron 500 µL para su posterior análisis. La enzima pancreatina se agregó a la solución restante en una relación de enzima: sustrato 1:50 p/v y se incubó a 37 °C bajo agitación durante 4 h, para luego inactivarse a 90 °C por 10 min. Todas las muestras tomadas al inicio (antes de adicionar la enzima), después de la digestión con la pepsina y la posterior digestión con pancreatina fueron centrifugadas a 16270 g por 5 min a 4 °C y se les determinó su capacidad antioxidante y el valor IC<sub>50</sub> para la ECA y la DPP-IV.

### **3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El esquema experimental para la obtención de los hidrolizados proteicos con capacidad antihipertensiva, hipoglucemiante y antioxidante *in vitro* a partir del concentrado proteico del tarwi, se presenta en la Figura 10.

De acuerdo a la Figura 10, en la etapa de obtención de concentrado proteico de tarwi, se caracterizaron la harina entera de tarwi (HE), la harina desamargada y desgrasada (HDD) y el concentrado proteico (CPT) de forma que se midió la humedad, proteína total y alcaloides totales. Seguidamente, se procedió con la etapa de obtención de hidrolizados proteicos evaluándose el efecto del tiempo de reacción enzimática (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min) y de las enzimas Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme (solas y en combinación) a través de sus capacidades antioxidantes, antihipertensivas e hipoglucemiantes.

Aquellos tratamientos que obtuvieron mejores respuestas ante los análisis realizados, se le sometió a la última etapa, que consiste en la digestión *in vitro* (hidrólisis secuencial de pepsina seguida de pancreatina), examinando a los productos de digestión las capacidades antioxidantes (ABTS<sup>+</sup>), antihipertensivas (IC<sub>50</sub> de la ECA) e hipoglucemiante (IC<sub>50</sub> de la DPP-IV).

ETAPAS	Obtención de concentrado	Hidrólisis enzimática del concentrado proteico		Digestión <i>in vitro</i>	
	A partir de la harina entera de tarwi (HE) se obtiene la harina desamargada y desgrasada de tarwi (HDD) y de ésta se produce el concentrado proteico de tarwi (CPT)	TRATAMIENTOS			Los hidrolizados proteicos con mejores capacidades son evaluadas
Enzimas		Tiempo de reacción (min)			
Una etapa de reacción		Alcalasa		0 15 30 60 90 120 180 240	
		Neutrassa			
		Flavourzyme			
		Alcalasa seguido de Neutrassa			
		Alcalasa seguido de Flavourzyme			
	Neutrassa seguido de Flavourzyme				
Dos etapas de reacción (la 2da enzima se añade a los 60 min de reacción enzimática)	Alcalasa seguido de Neutrassa		30		
	Alcalasa seguido de Flavourzyme		60		
ANÁLISIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Humedad</li> <li>- Proteína total</li> <li>- Alcaloides totales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grado de hidrólisis (%)</li> <li>- Proteína soluble</li> <li>- Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup></li> <li>- Inhibición de la ECA y su IC<sub>50</sub></li> <li>- Inhibición <math>\alpha</math>-amilasa, <math>\alpha</math>-glucosidasa y DPP-IV (y su valor IC<sub>50</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteína soluble</li> <li>- Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup></li> <li>- Inhibición de la ECA (valor IC<sub>50</sub>)</li> <li>- Inhibición DPP-IV (valor IC<sub>50</sub>)</li> </ul>		

**Figura 10. Esquema experimental para la obtención de hidrolizados proteicos de tarwi**

### 3.7. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics® Centurion XVIII. Se utilizó un análisis de variancia considerando un diseño completamente al azar (DCA) con un nivel de significancia del 5 %, para determinar el grado de significancia entre el grado de hidrólisis, capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>, así como las actividades inhibitorias de la ECA,  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y DPP-IV y los valores IC<sub>50</sub>, para cada tiempo de reacción según cada enzima empleada (Alcalasa®, Neutrassa® y Flavourzyme® y las combinaciones de éstas).

Además, a los datos se les realizó la prueba de comparación de medias de Duncan en caso existiesen diferencias significativas, entre los tratamientos evaluados.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se detalla los resultados en cuanto a la caracterización fisicoquímica (humedad, contenido de aceite, proteína bruta y alcaloides totales) de la harina entera (HE), harina desamargada y desgrasada (HDD) y del concentrado proteico de tarwi (CPT), el grado de hidrólisis de éste, así como la evaluación de la capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>, antihipertensiva e hipoglucemiante de los péptidos bioactivos obtenidos mediante hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

### 4.1. CARÁCTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA HARINA ENTERA, DESAMARGADA Y DESGRASADA Y DEL CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI

En la Tabla 7 se presentan las características fisicoquímicas (humedad, contenido de aceite, proteína bruta y alcaloides totales) en base seca para los productos del tarwi: harina entera, harina desamargada y desgrasada y concentrado proteico.

**Tabla 7: Valores de humedad, contenido de aceite, proteína total y alcaloides totales de la harina entera, harina desamargada y desgrasada y el concentrado proteico de tarwi**

	<b>Humedad (g/100 g b.s)</b>	<b>Aceite (g/100 g b.s)</b>	<b>Proteína total<sup>a</sup> (g/100 g b.s)</b>	<b>Alcaloides totales (g/100 g b.s)</b>
Harina entera	7.25 ± 0.02	16.92 ± 0.48	43.29 ± 1.56	2.39 ± 0.09
Harina desamargada y desgrasada	8.65 ± 0.12	1.16 ± 0.15	47.1 ± 0.85	0.77 ± 0.03
Concentrado proteico	1.55 ± 0.14	0.704 ± 0.04	89.22 ± 0.71	0.014 ± 0.01

\* Valores expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes

a Factor de conversión del nitrógeno a proteína 5.8



De acuerdo a la Tabla 7, el contenido de aceite encontrado en la harina de tarwi reportó el valor de 16.92 g/100 g b.s, valor ubicado dentro del rango para esta misma especie *L. mutabilis* (16.5 a 24 g/100 g b.s) (Sabelino, 2020). Después del desamargado este valor suele aumentar por la pérdida de materia seca (Quispe, 2015) pero que posteriormente disminuye en el desgrasado, logrando alcanzar el valor de 1.16 g/100 g, que resulta óptimo para la extracción de proteína a partir de harinas desgrasadas (Fennema, 2000). El concentrado proteico final obtuvo un valor de 0.704 g/100g de aceite, cercanos a los valores 0.22 y 0.62 g/100g b.s para los aislados proteicos de tarwi reportados por Breña (2018) y Urrutia (2010), respectivamente.

Por otro lado, se puede apreciar el alto valor proteico que presenta el tarwi ecotipo Cholo Fuerte alcanzando un valor 43.29 g/100 g y este valor se incrementa al obtener el concentrado proteico con un 89.22 g/100 g. Autores como Ortega *et al.* (2010) y Quispe (2015) reportan valores dentro del rango de proteína para este mismo ecotipo de tarwi de 44.86 (g/100 g) y 48.3 (g/100 g), respectivamente. Además, se puede apreciar en la Tabla 7 que el contenido proteico aumenta con el proceso de desamargado y desgrasado (47.1 g/100 g) como lo encontrado en la harina desamargada y desgrasada de *L. mutabilis* la cual obtuvo 49.4 g/100 g de proteína respecto al valor inicial de 34 g/100 g en la harina entera (Güemes *et al.*, 2008).

Por su parte, Breña (2018) al obtener proteína de tarwi por precipitación isoeléctrica reportó el valor de 91.79 g/ 100 g de proteína, mientras que Urrutia (2010) encontró el valor 92.83 (g/100 g) también para esta leguminosa, siendo los valores citados cercanos a los encontrados en el presente estudio.

En cuanto a la cantidad de alcaloides totales, se puede apreciar en la Tabla 7 que el valor inicial de 2.39 g/100 g se encuentra entre valores reportados para el tarwi sin desamargar de 0.02 a 4.45 g/100 g (Mori y Paz, 2008). Se observa que, este valor disminuye con el proceso de desamargado y desgrasado hasta la obtención del concentrado proteico, ello debido a la alta solubilidad de los alcaloides en el agua empleada para dichos procesos (Mori y Paz, 2008). En el concentrado proteico de tarwi obtenido, se encontró un valor final de 0.014 g de alcaloides/100g. El valor final de alcaloides se encuentra dentro del rango reportado por la FAO (1990) de 0.002 a 0.02 g/100 g, concentraciones de alcaloide

que es considerado apto para el consumo por el hombre.

## **4.2. HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI**

### **4.2.1. GRADO DE HIDRÓLISIS**

El control del GH durante el proceso de hidrólisis con enzimas representa una etapa esencial, debido a los efectos sobre las propiedades de la proteína hidrolizada, que incluyen: tipo de aminoácidos libres, el peso molecular de los péptidos resultantes y el tipo de péptido obtenido que juega un rol importante en las propiedades bioactivas (Slizyte *et al.*, 2005).

En la Tabla 8, se presentan los valores en porcentaje del GH obtenidos para los diferentes tiempos de reacción (de 0 hasta 240 min) para las hidrólisis enzimáticas en una y en dos etapas. De acuerdo a la Tabla 8, el factor tiempo tiene un efecto significativo en el GH ( $p < 0.05$ ) (Anexo 2). Éste se incrementa conforme el tiempo de reacción aumenta obteniéndose los mayores valores a los 240 min, de modo que, en los tratamientos en una sola etapa, la hidrólisis realizada con la Alcalasa fue la que obtuvo los valores más altos (52.3 por ciento) seguidos en orden descendente por los hidrolizados con Flavourzyme y Neutrasa (con 19.2 y 17.4 por ciento, respectivamente).

Para los tratamientos realizados en dos etapas, fue la secuencia de Alcalasa-Flavourzyme la que obtuvo los valores más altos (56.3 por ciento) seguido de Alcalasa-Neutrasa y Neutrasa-Flavourzyme (con 43.5 y 36.2 por ciento, respectivamente). Se destaca entonces, que los tratamientos que incluyen a la enzima Alcalasa (en una o dos etapas) tienen los mayores GH, presentando diferencias significativas respecto a los demás tratamientos.

Los diferentes grados de hidrólisis indicarían que las enzimas empleadas poseen diferentes sitios de escisión que liberan péptidos con diferentes secuencias de aminoácidos y pesos moleculares (Chen *et al.*, 2012). La Alcalasa, es una endopeptidasa alcalina, es decir hidroliza enlaces amínicos dentro de la cadena de la proteína, con acción catalítica al residuo serina (Ser) (Prieto, 2007). Según Kristinsson (2008) ofrece altos valores de GH produciendo principalmente oligopéptidos/polipéptidos de tamaños cortos y medianos.

**Tabla 8: Grado de hidrólisis (por ciento) para cada tiempo de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Tiempo de reacción (min)	Grado de hidrólisis (%) *					
	Hidrólisis en una etapa			Hidrólisis en dos etapas		
	Alcalasa 0.385 UA/g	Neutrasa 0.385 UA/g	Flavourzyme 50 LAPU/g	Alcalasa y Neutrasa 0.385 UA / 0.385 UA	Alcalasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU	Neutrasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU
0	0.88 ± 0.5 <sup>eG</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>fF</sup>	0.06 ± 0.1 <sup>fF</sup>	0.17 ± 0.14 <sup>fG</sup>	0.13 ± 0.19 <sup>fH</sup>	0.10 ± 0.18 <sup>fH</sup>
15	19.41 ± 3.2 <sup>eF</sup>	5.78 ± 2.3 <sup>fgE</sup>	4.72 ± 1.12 <sup>gE</sup>	21.48 ± 1.42 <sup>eF</sup>	21.41 ± 0.11 <sup>eG</sup>	8.55 ± 0.15 <sup>fG</sup>
30	24.0 ± 4.48 <sup>dEF</sup>	8.03 ± 2.62 <sup>efDE</sup>	5.61 ± 0.88 <sup>fE</sup>	25.71 ± 1.77 <sup>dE</sup>	26.00 ± 1.01 <sup>dF</sup>	10.5 ± 0.35 <sup>eF</sup>
60	27.99 ± 3.82 <sup>cDE</sup>	9.35 ± 2.14 <sup>deCD</sup>	7.99 ± 0.61 <sup>eD</sup>	28.76 ± 1.66 <sup>cD</sup>	28.16 ± 0.73 <sup>cE</sup>	12.31 ± 0.47 <sup>dE</sup>
90	33.11 ± 2.78 <sup>bCD</sup>	11.11 ± 1.69 <sup>dBCD</sup>	10.01 ± 0.57 <sup>dD</sup>	33.36 ± 2.19 <sup>bC</sup>	37.26 ± 0.75 <sup>aD</sup>	20.34 ± 0.17 <sup>cD</sup>
120	36.93 ± 4.94 <sup>bBC</sup>	12.0 ± 2.01 <sup>dBC</sup>	12.61 ± 1.21 <sup>dC</sup>	36.04 ± 1.2 <sup>bC</sup>	40.16 ± 0.62 <sup>bC</sup>	23.92 ± 0.63 <sup>cC</sup>
180	41.1 ± 2.56 <sup>bB</sup>	14.48 ± 2.33 <sup>dAB</sup>	16.73 ± 2.08 <sup>dB</sup>	40.49 ± 2.1 <sup>bB</sup>	46.96 ± 0.21 <sup>aB</sup>	29.62 ± 0.29 <sup>eB</sup>
240	52.3 ± 1.35 <sup>bA</sup>	17.44 ± 1.3 <sup>eA</sup>	19.25 ± 1.71 <sup>eA</sup>	43.59 ± 1.45 <sup>cA</sup>	56.33 ± 0.34 <sup>aA</sup>	36.27 ± 0.54 <sup>dA</sup>

\* Valores expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

En el presente trabajo, la hidrólisis con Alcalasa en el tiempo 180 min obtuvo un GH de 41.1 por ciento, valor dentro del rango (39.4 - 44.6 por ciento) reportado para ese mismo tiempo de reacción en la hidrólisis con Alcalasa de la proteína de *Lupinus mutabilis* (Intiquilla *et al.*, 2018b). De forma similar, Millán *et al.* (2014) reportaron valores de GH con Alcalasa de 20.0, 22.0 y 26.5 por ciento a los 15, 30 y 60 min, respectivamente en los hidrolizados de la proteína de *Lupinus angustifolius*. Otros valores obtenidos de GH con Alcalasa están de acuerdo a previos estudios empleando otras fuentes vegetales, como para los hidrolizados con Alcalasa de la proteína de cañihua donde se obtuvieron 22.6 y 33.4 por ciento a los 30 y 120 min, respectivamente (Ochoa, 2017) y en la hidrólisis con Alcalasa de la proteína de quinua donde se alcanzó un GH de 48.0 por ciento a los 240 min (Aluko y Monu, 2003).

De acuerdo a lo mencionado a los párrafos anteriores, enzimas como Alcalasa que participan en la hidrólisis de proteínas, escinden péptidos en mayor cantidad debido a su amplia especificidad, pero esta actividad también se ve afectada por las condiciones de hidrólisis, así como de las características del sustrato.

Estudios como las de Baltodano (2016), quien trabajó con hidrolizados proteicos de frijol usando Alcalasa reporta valores de hidrólisis de 58.6 por ciento a los 60 min, donde para alcanzar este alto valor en corto tiempo se hace necesario tomar en cuenta la naturaleza de la materia prima, la temperatura, el pH y la concentración de enzima (Kristinsson y Rasco, 2000).

La concentración de enzima inicial tiene un efecto significativo en el GH dado que a mayor concentración existe una mayor escisión de péptidos o proteólisis (Zhang *et al.*, 2012). Xu *et al.* (2019a) analizaron el efecto de la concentración de Alcalasa (0.2, 0.4, 0.6 UA/g) en la hidrólisis de la proteína de sorgo obteniéndose mayores GH cuando se usó la mayor concentración de enzima. Asimismo, Cruz-Cervera *et al.* (2010) corroboran que, el aumento de la concentración de enzima, con la concentración de sustrato empleada tiene una correlación positiva, obteniendo para los hidrolizados de la proteína de frijol GH más altos en la solución enzimática de mayor concentración de enzima (0.3 UA/g frente a 0.06 y 0.03 UA/g). En el presente trabajo la concentración de enzima utilizada fue de 0.385 UA/g para la Alcalasa, que representa un ratio apropiado para obtener un buen balance en

grado de hidrólisis, capacidad antioxidante, incluso el costo de producción de hidrolizados (Xu *et al.*, 2019a).

En la Tabla 8, se puede observar también que el GH se incrementa rápidamente en los primeros 30 minutos para todos los tratamientos enzimáticos, pero después este incremento es cada vez menor y se extiende progresivamente hasta los 240 min, debido a que el sistema enzimático tiende a alcanzar el equilibrio de reacción y llega a una fase estacionaria (Xu *et al.*, 2019a). La disminución en la velocidad de hidrólisis ocurre por factores como: la disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas, posible inhibición de las enzimas causada por los productos de reacción y competencia entre proteína no hidrolizada y péptidos que empiezan a formarse constantemente durante el proceso de hidrólisis (Kong *et al.*, 2007).

Por su parte, las proteasas Neutrasa y Flavourzyme producen hidrolizados con menores grados de hidrólisis que la Alcalasa (Klompong *et al.*, 2007). La enzima Neutrasa es una endoproteasa y actúa sobre el carbono terminal de fenilalanina, leucina y valina (Gaviria-Acosta *et al.*, 2015). Para la proteína hidrolizada de tarwi, el GH con Neutrasa aumentó rápidamente hasta los 30 min y luego siguió aumentando lentamente hasta los 240 min (17.4 por ciento). Estudios con esta enzima reportan similares valores de GH en hidrolizados de proteínas de soya con un 17.5 por ciento (a los 240 min) y en la proteína de almeja con 18.0 por ciento (Zhang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2018), sin embargo también se reportan valores superiores como los encontrados en los hidrolizados de la proteína de *Erythrina edulis* (pajuro) y de quinua, con GH alrededor al 25 por ciento, mientras que en la proteína de cañihua alcanzó un GH de 35.9 por ciento (Intiquilla *et al.*, 2016; Chirinos *et al.*, 2020; Ochoa, 2017).

La enzima Flavourzyme es una mezcla de acción endoproteasa y exopeptidasa y por lo general libera pocos aminoácidos y de bajo peso molecular (Hamada, 2000). Vastag *et al.* (2011), en su estudio en un hidrolizado proteico de torta de aceite de calabaza, reportaron una hidrólisis limitada y presencia de bandas de alto y bajo peso molecular en el perfil electroforético que podrían indicar que la eficacia de la Flavourzyme se debe más a la actividad exopeptidasa que la de tipo endopeptidasa. El comportamiento de la Flavourzyme, como exoproteasa, puede explicar el GH obtenido en el hidrolizado proteico

de tarwi del presente estudio (16.7 por ciento) a los 180 min, similar a los estudios de los hidrolizados de proteína de soya, que obtuvo un GH de 17.5 por ciento a los 180 min (Farizhandi *et al.*, 2014) y en la proteína de chíá que obtuvo un GH menor al 20.0 por ciento a los 150 min (López *et al.*, 2019). El GH final alcanzado (19.2 por ciento) en este estudio para la proteína del tarwi representa 2.7 veces menos que la obtenida con Alcalasa (52.3 por ciento), siendo mayor la capacidad de hidrólisis de la Alcalasa frente a la Flavourzyme. El mismo resultado fue obtenido por Farizhandi *et al.* (2014) quienes reconocen que el GH con Alcalasa fue 1.8 veces mayor que los obtenidos con Flavourzyme en hidrolizados de la proteína de soya.

Asimismo, trabajos como los de Sbroggio *et al.* (2016) reportan mayores GH de Alcalasa respecto a Flavourzyme en el hidrolizado de la proteína del residuo de soya (33.6 versus 5.8 por ciento) o como también por Zhao *et al.* (2012) quienes evaluaron el empleo de Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme, para obtener hidrolizados de proteína de arroz, observando una mayor eficiencia de la enzima Alcalasa, seguida de Neutrasa y la de menor eficiencia, la Flavourzyme (14.5, 12.5 y 2.9 por ciento).

Por otro lado, el empleo de enzimas combinadas resulta una estrategia de mucho mayor beneficio en la mejora de la producción de péptidos bioactivos. Segura-Campos *et al.* (2013) garantiza que para obtener hidrolizados con fines comerciales (aquellos que presentan un GH > al 10 por ciento), es necesario el uso de más de una proteasa debido a que una sola enzima no logra obtener altos grados de hidrólisis en un período de tiempo razonable. En el presente estudio, en las hidrólisis enzimáticas conducidas en dos etapas, la segunda enzima se agregó a los 60 minutos de iniciada la reacción y es a partir de ahí que se ve su efecto en el GH, siendo estas significativas ( $p < 0.05$ ) (Anexo 3) solo para las secuencias Alcalasa-Flavourzyme y Neutrasa-Flavourzyme (Tabla 8), respecto al empleo de Alcalasa y Neutrasa, en una sola etapa.

Dicho comportamiento está de acuerdo con los trabajos de hidrolizados en dos etapas que incluyen a la Alcalasa en una primera etapa, demostrando que ofrecen una efectiva liberación de péptidos, como lo observado por Schlegel *et al.* (2019), al trabajar con *Lupinus angustifolius* en combinaciones con Neutrasa, Corolasa y Papaína o con otras fuentes vegetales como los encontrados en los hidrolizados de proteína de lenteja en la

cual agregando en una segunda etapa Flavourzyme, llega hasta 60 por ciento de GH (Cabanillas *et al.*, 2010) o con el hidrolizado de la proteína de quinua usando la secuencia Alcalasa – Flavourzyme a 240 min, la cual reportó GH de 61.8 por ciento (Chirinos *et al.*, 2020). En los hidrolizados de la proteína de chíá con la secuencia Alcalasa - Flavourzyme se obtuvo hidrólisis extensivas con máximos de 41.2 por ciento a los 150 min (López *et al.*, 2019); mientras que para hidrolizados de frijoles el GH fue de 43.0 por ciento con la misma secuencia (Ruiz *et al.*, 2013b) y en hidrolizados de proteína de cañihua un GH de 60.2 por ciento a los 240 min (Ochoa, 2017). Estos altos valores GH alcanzados se explica por la gran especificidad de la Alcalasa, que incrementa el número de sitios de N-terminales lo cual facilita la hidrólisis por Flavourzyme, que presenta ambas actividades (Segura-Campos *et al.*, 2011).

#### **4.2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Los valores de capacidad antioxidante (CAOX) analizada por el método ABTS<sup>+</sup> para los tratamientos enzimáticos realizadas en una y dos etapas se muestra en la Tabla 9 (los análisis estadísticos se presentan en los Anexos 4 y 5). Los resultados encontrados en este estudio revelan que la hidrólisis enzimática de la proteína de tarwi favorece la liberación de péptidos antioxidantes que estaban inactivos cuando se encontraban encriptados en la proteína intacta.

De acuerdo a la Tabla 9, se observa en todos los tratamientos de hidrólisis, un incremento de los valores antioxidantes de acuerdo al avance del tiempo de reacción. Se obtienen entonces para las hidrólisis de una etapa los mayores valores alcanzados entre los 180 y 240 min de reacción, en el siguiente orden Alcalasa > Flavourzyme > Neutrasa (1.98 - 2.0, 1.03 - 1.05 y 0.85 - 0.93  $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína, respectivamente). En las hidrólisis de dos etapas el sistema secuencial de Alcalasa-Flavourzyme, fue el que exhibió mayor valor antioxidante seguido de las secuencias Alcalasa-Neutrasa y Neutrasa-Flavourzyme también entre los tiempos 180 y 240 min (2.09 - 2.18, 1.95 - 2.01 y 1.29 - 1.41  $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína, respectivamente). Tomando en consideración, los tratamientos enzimáticos con mayores CAOX, se observó que fueron en orden de importancia Alcalasa-Flavourzyme > Alcalasa-Neutrasa ~ Alcalasa.

**Tabla 9: Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol TE/mg proteína}$ ) para cada tiempo de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Tiempo de reacción (min)	Capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol TE/mg proteína}$ ) *					
	Hidrólisis en una etapa			Hidrólisis en dos etapas		
	Alcalasa 0.385 UA/g	Neutrasa 0.385 UA/g	Flavourzyme 50 LAPU/g	Alcalasa y Neutrasa 0.385 UA / 0.385 UA	Alcalasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU	Neutrasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU
0	0.53 $\pm$ 0.15 <sup>dD</sup>	0.25 $\pm$ 0.17 <sup>eB</sup>	0.61 $\pm$ 0.13 <sup>dD</sup>	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>deF</sup>	0.37 $\pm$ 0.03 <sup>deE</sup>	0.43 $\pm$ 0.08 <sup>deF</sup>
15	1.45 $\pm$ 0.05 <sup>cC</sup>	0.73 $\pm$ 0.03 <sup>eA</sup>	0.77 $\pm$ 0.02 <sup>eC</sup>	1.32 $\pm$ 0.04 <sup>dE</sup>	1.28 $\pm$ 0.12 <sup>dD</sup>	0.76 $\pm$ 0.04 <sup>eE</sup>
30	1.62 $\pm$ 0.23 <sup>bBC</sup>	0.84 $\pm$ 0.15 <sup>cA</sup>	0.85 $\pm$ 0.02 <sup>cBC</sup>	1.47 $\pm$ 0.09 <sup>bDE</sup>	1.39 $\pm$ 0.14 <sup>bCD</sup>	0.76 $\pm$ 0.03 <sup>cE</sup>
60	1.76 $\pm$ 0.14 <sup>aAB</sup>	0.88 $\pm$ 0.12 <sup>cA</sup>	0.89 $\pm$ 0.03 <sup>cB</sup>	1.59 $\pm$ 0.12 <sup>bCD</sup>	1.51 $\pm$ 0.05 <sup>bC</sup>	0.81 $\pm$ 0.01 <sup>cE</sup>
90	1.84 $\pm$ 0.15 <sup>aAB</sup>	0.86 $\pm$ 0.15 <sup>bA</sup>	0.95 $\pm$ 0.06 <sup>bAB</sup>	1.77 $\pm$ 0.14 <sup>aBC</sup>	1.79 $\pm$ 0.07 <sup>aB</sup>	1.04 $\pm$ 0.01 <sup>bD</sup>
120	1.87 $\pm$ 0.12 <sup>aAB</sup>	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>cA</sup>	0.96 $\pm$ 0.08 <sup>cAB</sup>	1.83 $\pm$ 0.18 <sup>aAB</sup>	1.87 $\pm$ 0.02 <sup>aB</sup>	1.19 $\pm$ 0.01 <sup>bC</sup>
180	1.98 $\pm$ 0.17 <sup>aA</sup>	0.85 $\pm$ 0.17 <sup>cA</sup>	1.03 $\pm$ 0.06 <sup>cA</sup>	1.95 $\pm$ 0.07 <sup>aAB</sup>	2.09 $\pm$ 0.01 <sup>aA</sup>	1.29 $\pm$ 0.03 <sup>bB</sup>
240	2.00 $\pm$ 0.11 <sup>bA</sup>	0.93 $\pm$ 0.06 <sup>dA</sup>	1.05 $\pm$ 0.07 <sup>dA</sup>	2.01 $\pm$ 0.12 <sup>bA</sup>	2.18 $\pm$ 0.08 <sup>aA</sup>	1.41 $\pm$ 0.08 <sup>cA</sup>

\* Valores expresados como promedio  $\pm$  d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )



Precisamente los tratamientos que incluyen Alcalasa (en una etapa y en dos etapas), que previamente reportaron GH superiores respecto a los otros tratamientos (ver acápite 4.2.1), también demuestran obtener mayores valores de CAOX. Lo mencionado guarda relación con lo expuesto por Foh *et al.* (2010), quienes afirman que la capacidad antioxidante, además de la proteasa empleada, está relacionada con el GH.

Estudios en las que se reportan similar acción de la Alcalasa, para la obtención de péptidos antioxidantes, es el de Intiquilla *et al.* (2018b) quienes obtuvieron para el hidrolizado de proteína de *Lupinus mutabilis* con Alcalasa (GH de 31.7 – 45.0 por ciento) valores entre el rango 1.8 – 2.7  $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína cuando se empleó Alcalasa, confirmando el alto potencial de la proteína de tarwi para alcanzar péptidos con alta CAOX con esta enzima.

Entre otros trabajos en hidrolizados vegetales empleando Alcalasa, se tienen la hidrólisis del pajuro (*Erythrina edulis*) a los 120 min, de la cañihua y quinua a los 240 min las cuales alcanzaron con la hidrólisis con Alcalasa valores de CAOX ABTS de 2.57, 3.22 y 1.70  $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína, respectivamente (Intiquilla *et al.*, 2016; Ochoa, 2017; Chirinos *et al.*, 2020).

Dicha eficiencia de la Alcalasa para producir péptidos antioxidantes se asocia a su amplia especificidad y su preferencia en la escisión de aminoácidos hidrofóbicos que hacen de donadores de hidrógeno (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). La naturaleza de los péptidos obtenidos durante la hidrólisis resulta entonces ser favorecedor o no de la capacidad antioxidante (Cirillo y Iemma, 2012). Además de los péptidos de carácter hidrofóbico que han demostrado tener capacidades antioxidantes más fuertes (Raghavan *et al.*, 2011), los aminoácidos aromáticos tales como tirosina y la fenilalanina son considerados igualmente secuestradores de radicales porque pueden donar fácilmente protones a los radicales deficientes de electrones mientras que al mismo tiempo mantiene su estabilidad (Rajapakse *et al.*, 2005). El concentrado proteico de tarwi según el estudio de Intiquilla *et al.* (2018b) reporta la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en los péptidos, siendo este último encontrado en menor proporción, pero aun así le podría conferir efectos antioxidantes. Kong y Xiong (2006) por su parte, en su estudio en hidrolizados de la proteína de maíz reportaron la presencia de tirosina en el extremo N- terminal, representa un donante de hidrógeno muy potente y a la vez es un atributo único para los antioxidantes

eliminadores de radicales. Adicionalmente, se puede mencionar la presencia de péptidos que contienen histidina, que demuestran que pueden actuar como quelantes de iones metálicos, desactivadores de oxígeno activo y eliminadores de radicales hidroxilos (Pihlanto y Korhonen, 2006).

La incorporación secuencial de una enzima en la hidrólisis de fuentes vegetales puede favorecer la CAOX de manera óptima, tales como las secuencias de enzimas de origen bacteriano y fúngico como Alcalasa y Flavourzyme, las cuales generan una gran cantidad de oligopéptidos pequeños y medianos, que exhiben mayor actividad (Betancur-Ancona *et al.*, 2014). En este estudio, la adición secuencial de Flavourzyme en el tiempo de reacción de 60 min al tratamiento de Alcalasa, resultó en un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la CAOX a los 240 min respecto al tratamiento de solo Alcalasa (2.18 frente a 2.0  $\mu\text{mol TE/mg proteína}$ ). Dicho resultado está de acuerdo con el estudio de López *et al.* (2019) quienes reportaron para la hidrólisis de chíá con Alcalasa (GH entre 10 – 15 por ciento) una capacidad antioxidante (ABTS<sup>+</sup>) de 10.6 mmol TE/mg proteína mientras que con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme el valor obtenido fue mayor (12.5 mmol TE/mg proteína). Chen *et al.* (2020) al trabajar en hidrolizados de soya (GH < 10 por ciento) reportan los mayores valores ABTS<sup>+</sup> alcanzado con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme. Esta tendencia se podría atribuir a la Flavourzyme (endopeptidasa y exopeptidasa) que escinde los oligopéptidos generados por la Alcalasa, obteniéndose péptidos más cortos y de bajo peso molecular ricos en aminoácidos hidrofóbicos en el extremo N-terminal (prolina, fenilalanina y triptófano) (Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, la hidrólisis continua con Flavourzyme también produciría aminoácidos libres (Hamada, 2000) que reduciría la capacidad antioxidante (Aguilar, 2014).

En cuanto los tratamientos independientes realizados con la Neutrasa y la Flavourzyme, no se observaron incrementos significativos de la capacidad a partir de los tiempos 15 min y 90 min, respectivamente (Tabla 9). Es posible entonces que, para los GH alcanzados al tiempo 90 min (11.1 y 10.0 por ciento para Neutrasa y Flavourzyme, respectivamente), la mayor parte de los aminoácidos activos estén expuestos, por lo que un incremento en el GH no se manifiesta como un aumento significativo en la actividad antioxidante (Gómez *et al.*, 2013). Dicho comportamiento también se observó en los hidrolizados de pajuro, al no encontrarse alguna diferencia entre los valores ABTS<sup>+</sup> alcanzados a los 15 y 120 min

de reacción catalizada con Flavourzyme o entre los 15 y 60 min catalizada con Neutrasa (Intiquilla *et al.*, 2016). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, una hidrólisis excesiva de las proteínas puede incluso disminuir la actividad antioxidante (Kong y Xiong 2006; Salgado *et al.*, 2011), dado que conllevan a una disminución de péptidos y un aumento de aminoácidos libres, los cuales no son efectivos como antioxidantes por sí solos, ya que son necesarias las propiedades químicas y físicas conferidas por la secuencia aminoacídica, especialmente la estabilidad de los radicales peptídicos que no inician o propagan más reacciones oxidativas (Elías *et al.*, 2008).

Además de la secuencia de aminoácidos, Wang *et al.* (2013) mencionan que la cantidad de aminoácidos encontradas en su secuencia también influye en las características antioxidantes de hidrolizados reportando oligopéptidos con 2-10 aminoácidos con más poder antioxidante respecto a sus proteínas o polipéptidos nativos padres (10-50 aminoácidos). Zhang *et al.* (2011) refieren que el peso molecular de los péptidos antioxidantes derivados de alimentos, fluctúa entre 50 y 1800 Da, siendo posible que los hidrolizados proteicos de tarwi, en los tratamientos estudiados, tengan péptidos dentro del rango indicado.

Salete y Salas (2008) afirman que un conocimiento de la relación entre el GH con alguna característica funcional específica del hidrolizado permite conseguir productos con propiedades funcionales previamente definidas. En función a ello, se evaluó la asociación entre las variables GH y CAOX ABTS, a través de un análisis de correlación (Anexo 6). Los coeficientes de correlación ( $r$ ) estuvieron comprendidos entre 0.797 y 0.991, encontrándose el menor valor para el tratamiento enzimático con Neutrasa, mientras que el valor más alto se encontró para los tratamientos Alcalasa, Alcalasa-Neutrasa y Neutrasa-Flavourzyme.

Diversos estudios señalan la existencia de una correlación entre el GH y la CAOX ABTS<sup>+</sup>, tales como el trabajo de Gómez y Zapata (2016) quienes encontraron el coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9487 para el hidrolizado de plasma de bovino cuando se empleó Alcalasa como agente de hidrólisis y en otro estudio, con hidrolizados de quinua y kiwicha también se encontraron altos coeficientes de correlación ( $r$ ), para las dos variables con valores que fluctuaron entre 0.906 – 0.985 cuando se trataron con las enzimas en una etapa

con Alcalasa y Neutrasa y con la combinación secuencial de las enzimas Alcalasa-Flavourzyme, Alcalasa-Neutrasa y Neutrasa-Flavourzyme (Chirinos *et al.*, 2020).

### 4.2.3. CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La capacidad antihipertensiva evaluada a través de la inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina I (ECA) que contribuye a la reducción de la formación de angiotensina II, responsable del aumento de la presión arterial (Guevara, 2016), se realizó en los hidrolizados proteicos de tarwi para los diferentes tiempos de reacción enzimática. Los resultados (expresados en porcentaje de inhibición de la ECA a una concentración de proteína de 1 mg/mL) se presentan en la Tabla 10 (en los Anexos 7 y 8 se presentan los análisis estadísticos).

De acuerdo a la Tabla 10, al término de la hidrólisis (240 min) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la inhibición de la ECA entre los tratamientos llevados en una etapa con valores de 80.7, 66.7 y 10.5 por ciento para la Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme, respectivamente. En cuanto a las hidrólisis llevadas en dos etapas no se observó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tiempos de reacción comprendidos entre los 120 y 240 min. A los 240 min, los mayores valores de inhibición de la ECA se alcanzaron para las secuencias Alcalasa-Neutrasa y Alcalasa-Flavourzyme, seguida de la Neutrasa-Flavourzyme, (77.2, 75.2 y 40.6 por ciento, respectivamente). Comparando todos los tratamientos enzimáticos, resultó que los mejores resultados se obtuvieron con Alcalasa > Alcalasa-Neutrasa > Alcalasa-Flavourzyme.

Considerando los altos GH y valores de CAOX encontrados previamente, en los tratamientos que incluyen Alcalasa (en una y dos etapas), se observan un similar comportamiento en la inhibición de la ECA a través de sus valores encontrados respecto el resto de tratamientos. Dichos resultados están de acuerdo a la literatura, como las hidrólisis catalizadas con Alcalasa que alcanzan mayores porcentajes inhibición ECA comparados con Neutrasa y Flavourzyme, como lo observado por De Oliveira *et al.* (2020) quienes al analizar hidrolizados proteicos del subproducto de semillas de algodón, obtuvieron porcentajes inhibición ECA de 96.5 y 74.0 por ciento para las proteólisis con Alcalasa y Neutrasa, respectivamente.

**Tabla 10: Inhibición de la enzima convertidora de Angiotensina I o ECA (%) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática al concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Tiempo de reacción (min)	Inhibición de la ECA (%) *					
	Hidrólisis en una etapa			Hidrólisis en dos etapas		
	Alcalasa 0.385 UA/g	Neutrasa 0.385 UA/g	Flavourzyme 50 LAPU/g	Alcalasa y Neutrasa 0.385 UA / 0.385 UA	Alcalasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU	Neutrasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU
0	0 ± 0.0 <sup>dD</sup>	0 ± 0.0 <sup>dE</sup>	0 ± 0.0 <sup>dB</sup>	0 ± 0.0 <sup>dD</sup>	0 ± 0.0 <sup>dC</sup>	0 ± 0.0 <sup>dD</sup>
15	72.5 ± 1.05 <sup>aC</sup>	59.12 ± 0.6 <sup>bD</sup>	3.48 ± 2.43 <sup>cB</sup>	71.89 ± 0.66 <sup>aC</sup>	71.52 ± 0.14 <sup>aB</sup>	57.44 ± 0.69 <sup>bB</sup>
30	75.9 ± 0.8 <sup>aB</sup>	64.4 ± 0.1 <sup>bC</sup>	2.64 ± 1.68 <sup>cB</sup>	74.56 ± 0.94 <sup>aB</sup>	74.64 ± 2.03 <sup>aA</sup>	64.63 ± 0.41 <sup>bA</sup>
60	79.5 ± 0.15 <sup>aA</sup>	65.55 ± 0.48 <sup>dBC</sup>	1.83 ± 0.3 <sup>eB</sup>	73.74 ± 0.79 <sup>cB</sup>	76.42 ± 1.15 <sup>bA</sup>	66.45 ± 2.77 <sup>dA</sup>
90	77.45 ± 1.35 <sup>abB</sup>	69.5 ± 1.37 <sup>cA</sup>	3.23 ± 0.73 <sup>eB</sup>	78.79 ± 1.01 <sup>aA</sup>	74.47 ± 0.63 <sup>bA</sup>	53.69 ± 4.85 <sup>dB</sup>
120	80.4 ± 0.9 <sup>aA</sup>	65.43 ± 0.4 <sup>bBC</sup>	10.35 ± 3.52 <sup>dA</sup>	78.38 ± 1.08 <sup>aA</sup>	76.81 ± 1.52 <sup>aA</sup>	40.42 ± 2.54 <sup>cC</sup>
180	80.5 ± 0.59 <sup>aA</sup>	63.97 ± 1.48 <sup>dC</sup>	8.56 ± 1.9 <sup>fA</sup>	78.2 ± 1.11 <sup>bA</sup>	75.02 ± 0.6 <sup>cA</sup>	40.06 ± 1.17 <sup>eC</sup>
240	80.7 ± 1.6 <sup>aA</sup>	66.79 ± 0.92 <sup>cB</sup>	10.58 ± 4.7 <sup>eA</sup>	77.24 ± 0.83 <sup>abA</sup>	75.19 ± 2.9 <sup>bA</sup>	40.63 ± 2.53 <sup>dC</sup>

\*Valores obtenidos cuando se lleva a la concentración de 1 mg/mL de proteína. Éstos se encuentran expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

De igual modo, Ambigaipalan *et al.* (2015) en la hidrólisis en una etapa de la proteína de dátil, las hidrólisis llevadas con Alcalasa obtuvieron mayor inhibición de la ECA respecto a las hidrólisis con Flavourzyme y Termolisina (~ 60 frente a 30 y 24.2 por ciento, respectivamente). Velásquez (2017), por su parte, determinó en el hidrolizado proteico de kiwicha obtenido con Alcalasa-Neutrasa que después de 240 min de reacción, el porcentaje de inhibición de la ECA fue de 72.8 por ciento, similar al obtenido para este mismo tiempo del hidrolizado proteico de tarwi (77.2 por ciento).

En el presente estudio, al término de la hidrólisis a 240 min, la secuencia de hidrólisis Alcalasa-Neutrasa (GH 43.5 por ciento) no representó diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la ECA respecto a la Alcalasa (GH 52.3 por ciento), siendo los valores de inhibición de la ECA de 77.2 y 80.7 por ciento, respectivamente.

Por otro lado, evaluando el final de la hidrólisis en una etapa de Neutrasa, ésta reportó mayores valores de inhibición ECA que el sistema de hidrólisis secuencial Neutrasa-Flavourzyme, la cual reportó un descenso significativo ( $p < 0.05$ ) en la inhibición de la ECA a partir de los 60 min (66.45 por ciento) encontrando entre los tiempos 120 y 240 min valores de inhibición entre 40.0 y 40.6 por ciento (sin diferencias significativas).

Esta disminución puede ser atribuida a que posiblemente los péptidos activos generados por la Neutrasa se hidrolizan por acción de la Flavourzyme con acción *exo* y *endo*peptidasa, del cual se ha reportado que libera aminoácidos libres inactivos (Chen *et al.*, 2012) disminuyendo la actividad inhibitoria de la ECA. Incluso Chirinos *et al.* (2020) señalan que la adición de la Flavourzyme en una segunda etapa podría ocasionar el rompimiento de secuencias de péptidos con propiedades antihipertensivas que se formaron durante la primera etapa de hidrólisis, liberando productos de péptidos de menor actividad. La misma explicación fue propuesta por otros tratamientos enzimáticos secuenciales que afectan negativamente en la inhibición ECA como el de pepsina y tripsina en los hidrolizados proteicos de *L. luteus* (Boschin *et al.*, 2014b) o la secuencia enzimática de Alcalasa-Flavourzyme en los hidrolizados proteicos de garbanzo (Pedroche *et al.*, 2002).

Se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) entre el GH y la inhibición de la ECA para

todos los tratamientos enzimáticos evaluados (Anexo 6), encontrándose que los valores estuvieron comprendidos entre 0.758 y 0.877, el valor menor se presentó para el tratamiento en dos etapas Alcalasa-Flavourzyme y el valor mayor para Alcalasa-Neutrasa.

El término  $IC_{50}$  se refiere a la concentración media de una sustancia, como el péptido, que tiene la capacidad de inhibir una función específica bioquímica o biológica en un 50 por ciento (Bergillos y Rivas, 2013). En varios estudios el  $IC_{50}$  indica la habilidad del péptido en inhibir la ECA (Fernández *et al.*, 2014; Boschín *et al.*, 2014a), declarando que mientras menor sea este valor, el producto estudiado tendrá mejor capacidad de inhibición de la ECA. Al analizar los resultados de  $IC_{50}$  del hidrolizado proteico de tarwi, todos los tratamientos (con excepción de Flavourzyme, que obtuvo porcentajes bajos de inhibición ECA) reportaron valores en el rango de 0.11 – 1.74 mg proteína /mL (Tabla 11) (los resultados de la evaluación estadística se encuentran en el Anexo 9), siendo el tratamiento secuencial Alcalasa-Neutrasa a los 180 y 240 min seguido del tratamiento en una etapa Alcalasa 240 min los que obtuvieron mejores resultados (0.11, 0.12 y 0.16 mg/mL, respectivamente). Estos cálculos y evaluación estadística se reportan en el Anexo 10.

De acuerdo a estudios realizados en diferentes tipos de lupinos, se encontraron que los valores obtenidos en este estudio fueron cercanos a los  $IC_{50}$  para hidrolizados proteicos de *L. luteus* con pepsina y la secuencia pepsina-tripsina (0.176 y 0.181 mg/mL, respectivamente) o los hidrolizados de *L. albus* y *L. angustifolius*, obtenidos con pepsina, alcanzando valores  $IC_{50}$  de 0.197 y 0.185 mg/mL, respectivamente (Boschín *et al.*, 2014b).

Analizando otras fuentes vegetales, Hanafi *et al.* (2018) encontraron en el hidrolizado proteico de soya con Alcalasa a los 120 min un  $IC_{50}$  de 0.20 mg/mL similar al obtenido para el tarwi a dicho tiempo (0.24 mg/mL); en el estudio de Chirinos *et al.* (2018) encontraron para el hidrolizado proteico de cañihua con la secuencia Alcalasa-Neutrasa 180 min un valor  $IC_{50}$  de 0.15 mg/mL y en el hidrolizado proteico de quinua con Alcalasa-Neutrasa a los 240 min se alcanzó el valor de 0.10 mg/mL (Chirinos *et al.*, 2020). En base a los estudios mencionados anteriormente, se puede señalar al tarwi como una valiosa fuente más para obtener péptidos antihipertensivos.

**Tabla 11: IC<sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la ECA para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Tratamiento enzimático	Tiempo de hidrólisis enzimática (min)	IC <sub>50</sub> ECA (mg/mL)
Alcalasa	120	0.24 ± 0.01 <sup>cd</sup>
	180	0.26 ± 0.02 <sup>c</sup>
	240	0.16 ± 0.01 <sup>f</sup>
Neutrasa	120	0.25 ± 0.005 <sup>cd</sup>
	180	0.18 ± 0.01 <sup>ef</sup>
	240	0.17 ± 0.01 <sup>ef</sup>
Flavourzyme	120	NE
	180	NE
	240	NE
Alcalasa y Neutrasa	120	0.21 ± 0.01 <sup>de</sup>
	180	0.11 ± 0.01 <sup>g</sup>
	240	0.12 ± 0.01 <sup>g</sup>
Alcalasa y Flavourzyme	120	0.36 ± 0.05 <sup>b</sup>
	180	0.39 ± 0.04 <sup>b</sup>
	240	0.37 ± 0.02 <sup>b</sup>
Neutrasa y Flavourzyme	120	1.52 ± 0.04 <sup>a</sup>
	180	1.74 ± 0.1 <sup>a</sup>
	240	1.67 ± 0.15 <sup>a</sup>

NE: No encontrado a la concentración > 5 mg/mL

\*Valores expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Aquellos valores que presentan diferentes letras en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

Por su parte, Torruco-Uco *et al.* (2009) encontraron valores IC<sub>50</sub> de la inhibición ECA mucho menores que los encontrados en el presente estudio, reportando en las hidrólisis con la Alcalasa en proteínas de *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* valores IC<sub>50</sub> de 0.056 (a los 90 min) y 0.061 (a los 60 min) mg/mL, respectivamente. De igual manera, Salazar-Vega *et al.* (2012) reportan valores IC<sub>50</sub> de 8.86 µg/mL en el hidrolizado de la proteína de chíá con la secuencia enzimática Alcalasa-Flavourzyme.

Además del rol significativo que desempeñan las enzimas proteolíticas que se emplean en las hidrólisis de proteínas parentales a las condiciones experimentales utilizadas (Yust *et*



*al.*, 2003), las variaciones en la inhibición ECA descritas en estudios se atribuyen esencialmente a la composición del péptido. Así lo declaran Wu *et al.* (2006), quienes confirman que la habilidad de los péptidos para inhibir la ECA recae en la naturaleza de éstos, mostrando importancia en los residuos hidrofóbicos y aromáticos (como fenilalanina, tirosina y triptófano), los residuos de prolina en la cadena C-terminal que contribuye la mejora de la potencia inhibitoria. Estas características son particularmente adecuadas para interactuar a través de la formación de puentes de hidrógeno con el sitio catalítico de la ECA, permitiendo así su inhibición (Lammi *et al.*, 2019).

#### **4.2.4. CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE**

La capacidad hipoglucemiante fue evaluada mediante la inhibición de tres enzimas presentes en el metabolismo de los carbohidratos. Éstos son la enzima  $\alpha$ -amilasa, la  $\alpha$ -glucosidasa y la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

##### **a. INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA**

Una de las maneras de evaluar la capacidad hipoglucemiante de los péptidos obtenidos de cualquier hidrolizado es midiendo la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa comparando con acarbosa como inhibidor de referencia (Abu *et al.*, 2004). Los valores de porcentaje de inhibición, se encontraron en entre el 2.0 y 23.5 por ciento, los cuales fueron determinados a la concentración de 15 mg/mL; respecto a la inhibición producida por la acarbosa (80 por ciento) trabajando a una concentración de 1 mg/mL, lo que indica que la actividad inhibitoria de los péptidos está condicionada por la concentración utilizada de los mismos, así como por la naturaleza del péptido obtenido. Los péptidos presentes en el hidrolizado de tarwi suprimirían la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, retrasando por lo tanto el aumento de la glucosa sanguínea (Yilmazer-Musa *et al.*, 2012), encontrándose efectos a concentraciones de 15 mg/mL en adelante.

En la Tabla 12 (evaluación estadística en los Anexos 11 y 12), se presenta los resultados obtenidos en el análisis de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa a diferentes tiempos de hidrólisis de la proteína de tarwi. De ella podemos destacar en las hidrólisis de una etapa, es el tratamiento con Neutrasa 120 min es el que obtiene mayor inhibición (19.2 por ciento)

**Tabla 12: Inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa (por ciento) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Inhibición de la $\alpha$ -amilasa (por ciento) *						
Tiempo de reacción (min)	Una etapa de hidrólisis			Dos etapas de hidrólisis		
	Alcalasa 0.385 UA/g	Neutrasa 0.385 UA/g	Flavourzyme 50 LAPU/g	Alcalasa y Neutrasa 0.385 UA / 0.385 UA	Alcalasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU	Neutrasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU
0	3.17 ± 1.42 <sup>efE</sup>	7.4 ± 0.28 <sup>dE</sup>	3.51 ± 0.8 <sup>eE</sup>	3.94 ± 0.57 <sup>eG</sup>	2.04 ± 0.07 <sup>fH</sup>	6.43 ± 0.38 <sup>dD</sup>
15	3.96 ± 1.1 <sup>gE</sup>	12.57 ± 0.36 <sup>dD</sup>	4.05 ± 0.6 <sup>gE</sup>	8.7 ± 0.45 <sup>eF</sup>	7.25 ± 1.09 <sup>fG</sup>	8.74 ± 0.23 <sup>eD</sup>
30	6.14 ± 0.53 <sup>gD</sup>	12.75 ± 0.17 <sup>dD</sup>	5.71 ± 0.26 <sup>gD</sup>	10.52 ± 0.67 <sup>eE</sup>	11.24 ± 0.38 <sup>eF</sup>	8.54 ± 0.89 <sup>fD</sup>
60	9.5 ± 0.09 <sup>eC</sup>	12.36 ± 1.69 <sup>dD</sup>	7.97 ± 0.62 <sup>eC</sup>	9.45 ± 0.87 <sup>eEF</sup>	14.1 ± 0.35 <sup>cdE</sup>	14.98 ± 1.4 <sup>cC</sup>
90	10.53 ± 0.56 <sup>eBC</sup>	14.66 ± 1.01 <sup>cdC</sup>	9.37 ± 0.41 <sup>eB</sup>	12.28 ± 1.2 <sup>deD</sup>	17.76 ± 1.57 <sup>bD</sup>	16.73 ± 3.22 <sup>bcC</sup>
120	10.92 ± 0.5 <sup>eBC</sup>	19.29 ± 0.23 <sup>baA</sup>	12.45 ± 0.12 <sup>dA</sup>	14.15 ± 0.53 <sup>cC</sup>	20.73 ± 0.59 <sup>aC</sup>	20.43 ± 1.67 <sup>abB</sup>
180	14.2 ± 0.87 <sup>cA</sup>	16.38 ± 1.12 <sup>cB</sup>	11.33 ± 1.49 <sup>dA</sup>	20.82 ± 0.17 <sup>bB</sup>	23.18 ± 0.89 <sup>aA</sup>	23.52 ± 2.24 <sup>aA</sup>
240	11.13 ± 0.58 <sup>dB</sup>	16.34 ± 0.34 <sup>cB</sup>	8.09 ± 0.84 <sup>eBC</sup>	22.72 ± 0.54 <sup>abA</sup>	21.6 ± 0.7 <sup>bB</sup>	23.53 ± 0.98 <sup>aA</sup>

\*Valores obtenidos cuando se lleva a la concentración de 15 mg/mL de proteína. Éstos se encuentran expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

seguido de Alcalasa 180 min (14.2 por ciento), mientras que para Flavourzyme a los 120 min alcanza el valor de 12.4 por ciento. En cuanto a las hidrólisis en un sistema secuencial, son los hidrolizados con la secuencia Alcalasa-Neutrasa y Neutrasa-Flavourzyme, ambos a 240 min, los que expusieron mayor inhibición  $\alpha$ -amilasa con valores de 22.7 y 23.5 por ciento, respectivamente. De acuerdo a los datos obtenidos de la Tabla 12 ningún tratamiento llegó a un efecto inhibitorio cercano o mayor a 50 por ciento, como los que se encontraron en los hidrolizados de la proteína de la semilla de melinjo con Alcalasa (Supriyadi *et al.*, 2019), el del hidrolizado proteico de germen de trigo con Alcalasa, Tripsina y Flavourzyme alcanzando valores inhibición  $\alpha$ -amilasa cercanos al 60 por ciento a la concentración de 20 mg/mL (Karimi *et al.*, 2020) o los encontrados por Megrous *et al.* (2020) en los hidrolizados de caseína metalo-endopeptidasa, obteniéndose bajo ciertas condiciones de hidrólisis (pH 7.5, 40 °C a 3 h) valores de inhibición  $\alpha$ -amilasa (74.10 – 77.15 por ciento, a la concentración de 5 mg/mL). Del mencionado estudio además se destaca que el GH alcanzado fue de 7.68 por ciento, evidenciando que el GH no necesariamente tiene relación directa con la inhibición  $\alpha$ -amilasa.

En referencia al anterior estudio, también explicaría por qué hubo una disminución en la inhibición  $\alpha$ -amilasa en los últimos tiempos de hidrólisis en una etapa (a pesar que alcanzaron mayor GH, ver acápite 4.2.1). Xu *et al.* (2019a) indican que una hidrólisis excesiva puede reducir incluso la habilidad de péptidos en sus propiedades bioactivas. Por ejemplo, Admassu *et al.* (2018) hidrolizaron con Alcalasa y Neutrasa la proteína de *Porphyra* spp reconociendo que la inhibición  $\alpha$ -amilasa alcanzó el máximo valor a los 60 min (31.7 y 18.2 por ciento, respectivamente) y a partir de ahí empezó a disminuir significativamente, evidenciando el efecto del tiempo de hidrólisis y enzima empleada.

Además de la enzima utilizada durante la hidrólisis, el efecto inhibitorio de la  $\alpha$ -amilasa depende de la naturaleza del sustrato, las condiciones de hidrólisis empleadas, incluso su purificación posterior. Sosa *et al.* (2018) analizaron las fracciones peptídicas (alcanzadas con ultrafiltración) del hidrolizado proteico de chía con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme y obtuvieron un mejor efecto inhibitorio de la  $\alpha$ -amilasa de las fracciones con mayores pesos moleculares, las cuales alcanzaron un 39.9 por ciento de inhibición. En otro estudio, Karimi *et al.* (2020) compararon la misma inhibición, entre el

hidrolizadoproteico del germen de maíz y las fracciones de éste, alcanzando mayores resultados con este último ( $p < 0.05$ ).

Se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) entre el GH y la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa para todos los tratamientos enzimáticos evaluados (Anexo 6), encontrándose que los valores estuvieron comprendidos entre 0.726 y 0.952, el valor menor se presentó para el tratamiento con Flavourzyme y el valor mayor para el tratamiento secuencial Alcalasa-Flavourzyme.

Mazur y Nakatani (1993) afirman que existe una acción de ataque múltiple de la  $\alpha$ -amilasa en la escisión de enlaces glucosídicos de los polímeros de almidón, es decir se desliza a lo largo de la cadena de polisacáridos de sustrato sin disociación entre las sucesivas escisiones. Este mecanismo puede estar obstaculizado por el péptido inhibidor, que según Siow y Gan (2016) pueden establecer puentes de hidrógeno con los residuos de la región de unión al sustrato interrumpiendo la interacción entre la enzima y el sustrato provocando que la cadena de polisacáridos de sustrato esté menos susceptible a la acción de ataque múltiple de las amilasas. Los péptidos inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa están relacionados con aminoácidos catiónicos y de cadena ramificada como la tirosina, fenilalanina, tripsina y lisina (Motyan *et al.*, 2013), pero también se le ha relacionado con el aminoácido ubicado en el extremo N y C-terminal, entre ellos la glicina, fenilalanina y leucina (Ngoh y Gan, 2016).

#### **b. INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA**

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa retrasan la digestión de carbohidratos por inhibición competitiva de estas enzimas (Sosa *et al.*, 2018). Un ejemplo de ello son los péptidos que, debido a su estructura química, pueden interactuar en la cavidad catalítica de enzimas digestivas como la  $\alpha$ -glucosidasa e inhibir su acción, beneficiando la regulación de la glucemia (Mojica y De Mejía, 2016).

En la Tabla 13 (análisis estadístico en los Anexos 13 y 14) se detallan los valores numéricos porcentuales de aquellos tratamientos enzimáticos en los cuales se encontró actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa, éstos son los realizados en una etapa con Neutrasa

y en dos etapas secuenciales con Neutrasa-Flavourzyme. De ambos se puede observar que los mayores valores se alcanzaron a los 240 min con 9.8 y 15.3 por ciento, respectivamente. Dichos porcentajes son inferiores a los valores encontrados en los hidrolizados de la proteína de *Phaseolus vulgaris* con la secuencia pepsina-pancreatina, las cuales reportaron entre 60 y 70 por ciento de inhibición a la concentración de 0.6 mg/mL (Mojica *et al.*, 2014), en la proteína de la semilla *Camellia oleifera* con Alcalasa, Tripsina y Papaína, todos con valores alrededor del 20 por ciento a 2 mg/mL (Feng *et al.*, 2020).

**Tabla 13: Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (por ciento) para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa (por ciento) *		
Tiempo de reacción (min)	Una etapa	Dos etapas
	Neutrasa 0.385 UA/g	Neutrasa y Flavourzyme 0.385 UA/ 50 LAPU
0	0 $\pm$ 0.0 <sup>dD</sup>	0 $\pm$ 0.0 <sup>dE</sup>
15	6.26 $\pm$ 0.18 <sup>cC</sup>	6.0 $\pm$ 0.12 <sup>cD</sup>
30	7.79 $\pm$ 0.31 <sup>bB</sup>	7.52 $\pm$ 0.42 <sup>bC</sup>
60	7.69 $\pm$ 0.78 <sup>bB</sup>	7.58 $\pm$ 0.44 <sup>bC</sup>
90	7.68 $\pm$ 0.77 <sup>bB</sup>	8.46 $\pm$ 0.77 <sup>bC</sup>
120	7.72 $\pm$ 0.38 <sup>aB</sup>	12.74 $\pm$ 0.50 <sup>bB</sup>
180	6.44 $\pm$ 1.28 <sup>cC</sup>	13.05 $\pm$ 0.21 <sup>bB</sup>
240	9.8 $\pm$ 0.44 <sup>bA</sup>	15.34 $\pm$ 1.52 <sup>aA</sup>

Nota: Los demás tratamientos enzimáticos (Alcalasa, Flavourzyme, Alcalasa y Neutrasa, Alcalasa y Flavourzyme) no reportaron actividad de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa

\*Valores obtenidos cuando se lleva a la concentración de 15 mg/mL de proteína. Éstos se encuentran expresados como promedio  $\pm$  d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras minúsculas en una misma fila y diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

Yu *et al.* (2011) analizaron los hidrolizados de la proteína de huevo con Alcalasa, de las cuales no se encontró valores inhibitorios en  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa. Ello podría deberse no sólo al modo de acción de la enzima seleccionada para la hidrólisis, sino

también estaría influyendo la fuente de proteína empleada. En la literatura se encuentran otras fuentes de proteínas que poseen altos porcentajes de inhibición  $\alpha$ -glucosidasa, éstos son los hidrolizados de la proteína de cáñamo con Alcalasa que alcanzó a una concentración de 20 mg/mL el valor de 60 por ciento (Ren *et al.*, 2016), la proteína del subproducto de los granos cerveceros con Alcalasa y Tripsina que alcanzaron a una concentración de 7.5 mg/mL valores entre 50 a 66.8 por ciento (Connolly *et al.*, 2014) o los hidrolizados de germen de trigo con Alcalasa y Flavourzyme que alcanzaron valores de inhibición alrededor del 40 por ciento a una concentración de 20 mg/mL (Karimi *et al.*, 2020).

De la Tabla 13 también se observa el aumento de la respuesta de inhibición cuando se añade una segunda enzima, tratamiento secuencial Neutrasa-Flavourzyme, con diferencias significativas en los últimos tiempos de reacción (120 – 240 min). Se corrobora entonces un efecto sinérgico de las enzimas hidrolíticas en la inhibición  $\alpha$ -glucosidasa como lo estudiado en los hidrolizados de la proteína de chíá con las secuencias Alcalasa-Flavourzyme y pepsina-pancreatina (Sosa *et al.*, 2018) o los hidrolizados de *Phaseolus vulgaris* con pepsina-pancreatina (Mojica *et al.*, 2014).

Entonces, el mayor efecto inhibitorio de la  $\alpha$ -glucosidasa encontrada en la secuencia Neutrasa - Flavourzyme puede explicarse a una mayor interacción entre el sustrato y las enzimas que resulta en la liberación del péptido inhibitorio. De ahí que, cuando el tiempo de interacción aumentó, las enzimas en tiempo suficiente obtuvieron péptidos más cortos que influyen en la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa (Ngho y Gan, 2016). Ren *et al.* (2016) destacan la presencia de péptidos de cadena corta que incluyen los aminoácidos leucina y prolina (hidrófobo) que contribuyen en gran medida la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa. Matsui *et al.* (1999) por su parte, resaltan la presencia de aminoácidos alifáticos (como leucina, glicina) en el extremo C-terminal de la secuencia de péptidos como favorable para inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa, incluso más que los aminoácidos aromáticos; siendo probable que dichos aminoácidos formen parte de la composición de los péptidos de los hidrolizados de la proteína de tarwi con Neutrasa y la secuencia Neutrasa-Flavourzyme. Se determinó el coeficiente de correlación (r) entre el GH y la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (Anexo 6), encontrándose como valores de 0.790 para la Neutrasa y de 0.954 para la Neutrasa-Flavourzyme.

**c. INHIBICIÓN DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV**

La evaluación de la inhibición de la DPP-IV se realizó a través de la determinación de su valor IC<sub>50</sub>, los resultados se presentan en la Tabla 14 (resultados estadísticos en Anexo 15 y 16).

**Tabla 14: IC<sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la DPP-IV para diferentes tiempos de hidrólisis enzimática del concentrado proteico de tarwi realizada en una y dos etapas**

Tratamiento enzimático	Tiempo de hidrólisis enzimática (min)	IC <sub>50</sub> DPP-IV (mg de proteína/mL)
Alcalasa	120	3.21 ± 0.04 <sup>cd</sup>
	180	2.44 ± 0.21 <sup>ef</sup>
	240	2.14 ± 0.09 <sup>g</sup>
Neutrasa	120	3.11 ± 0.08 <sup>cd</sup>
	180	2.98 ± 0.15 <sup>cd</sup>
	240	2.97 ± 0.07 <sup>cd</sup>
Flavourzyme	120	NE
	180	NE
	240	3.65 ± 0.27 <sup>b</sup>
Alcalasa y Neutrasa	120	2.94 ± 0.17 <sup>d</sup>
	180	2.58 ± 0.21 <sup>e</sup>
	240	2.61 ± 0.19 <sup>e</sup>
Alcalasa y Flavourzyme	120	2.25 ± 0.23 <sup>fg</sup>
	180	2.44 ± 0.23 <sup>ef</sup>
	240	2.13 ± 0.01 <sup>g</sup>
Neutrasa y Flavourzyme	120	NE
	180	4.21 ± 0.06 <sup>a</sup>
	240	3.25 ± 0.11 <sup>c</sup>

NE: No encontrada hasta valores superiores a 6 mg/mL

\*Valores expresados como promedio ± d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

De acuerdo a la Tabla 14, el valor IC<sub>50</sub> para el hidrolizado proteico de tarwi se encuentran en el rango de 2.13 y 4.21 mg/mL, destacando los tratamientos con Alcalasa a los 240 min, las secuencias Alcalasa-Flavourzyme a los 240 min y Alcalasa-Neutrasa a los 180 min con

valores  $IC_{50}$  de 2.14, 2.13 y 2.58 mg/mL, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los dos primeros. Estos valores fueron mayores que los valores  $IC_{50}$  (1.5 mg/mL) en hidrolizados de la proteína de frijol con Alcalasa (De Souza Rocha *et al.*, 2014), hidrolizados de la proteína de quinua con papaína (0.88 mg/mL) (Nongonierma *et al.*, 2015) e hidrolizados en la proteína de colza con Alcalasa-Tripsina ( $IC_{50} = 0.68$  mg proteína/mL) (Xu *et al.*, 2019b), las cuales evidencia la estrecha relación entre la actividad inhibidora de la DPP-IV con las proteasas empleadas y la calidad del péptido.

En mención a los tres tratamientos enzimáticos que expresaron mejores resultados, se determinaron anteriormente que poseen altos GH (ver acápite 4.2.1), de las cuales Alcalasa-Flavourzyme a los 240 min obtuvo mayor GH, seguido de Alcalasa 240 min y luego Alcalasa-Neutrasa 180-240 min (GH de 56.33, 52.3 y 40.49 por ciento, respectivamente).

Dado ello, se puede explicar que en algunos casos una hidrólisis extensiva como en la secuencia Alcalasa-Flavourzyme puede favorecer la obtención de péptidos inhibidores de la DPP-IV, como los reportados por Xu *et al.* (2019b) en los hidrolizados de la proteína de colza con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme (GH de 20.57 por ciento), las cuales alcanzaron de la DPP-IV, como los reportados por Xu *et al.* (2019b) en los hidrolizados de la proteína de colza con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme (GH de 20.57 por ciento), las cuales alcanzaron mejores valores  $IC_{50}$  de hasta 0.89 mg/mL respecto a la Alcalasa-pepsina (GH de 16.24 por ciento) y la Alcalasa-papaína (GH de 18.62 por ciento). Sin embargo, no se debe exceder la hidrólisis porque favorecería en la pérdida de la composición de los péptidos con capacidades bioactivas.

Se ha descrito en estudios, como los de Nongonierma y Fitzgerald (2015) similitudes estructurales entre los inhibidores de la ECA y la DPP-IV, como la presencia de residuos de prolina en las secuencias Xaa-Prolina, Prolina-Xaa o Xaa-Alanina, donde Xaa es cualquier aminoácido; que los caracteriza por ser inhibidores de la DPP-IV. Además, la presencia de aminoácidos aromáticos, triptófano, tirosina y fenilalanina en la secuencia de los péptidos podría mejorar la inhibición de DPP-IV (Lacroix y Li-Chan, 2012).



Por otro lado, Intiquilla *et al.* (2018a) aseguran que la obtención de péptidos u oligopéptidos de pequeños tamaños a partir de las proteínas de tarwi son los principales responsables de la actividad inhibitoria de la DPP-IV, tales como ellos reportan en su investigación al trabajar con las fracciones peptídicas de tres rangos de tamaños ( $> 10$  kDa,  $3-10$  kDa y  $< 3$  kDa) del hidrolizado de la proteína de *Lupinus mutabilis* con la secuencia pepsina-pancreatina-Alcalasa de las cuales los péptidos menores a 3 kDa alcanzaron mayor efecto inhibitorio de la enzima dipeptidil peptidasa IV (0.06 mg proteína/mL).

Duranti (2006) menciona que uno de los principios activos responsables de la capacidad de control glicémico atribuida a la proteína específica del tarwi, es la denominada  $\gamma$ -conglutina, con capacidad de unión a algunas pequeñas proteínas reguladoras, incluida la insulina. Por ello es considerada como una proteína hipoglucemiante, demostrada en cultivos celulares e *in vivo*, que son adecuados para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Rodríguez, 2016). Por ejemplo, Muñoz *et al.* (2018) estudiaron los hidrolizados de la fracción proteínica  $\gamma$ -conglutina de *Lupinus mutabilis* con el tratamiento secuencial pancreatina-pepsina de las que reportan valores inhibición de la DPP-IV superiores al 50 por ciento (2 mg/mL) alcanzando el 100 por ciento de inhibición con el valor de concentración 5 mg/mL.

Por su parte, Lammi *et al.* (2016) identificaron varias secuencias de péptidos encontrados en los hidrolizados con pepsina en la  $\gamma$ -conglutina de tarwi, de las cuales, la fracción LTFPGSAED (leucina – treonina – fenilalanina – prolina – glicina – serina – alanina - ácido glutámico - ácido aspártico) presentó mayor inhibición DPP-IV ( $IC_{50} = 228 \mu M$ ) resaltando que estos péptidos inhibidores son igual de excelentes comparada con otras fuentes como la soya. Estos autores precisan que el péptido inhibidor de la DPP-IV debe mostrar un carácter hidrófobo, tener una longitud que oscile de 2 a 8 residuos de aminoácidos y contener un residuo prolina situado en la primera, segunda, tercera o cuarta del extremo N-terminal.

#### 4.3. ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE TARWI A LAS CONDICIONES DE DIGESTIÓN *in vitro*

Los hidrolizados empleados en esta evaluación son aquellos que alcanzaron mejores respuestas en los análisis mencionados anteriormente, que los puede indicar como fuente de péptidos multifuncionales, es decir, que presentan dos o más actividades biológicas simultánea (Vilcacundo, 2017). Para ello, se analizó a los hidrolizados: Alcalasa a los 240 min (IC<sub>50</sub> de ECA de  $0.16 \pm 0.01$  mg/mL, IC<sub>50</sub> de la DPP-IV de  $2.14 \pm 0.09$  mg/mL y CAOX de  $2.0 \pm 0.11$   $\mu$ mol TE/mg proteína) y la secuencia Alcalasa-Neutrasa a los 180 min (IC<sub>50</sub> de ECA de  $0.11 \pm 0.01$  mg/mL, IC<sub>50</sub> de la DPP-IV de  $2.58 \pm 0.21$  mg/mL y CAOX de  $1.95 \pm 0.07$   $\mu$ mol TE/mg proteína) en su estabilidad frente a las condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro* empleando la secuencia de enzimas pepsina y pancreatina, para luego determinar sus valores de capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup> y valores IC<sub>50</sub> de la ECA y la DPP-IV. Los resultados de esta evaluación se detallan en la Tabla 15 (evaluación estadística en los Anexos 17, 18 y 19).

**Tabla 15: Valores obtenidos para diferentes análisis durante la digestión *in vitro* del hidrolizado de tarwi con Alcalasa -Neutrasa a 180 minutos y Alcalasa 240 minutos**

		Capacidad Antioxidante ( $\mu$ mol TE/mg)	IC <sub>50</sub> (ECA)	IC <sub>50</sub> (DPP-IV)
Alcalasa y Neutrasa (AN) 180 min	Hidrolizado AN 180	$1.95 \pm 0.09^b$	$0.10 \pm 0.005^d$	$2.58 \pm 0.21^a$
	Pepsina	$1.31 \pm 0.11^c$	$0.11 \pm 0.005^d$	$2.39 \pm 0.16^a$
	Pepsina y pancreatina	$3.02 \pm 0.04^a$	$0.13 \pm 0.001^c$	$1.53 \pm 0.04^c$
Alcalasa (A) 240 min	Hidrolizado A 240	$2.00 \pm 0.11^b$	$0.17 \pm 0.01^a$	$2.14 \pm 0.09^b$
	Pepsina	$1.20 \pm 0.07^c$	$0.15 \pm 0.006^b$	$2.14 \pm 0.05^b$
	Pepsina y pancreatina	$2.92 \pm 0.07^a$	$0.17 \pm 0.001^a$	$2.01 \pm 0.05^b$

\* Valores expresados como promedio  $\pm$  d.s (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras en una misma columna indican que existen diferencias significativas cuando se sujetan a la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

De acuerdo a la Tabla 15, los valores de la capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup> para ambos hidrolizados sufre una caída cuando se someten a la digestión con pepsina. Sin embargo, una vez completada la fase con pancreatina, estos valores se vieron incrementados significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a los valores iniciales de cada hidrolizado.

Ello indicaría que las enzimas digestivas fueron capaces de modificar la estructura química de dichas proteínas permitiendo la liberación y/o exposición de nuevos péptidos, ejerciendo así sus propiedades reductoras (Pazinatto *et al.*, 2013). El incremento en la CAOX ABTS<sup>+</sup> en el digerido guarda relación con el trabajo de Orsini *et al.* (2016) en un hidrolizado de la proteína de kiwicha obtenido con Alcalasa que mejoró su capacidad antioxidante después de la digestión con pepsina-pancreatina respecto al hidrolizado inicial ( $p < 0.05$ ).

En un estudio donde se empleó un hidrolizado proteico del subproducto de la soya, Singh *et al.* (2014) señalan que la digestión con pepsina no alteró la CAOX ABTS<sup>+</sup> indicando que dichos péptidos conservaron su estructura intacta y su actividad en la presencia de esta enzima, atribuyendo solo a la digestión con pancreatina el incremento de la CAOX. Dicho comportamiento puede adjudicarse al hidrolizado de tarwi, señalando que la fase de digestión con la pancreatina es la que mejoró el efecto antioxidante. Similar incremento en la capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup> se observó en los digeridos después de la pancreatina de los hidrolizados proteicos del músculo de *Nemipterus hexodon* (Nalinannon *et al.*, 2012) y *Misgurnus anguillicaudatus* (You *et al.*, 2010).

Evaluando la capacidad de inhibición a la ECA según su valor IC<sub>50</sub>, se puede apreciar en la Tabla 15 que, para la secuencia de Alcalasa-Neutrasa 180 min, éste aumenta significativamente de 0.10 a 0.13 mg proteína/mL, evidenciando que el efecto inhibitor de la ECA disminuye muy poco. En tanto para Alcalasa 240 min el valor IC<sub>50</sub> disminuye en la fase con pepsina, pero éste regresa a su valor inicial después de la fase con pancreatina sin diferencias significativas encontradas entre el valor IC<sub>50</sub> inicial y final, comportamiento similar a los obtenidos antes y después de la digestión *in vitro* de los hidrolizados de quinua con Neutrasa con valores IC<sub>50</sub> de 0.08 y 0.07 mg/mL, respectivamente (Chirinos *et al.*, 2020). Lo mismo también se observó en hidrolizados de kiwicha sometidas a las mismas condiciones de digestión, pero en mayor medida, donde se obtuvo menores valores IC<sub>50</sub>

durante la fase gástrica (39  $\mu\text{g/mL}$ ) mientras que después de la fase gastroduodenal (pancreatina) el grado de inhibición retornó al valor inicial (81-88  $\mu\text{g/mL}$ ), lo que indica que algunos péptidos inhibidores de la ECA liberados por la pepsina fueron hidrolizados por la acción de la pancreatina (Vilcacundo *et al.*, 2019). Lo y Li-Chan (2005) afirman que de la digestión *in vitro* de la proteína de soya, los péptidos generados en la fase de digestión con pepsina tienen mejor efecto inhibitorio ECA que, los péptidos generados después de la subsecuente digestión con pancreatina.

En otros hidrolizados de otras fuentes vegetales, se hallaron un mejor efecto inhibitorio de la ECA de los digeridos *in vitro* respecto al producto inicial sin digerir, como los de la proteína de soya, cuyos productos de la digestión (pepsina-pancreatina) alcanzaron valores  $\text{IC}_{50}$  de 0.28 mg/mL frente al valor 0.73 mg/mL del hidrolizado sin digerir (Lo y Li-Chan, 2005) y en la proteína de harina de *Lupinus albus* desgrasada que alcanzó después de la digestión con pepsina y pancreatina valores  $\text{IC}_{50}$  de 0.21 – 0.33 mg/mL (Yoshie-Stark *et al.*, 2004).

Por último, al analizar los valores de  $\text{IC}_{50}$  de la actividad DPP-IV, se observa que para el tratamiento Alcalasa 240 min no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el hidrolizado inicial y el producto digerido, mientras que para la secuencia enzimática Alcalasa-Neutrasa a los 180 min el valor  $\text{IC}_{50}$  disminuye significativamente de 2.58 a 1.53 mg proteína/mL, estableciéndose un mejor efecto inhibitorio para esta enzima. Este comportamiento ha sido descrito por Nongonierma y Fitzgerald (2015) en los hidrolizados de las proteínas del cáñamo y arroz sometidos a las condiciones de digestión *in vitro* con el sistema secuencial pepsina-pancreatina. Para ambos hidrolizados, el valor final  $\text{IC}_{50}$  de la DPP-IV disminuyó significativamente respecto al producto sin digerir obteniéndose para los productos digeridos del cáñamo el valor  $\text{IC}_{50}$  de 3.09 mg/mL ( $\text{IC}_{50}$  inicial antes de la digestión= 3.82 mg/mL), mientras que para el arroz el valor final  $\text{IC}_{50}$  fue 1.21 mg/mL ( $\text{IC}_{50}$  inicial antes de la digestión= 1.60 mg/mL).

Vilcacundo *et al.* (2017) encontraron que, para la proteína de quinua, cuyo valor  $\text{IC}_{50}$  DPP-IV inicial fue de 2.42 mg/mL, su digerido final alcanzó el valor  $\text{IC}_{50}$  de 0.25 mg/mL, mientras que Velarde-Salcedo *et al.* (2013) obtuvieron en el digerido final con la secuencia pepsina-pancreatina-tripsina de la proteína de amaranto el valor  $\text{IC}_{50}$  de 1.1 mg/mL.

Vilcacundo (2017) explica que la acción continuada en el tiempo de la pancreatina permite en ciertos casos, la liberación de una mayor cantidad de péptidos con una potente actividad inhibidora de la DPP-IV, como lo observado para el hidrolizado de tarwi con Alcalasa-Neutrasa a los 180 min. Sin embargo, la simulación *in vitro* puede incluso no influenciar la generación de más péptidos inhibidores debido a la resistencia de los hidrolizados a tales condiciones o a la presencia de péptidos de cadena corta (Nongonierma y Fitzgerald, 2013). En otros trabajos con otras fuentes vegetales, no se encontró variación significativamente el valor  $IC_{50}$  de la DPP-IV después de la digestión *in vitro*, tal es el caso de los hidrolizados en la proteína de guisante que reportan Nongonierma y Fitzgerald (2015) y los encontrados en la soya, también reportado por los mismos autores.

## V. CONCLUSIONES

1. Los mayores grados de hidrólisis de la proteína de tarwi se obtuvieron a los 240 minutos de reacción tanto en las reacciones de una y dos etapas; alcanzando el más alto valor con la secuencia Alcalasa-Flavourzyme, seguido del tratamiento con Alcalasa y Alcalasa-Neutrasa ( $56.33 \pm 0.34$ ,  $52.3 \pm 1.35$  y  $43.59 \pm 1.45$  por ciento, respectivamente).
2. Los valores más altos de capacidad antioxidante medida por el método ABTS<sup>+</sup> se lograron a los 240 minutos de reacción, con las reacciones en dos etapas de Alcalasa-Flavourzyme, seguido de Alcalasa-Neutrasa y la reacción en una etapa con sólo Alcalasa ( $2.18 \pm 0.08$ ,  $2.01 \pm 0.12$  y  $2.00 \pm 0.11$   $\mu\text{mol}$  de TE/mg de proteína, respectivamente).
3. La capacidad hipoglucemiante medida a través de la inhibición del  $\alpha$ -amilasa reportó los más altos valores para la hidrólisis enzimática Neutrasa-Flavourzyme a los 240 min ( $23.53 \pm 0.98$  por ciento); para el mismo tratamiento, también se encontró un alto valor de inhibición  $\alpha$ -glucosidasa ( $15.34 \pm 1.52$  por ciento).
4. La inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) medida a través del valor IC<sub>50</sub> produjo una mejor respuesta para la reacción de hidrólisis en una etapa con Alcalasa los 240 min (IC<sub>50</sub> de  $2.14 \pm 0.09$  mg/mL) seguido de la reacción secuencial Alcalasa-Flavourzyme a 240 min (IC<sub>50</sub> de  $2.13 \pm 0.01$  mg/mL) y Alcalasa-Neutrasa a 180 min (IC<sub>50</sub> de  $2.58 \pm 0.21$  mg/mL).

5. Con el tratamiento enzimático Alcalasa a los 240 minutos de hidrólisis se alcanzó el mayor porcentaje de inhibición de la actividad ECA ( $80.7 \pm 1.6$  por ciento) con un  $IC_{50}$  de  $0.16 \pm 0.01$  mg de proteína/mL, seguido del tratamiento secuencial Alcalasa-Neutrasa a los 180 minutos (inhibición ECA de  $78.2 \pm 1.11$  por ciento) con el menor valor  $IC_{50}$  de  $0.11 \pm 0.01$  mg de proteína/mL.
  
6. Al evaluar la estabilidad de los hidrolizados proteicos obtenidos con Alcalasa a los 240 minutos y con la secuencia Alcalasa-Neutrasa a los 180 minutos frente a las condiciones de digestión utilizando un modelo *in vitro* (hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina), se obtuvieron productos digeridos con mayores valores de capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup> respecto al hidrolizado inicial ( $2.92 \pm 0.07$  y  $3.02 \pm 0.04$   $\mu$ mol TE/mg, respectivamente), el valor  $IC_{50}$  de la ECA disminuyó respecto al hidrolizado inicial ( $0.17 \pm 0.001$  y  $0.13 \pm 0.001$  mg proteína /mL, respectivamente) y el valor  $IC_{50}$  de la DPP-IV no afectó significativamente al tratamiento Alcalasa 240 minutos, mientras que se observó un mejor efecto inhibitorio DPP-IV en la secuencia Alcalasa-Neutrasa a los 180 minutos respecto a los hidrolizados antes de la digestión ( $2.01 \pm 0.05$  y  $1.53 \pm 0.04$  mg proteína /mL).
  
7. El presente estudio resalta la importancia del empleo del tarwi para la obtención de hidrolizados proteicos que pueden contener péptidos bioactivos multifuncionales, mediante hidrólisis enzimática. Éstos confieren un aporte a la salud por conseguir productos con propiedades antioxidantes, antihipertensivas e hipoglucemiantes.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evitar el uso de técnicas de purificación, en los hidrolizados proteicos del tarwi para obtener fracciones peptídicas con mayores propiedades bioactivas e incluir evaluar otras propiedades como las queladoras de metales, antimicrobianas, opioide, entre otros.
- Incluir estudios de identificación de los péptidos, presentes en los hidrolizados proteicos de tarwi obtenidos, haciendo uso plataformas como la cromatografía, la espectrometría de masas; así como la aplicación de modelado molecular.
- Evaluar la estabilidad de los péptidos bioactivos y sus propiedades bioactivas mediante estudios *in vivo*.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (2007). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition. Gaithersburg, Maryland, USA. Current Through Revision 2.
- Abu, R., Hamdan, L. & Afifi, F. (2004). Alpha amylase inhibitory activity of some plant extracts with hypoglycemic activity. *Scientia Pharmaceutica*, 72: 25-33. doi: 10.3797/scipharm.aut-04-03
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6): 1256–1262. doi: 10.1021/jf60226a042
- Admassu, H., Gasmalla, M., Yang, R., & Zhao, W. (2018). Identification of Bioactive Peptides with  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Potential from Enzymatic Protein Hydrolysates of Red Seaweed (*Porphyra* spp). *Journal Agriculture Food Chemistry*, 66(19): 4872-4882. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00960
- Aguilar, J. (2014). *Determinación de la capacidad antioxidante de péptidos bioactivos aislados de queso crema de Chiapas* (Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo). Recuperada de <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/262/1/AGUILAR-TOALA-JE14.pdf>

- Aguilar, L. (2015). *Evaluación del rendimiento de grano y capacidad simbiótica de once accesiones de tarwi (Lupinus mutabilis Sweet), bajo condiciones de Otuzco -La Libertad* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/1626/F03-A9-T.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Alfonso, E., Reyes, F., Pérez, M., Batista, Y., & Peña, Y. (2016). Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 y una nueva estrategia farmacológica en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista cubana de medicina*, 55(3): 239-256. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232016000300006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232016000300006)
- Aluko, R., & Monu, E., (2003). Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68: 1254–1258. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb09635.x
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of functional foods*, 18: 1125-1137. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.021
- Andrade, A., Becerra, J. & Cárdenas, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal Ethnopharmacology*, 116 (1): 27-32. doi: 10.1016/j.jep.2007.10.031
- Aquino, V. (2018). *Sustentabilidad del cultivo de tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) en la zona altoandina del valle de Mantaro en Perú* (Tesis Doctoral, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3771>
- Araneda, X. (2012). Desamargado de lupino (*Lupinus albus*) mediante extracción de alcaloides. *Revista Innovagro*, 3: 21-33. Recuperado de <https://issuu.com/rdasociados5/docs/rev3>

- Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C. & Boschini, G. (2015). The Role of Grain Legumes in the Prevention of Hypercholesterolemia and Hypertension. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34:1-3, 144-168.doi: 10.1080/07352689.2014.897908
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494: 161-172. Recuperado de [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-04622006000200010](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010)
- Baltodano, S. (2016). *Efecto de la concentración de Alcalasa y tiempo de digestión sobre el grado de hidrólisis y acción inhibitoria frente a Staphylococcus aureus en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (Phaseolus vulgaris L.) variedad pava* (Tesis de pregrado, Universidad Privada Antenor Orrego). Recuperada de <https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/2473>
- Barbana, C. & Boye, J. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6): 1642-1649. Doi: 10.1016/j.foodres.2010.05.003
- Bateson, B. (1970). Estimation of amino nitrogen in worts and beers using either ninhydrin or 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulphonic acid. *Journal of the Institute of Brewing*, 76(2): 150-152. Doi: 10.1002/j.2050-0416.1970.tb03275.x
- Bergillos, F. & Rivas, M. (2013). *Toxinología Clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de Animales*. Barcelona, España: Editorial Bubok Publishing S.L.
- Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M. & Chel-Guerrero, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International Journal Food Science Technology*, 49(1): 2-8.doi: 10.1111/ijfs.12267
- Borja, J. (2014). *Obtención de péptidos bioactivos de Lupinus mutabilis ("tarwi") mediante proteasas de Bacillus sp* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San

Marcos). Recuperada de  
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3924>

Boschin, G., Scigliuolo G., Resta, D. & Arnoldi, A. (2014a). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145: 34–40.doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.076

Boschin, G., Scigliuolo, G., Resta, D. & Arnoldi, A. (2014b). Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Lupin (*Lupinus*) Proteins for Producing ACE-Inhibitory Peptides. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 62(8): 1846-1851.doi: 10.1021/jf4039056

Breña, D. (2018). *Obtención de un aislado proteico de torta de tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) y evaluación de sus propiedades tecno-funcionales* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3802/bre%C3%BA1a-diaz-daniel-angel.pdf?sequence=1>

Cabanillas, B., Pedrosa, M., Rodríguez, J., González, A., Muzquiz, M., Cuadrado, C., ... Burbano, C. (2010). Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(9): 1266-1272. doi: 10.1002/mnfr.200900249

Camarena, F., Huaranga, A., Jiménez, J. & Mostacero, E. (2012). *Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)*. Primera edición. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina-Concejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

Camarena, F., Huaranga, A., Mostacero, E., Patricio, M., Caycho, P. & Castro, J. (2018). Investigación biotecnológica de la cadena productiva del tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) mediante la innovación fitotécnica de 30 ecotipos, procesamiento integral del grano y validación de métodos de análisis cualitativo y cuantitativo de alcaloides y proteínas. Proyecto Instituto Nacional de Investigación Agraria, Lima, Perú.

- Campos, D., Cirillo, R., Aguilar, A. & Yábar, E. (2012). Obtención de péptidos bioactivos con actividades antihipertensiva y antioxidante a partir dos variedades de quinua (*Chenopodium quinoa*) y evaluación de su estabilidad al metabolismo gastrointestinal y biodisponibilidad *in vitro*. Informe Técnico CONCYTEC, Lima, Perú.
- Ceriello, A. (2008). Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*, 31(2): 181-184.doi: 10.2337/dc08-s245
- Chen, C., Sun-Waterhouse, D., Zhang, Y., Zhao, M. & Sun, W. (2020). The chemistry behind the antioxidant actions of soy protein isolate hydrolysates in a liposomal system: Their performance in aqueous solutions and liposomes. *Food Chemistry*, 323: 1-11.doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126789
- Chen, J., Liu, S., Ye, R., Cai, G., Ji, B. & Wu, Y. (2013). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of functional foods*, 5(4): 1684-1692. doi: 10.1016/j.jff.2013.07.013
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J. & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2): 344-349.doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.017
- Chirinos, R., Ochoa, K., Aguilar, A., Carpentier, S., Pedreschi, R. & Campos, D. (2018) Obtaining of peptides with *in vitro* antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities from cañihua protein (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Journal of Cereal Science*, 83: 139–146.doi: 10.1016/j.jcs.2018.07.004
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Velásquez-Sánchez, M., Aguilar, A. & Campos, D. (2020). *In vitro* antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of enzymatically hydrolyzed quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*) proteins. *Cereal Chemistry*, 0: 1–9.doi: 10.1002/cche.10317

- Chirinos-Arias, C. (2015). Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potentia. *Bio Ciencias*, 3 (3): 163-172.doi: 10.15741/revbio.03.03.03
- Cirillo, G. & Iemma, F. (2012). *Antioxidant Polymers: Synthesis, properties and applications*, New York, USA, Editorial John Wiley & Sons.
- Colantoni, A., Recchia, L., Bernabei, G., Cardarelli, M., Roupael, Y. & Colla, G. (2017). Analyzing the Environmental Impact of Chemically-Produced Protein Hydrolysate from Leather Waste vs. Enzymatically-Produced Protein Hydrolysate from Legume Grains. *Agriculture*, 7(62): 1-9.doi: 10.3390/agriculture7080062
- Connolly, A., Piggott, C. & FitzGerald, R. (2014). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 56: 100–107.doi: 10.1016/j.foodres.2013.12.021
- Cordero De Los Santos, M. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food science and technology international*, 11(4): 269-280. doi: 10.1177/1082013205056491
- Coscuela, E., Amorim, M., Voss, G., Nerli, B., Picó, G. & Pintado, M. (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soyflour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198: 36–44.doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.068
- Cruz-Cervera, G., Castellanos-Ruelas, A., Rosado-Rubio, G. & Chel-Guerrero, L. (2010). Capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de la proteína de frijol terciopelo *Mucuna pruriens*. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 50(12): 17-25. Recuperado de <https://www.ingquimica.uady.mx/revista/pdf/Revista50.pdf>
- Daliri, E., Oh, D. & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5): 32.doi: 10.3390/foods6050032

- De Oliveira Filho, J., Rodrigues, J., Valadares, A., de Almeida, A., Valencia-Mejía, E., Fernandes, K., ... Dyszy, F. (2020). Bioactive Properties of Protein Hydrolysate of Cottonseed Byproduct: Antioxidant, Antimicrobial, and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities. *Waste and Biomass Valorization*, 12: 1395–1404. doi: 10.1007/s12649-020-01066-6
- De Souza-Rocha, T., Real, L., Kil, Y. & González de Mejía, E. (2014). Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. *Food Research International*, 64 (1): 799-809. doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.016
- Delgado, S. & Neira, A. (2016). *Elaboración, aceptabilidad, propiedades reológicas, características fisicoquímicas y valor nutricional del pan enriquecido con harina de tarwi* (Tesis de pregrado, Universidad de San Agustín). Recuperada de <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/1857>
- Dorado, C., Rugerio, C. & Rivas, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 46 (6): 229-235. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2003/un036f.pdf>
- Drucker, J. (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*, 3(3): 153–165. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.004
- Duranti, M. (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2): 67-82. doi: 10.1016/j.fitote.2005.11.008
- Elías, R., Kellerby, S. & Decker, A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Food Science Nutrition*, 48(5): 430-441. doi: 10.1080/10408390701425615
- Espejo, F. (2012). *Obtención de hidrolizados de proteínas de leche de cabra con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina* (Tesis doctoral, Universidad de Granada). Recuperada de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=59312>

- Espinoza, B. & Herrera, C. (2019). *Digestibilidad in vitro de proteína de semilla de chía (Salvia Hispánica) sometida a germinación, molienda, tostado y cocción* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú). Recuperada de <https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/5536>
- FAO. (1990). *Cultivos Andinos Subexplotados, y su aporte a la alimentación*. INIA. Lima -Perú.
- FAO. (Noviembre del 2016). *Simposio Regional del chocho o tarwi (Lupinus mutabilis) llevado a cabo en la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Quito, Ecuador*.
- Farizhandi, A., Rahman, S., Zaidel, D., Muhamad, I. & Majid, F. (2014). Plant protein hydrolysates from soybean and rice grain as a supplement for medium in human skin fibroblast 1184 cell culture. *Advances in Environmental Biology*, 8(3), 838-843. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/277510060>
- Feng, J., Ma, Y., Sun, P., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J. & Wei, Z. (2020). Purification and characterisation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from defatted camellia seed cake. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(1): 138-147. doi:10.1111/ijfs.14613.
- Fennema, O. 2000. *Química de los alimentos*. Segunda Edición. Zaragoza, España: Acribia.
- Fernández, R. (2015). *Péptidos derivados de lactoferrina bovina contra la hipertensión arterial: inhibición de los sistemas angiotensina y endotelina* (Tesis Doctoral, Universidad de Valencia). Recuperada de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=75540>
- Fernández, R., Castello-Ruiz, M., Arce, C., Manzanares, P., Ivorra, D. & Salom, J. (2014). Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: angiotensin receptor blocking effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1): 173-181. doi: 10.1021/jf404616f



- Foh, M., Qixing, J., Amadou, I. & Xia, W. (2010). Influence of Ultrafiltration on Antioxidant Activity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Hydrolysate. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5): 227-235. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/49582905\\_Influence\\_of\\_Ultrafiltration\\_on\\_Antioxidant\\_Activity\\_of\\_Tilapia\\_Oreochromis\\_niloticus\\_Protein\\_Hydrolysate](https://www.researchgate.net/publication/49582905_Influence_of_Ultrafiltration_on_Antioxidant_Activity_of_Tilapia_Oreochromis_niloticus_Protein_Hydrolysate)
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. & Añón, M. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3): 878 - 884. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.065
- García, M., Puchalska, P., Esteve, C. & Marina, M. (2013). Vegetable foods: A cheap source of protein and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other lesser occurrence bioactivities. *Talanta*, 106: 328-349. doi: 10.1016/j.talanta.2012.12.041
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Ángeles-Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J. & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food chemistry*, 221: 464-472. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.087
- Gaviria-Acosta, E., Benítez-Benítez, R., Lenis, L. & Hoyos-concha, J. (2015). Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2): 114–122. doi: 10.18684/BSAA(13)114-122
- Gómez, L., Figueroa, O. & Zapata, J. (2013). Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información tecnológica*, 24 (1): 33- 42. Recuperado de [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642013000100005](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000100005)
- Gómez, L. & Zapata, J. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista*

*Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1): 101-109. Recuperado de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382016000100101&lang=es](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382016000100101&lang=es)

González-García, E., Puchalska, P., Marina, M. L. & García, M. C. (2015). Fractionation and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from plum (*Prunus domestica* L.) stones. *Journal of Functional Foods*, 19: 376–384. doi: 10.1016/j.jff.2015.08.033

Gross, R., Von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L. & Wink, M. (1988). Chemical composition of a new variety of the Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content. *Journal Food Composition and Analysis*, 1 (4): 353-361. doi: 10.1016/0889-1575(88)90035-X

Gu, M., Chen, H., Zhao, M., Wang, X., Yang, B., Ren, J. & Su, G. (2015). Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans Sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin. *LWT – Food Science and Technology*, 60 (1): 213-220. doi: 10.1016/j.lwt.2014.07.052

Güemes-Vera, N., Peña-Bautista, R., Jiménez-Martínez, C., Dávila-Ortiz, G., Calderón-Domínguez, G. (2008). Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (7): 1135-1143. doi: 10.1002/jsfa.3152

Guevara, F. (2016). *Los péptidos bioactivos una alternativa natural para disminuir riesgos causados por hipertensión arterial en humanos* (Tesis de pregrado, Corporación Universitaria Lasallista). Recuperada de <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/handle/10567/1695>

Gutiérrez, A., Infantes, M., Pascual, G. & Zamora, J. (2016). Evaluación de los factores en el desamargado de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Agroindustrial Science*, 6(1):145-149. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6583414>

- Halliwell, B. & Gutteridge, M. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon: Oxford University Press. Oxford Scholarship.
- Hamada, J. (2000). Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases. *Food Chemistry and Toxicology*, 65 (2): 305-310. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb15998.x
- Hanafi, A., Hashim, N., Chay, Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul, A. & Saari, N. (2018). High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International*, 106 (1): 589–597. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.030
- Hartmann, R. & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169. doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.013
- Hernández-Ledesma, B., López-Expósito I., Ramos, M. & Recio, I. (2006). Bioactive peptides from milk proteins. En R, Pizzano (Ed.) *Immunochemistry in Dairy Research* (p. 37-60). Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073232743>
- Herrera-Chalé, F., Ruiz-Ruiz, J., Acevedo-Fernández, J., Betancur-Ancona, D. & Segura-Campos, M. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10), 1691-1698. doi: 10.1016/j.procbio.2014.06.021
- Hong, E., Bravo, G. & Villalobos-Molina, R. (2003). Hipertensión Arterial. *Avance y Perspectiva*, 22: 243-249. Recuperado de <https://biblat.unam.mx/es/revista/avance-y-perspectiva/articulo/hipertension-arterial>
- Ibáñez, J. (2010). Sistema renina-angiotensina-aldosterona, Inhibidores de la enzima de conversión. En Malgor A., Valsecia E. (Eds.). *Farmacología Médica*. Vol 2. (p. 33-44). Recuperado de

[https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap15\\_ieca.pdf](https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap15_ieca.pdf)

Ibrahim, M., Bester, M., Neitz, A. & Gaspar, A. (2018). Rational in silico design of novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides and in vitro evaluation of promising candidates. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107: 234–242. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.163

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP. (2001). Poscosecha y mercado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. Fundación para la Ciencia y la Tecnología - FUNDACYT. Publicación Miscelánea N° 105, Programa Nacional de Leguminosas.

Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., De la Cruz, M., Zavaleta, I. & Hernández-Ledesma, B. (2018b). Production of antioxidant hydrolyzates from a *Lupinus mutabilis* (Tarwi) protein concentrate with Alcalase: Optimization by Response Surface Methodology. *Natural Product Communications*, 13 (6): 751-756. doi: 10.1177/1934578X180130

Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Serrano-Cervantes, L., De la Cruz, M., Zavaleta, I. & Hernández-Ledesma, B. (Abril del 2018a). Fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) con propiedades antioxidantes e inhibidoras de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). XII Congreso Internacional Nutrición, Alimentación y Dietética llevado a cabo en Madrid, España.

Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Zavaleta, A., Arnao, I., Peña, C., Chávez-Hidalgo, E.L. & Hernández-Ledesma, B. (2016). *Erythrina edulis* (pajuro) seed protein: A new source of antioxidant peptides. *Natural Product Communications*, 11 (6): 781-786. doi: 10.1177/1934578X16011006

Jarrín, M. (2003). *Tratamiento del agua de desamargado del chocho (Lupinus mutabilis Sweet), proveniente de la planta piloto de la estación Santa Catalina INIAP* (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperada de <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/353>

- Jauhiainen, T., Korpela, R. & Mäyrä-Mäkinen, A. (2002). *Information About the Evolus® Fermented Milk*. Lars Eriksen, Finland.
- Ji, N., Sun, C., Zhao, Y., Xiong, L. & Sun, Q. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. *Food Chemistry*, 161: 148-154. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.010
- Jiang, M., Yan, H., He, R. & Ma, Y. (2018). Purification and a molecular docking study of  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory peptides from a soybean protein hydrolysate with ultrasonic pretreatment. *European Food Research and Technology*, 244(12): 1995–2005. doi: 10.1007/s00217-018-3111-7
- Joye, I. (2019). Protein Digestibility of Cereal Products. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 8 (6): 1-14. doi: 10.3390/foods8060199
- Karimi, A., Azizi, M. & Ahmadi, H. (2020). Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: *In vitro* antidiabetic and antioxidant activity. *Food science and nutrition*, 8: 2395– 2405. doi: 10.1002/fsn3.1529
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N. & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 89–116. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046
- Khalid, E., Babiker, E. & El Tinay, A. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82(3): 361-366. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00555-1
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type, *Food Chemistry*, 102 (4): 1317-1327. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.016

- Kong, B. & Xiong, Y. (2006). Antioxidant activity of sein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 54 (1): 6059 - 6068. doi: 10.1021/jf060632q
- Kong, X., Zhou, H. & Qian., H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102(3): 759-763. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.062
- Kong, B., Peng, X., Xiong, Y. L. & Zhao, X. (2012). Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1–2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 135 (2): 540–547. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.122
- Korczyk, K., Tkaczewska, J. & Migdal, W. (2018). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates in fish products - A Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 36: 195-207. doi: 10.17221/283/2017-CJFS
- Kristinsson, H. (2008). Functional and bioactive peptides from hydrolyzed aquatic food proteins. En C. Barrow y F. Shahidi (Ed.) *Marine Nutraceuticals and functional Foods* (pp.229-246). doi: 10.1201/9781420015812.ch9
- Kristinsson, H. & Rasco, B. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (1): 43–81. doi: 10.1080/10408690091189266
- Kuba, M., Kumi, T., Tawata, S., Takeda, Y. & Yasuda, M. (2003). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolate from Tofuyo Fermented Soybean Food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67 (6):1278-1283. doi: 10.1271/bbb.67.1278
- Lacroix, I. & Li-Chan, E. (2012). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods*, 4: 403-422. doi: 10.1016/j.jff.2012.01.008

- Lammi, C., Aiello, G., Boschin, G. & Arnoldi, A. (2019). Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 55: 135–145. doi: 10.1016/j.jff.2019.02.016
- Lammi, C., Zanoni, C., Arnoldi, A. & Vistoli, G. (2016). Peptides Derived from Soy and Lupin Protein as Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitors: *In Vitro* Biochemical Screening and *in Silico* Molecular Modeling Study. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 64 (51): 9601-9606. doi: 10.1016/j.jff.2019.02.016
- Lampart, E., Korczak, J., Nogala, M. & Zawirska R. (2003). *Propiedades antioxidantes de los productos de semillas de altramuз*. *Food Chemistry* 83(2): 279-285. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00091-8
- Laurente, Y. (2016). *Obtención del concentrado proteico y determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
- León, E., Jiménez, C. & Dávila, G. (2015). Péptidos bioactivos de fuentes vegetales: Un nuevo ingrediente para alimentos funcionales. En Ramírez-Ortiz, M. (Ed.) *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos* (pp 37-71). Recuperado de <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/88/362/703-1?inline=1>
- Lezama, P. (2010). *Las especies de Lupinus L. (Fabaceae) y de sus simbioses en el distrito de Corongo en Ancash* (Tesis Doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1386/Lezama\\_ap.pdf](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1386/Lezama_ap.pdf)
- Liu, D., Guo, Y., Wu, P., Wang, Y., Kwaku Golly, M. & Ma, H. (2020) The necessity of walnut proteolysis based on evaluation after *in vitro* simulated digestion: ACE inhibition and DPPH radical-scavenging activities. *Food Chemistry*, 311: 125-960. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125960

- Lo, W. & Li-Chan, E. (2005). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53: 3369-3376. doi: 10.1021/jf048174d
- López, S., Arámbula, G., Torruco-Uco, J., Contreras, A., Hernández, F., López, M. & Herrera, J. (2019). Actividad antioxidante de la fracción proteica de chía (*Salvia hispanica* L.) hidrolizada con Alcalasa y Flavourzima. *Agrociencia*, 53 (4): 505-520. Recuperado de <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1824/1821>
- Lowry, O., Rosebough, N., Lewistarr, A. & Randall, R. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemical*, 193: 265–275. doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Maluf, J., Fiorese, M., Maestre, K., Dos Passos, F., Finkler, J., Fleck, J. & Borba, C. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering*, e13370: 1-12. doi: 10.1111/jfpe.13370
- Martínez, O. & Martínez, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21 (2): 1-14. Recuperado de: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112006000500002](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500002)
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, 3(4): 350-361. doi: 10.1039/c2fo10192k
- Matsui, T., Oki, T. & Osajima, Y. (1999) Isolation and identification of peptidic alpha-glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolyzate. *Zeitschrift fur Naturforschung, Journal of biosciences*, 54 (3-4): 259-263. doi: 10.1515/znc-1999-3-417
- Matsui, T., Yuki Yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. & Matsumoto, K. (2002) Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein



- and their antihypertensive ability in SHR. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(2): 80-6. doi: 10.1016/s0955-2863(01)00198-x
- Mazur, A. & Nakatani, H. (1993). Multiple Attack Mechanism in the Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase Hydrolysis of Amylose and Amylopectin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 36 (1): 29-38. doi: 10.1006/abbi.1993.1476
- Megrous, S., Al-Dalali, S., Zhao, X., Chen, C., Cao, Y., Bourouis, I., .... Yang, Z. (2020). Evaluation of Antidiabetic Activities of Casein Hydrolysates by a *Bacillus* Metalloendopeptidase. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 23 (1): 2519–2527. doi: /10.1007/s10989-020-10045-3
- Millán, M., Yust, M., Alcaide, J., Millán, F. & Pedroche, J. (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chemistry*, 151: 141–147. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.053
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2018). Estadística Agraria Anual. Lima, Perú. MINAGRI website: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=produccion-agricola>
- Mojica, L., Chen, K. & De Mejía, E. (2014). 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 (1): 188–198. doi: 10.1111/1750-3841.12726
- Mojica, L. & De Mejía, E. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food and Function*, 7 (2): 713–727. doi: 10.1039/c5fo01204j
- Mora, L., Toldrá, F. & Aristoy, M. (2018). Bioactive peptides in Foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 395-400. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00067-2

- Mori, L. & Paz, R. (2008). Eliminación de alcaloides en el tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante lavado con agua a diferentes pH. *Revista Ciencias Biológicas*, 6(1): 48-53. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6583414.pdf>
- Motyán, J., Toth, F. & Tozser, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4): 923–942. Recuperado de 10.3390/biom3040923
- Mulvihill, E. (2018). Dipeptidyl peptidase inhibitor therapy in type 2 diabetes: Control of the incretin axis and regulation of postprandial glucose and lipid metabolism. *Peptides*, 100: 158-164. doi: 10.1016/j.peptides.2017.11.023
- Muñoz, D., Luna-Vital, M., Fornasini, M., Baldeón, E. & González de Mejía, E. (2018). Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucose uptake and reduced gluconeogenesis *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 45: 339-347. doi: 10.1016/j.jff.2018.04.021
- Nalinannon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. & Andshahidi, F. (2012). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354–1362. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.089
- Nasri, M. (2016). Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Advances in Food and Nutrition*, 81: 109-159. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003
- Ngoh, Y. & Gan, C. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190: 331-337. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.120
- Nongonierma, A. & Fitzgerald, R. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food drug interaction. *International Dairy Journal*, 32 (1): 33-39. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.03.005

- Nongonierma, A. & FitzGerald, R. (2015). Investigation of the Potential of Hemp, Pea, Rice and Soy Protein Hydrolysates as a Source of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. *Food Digestion: Research and Current Opinion*, 6(3): 19-29. doi: 10.1007/s13228-015-0039-2
- Nongonierma, A., Le Maux, S., Dubrulle, C., Barre, C. & Fitzgerald, R. (2015). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with *in vitro* dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Cereal Science*, 65: 112-118. doi: 10.1016/j.jcs.2015.07.004
- Ochoa, K. (2017). *Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la cañihua (Chenopodium pallidicaule Aellen) para la obtención de péptidos bioactivos* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3055?show=full>
- Orsini, M., Añon, M. & Tironi, V. (2016). Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad. *Innotec*, 11 (6): 18-26. Recuperado de <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163573007/html/>
- Ortega, D., Rodríguez, A., Arturo, D. & Zamora-Burbano, A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta agronómica*, 59 (1): 111-118. Recuperado de [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/14094/14956](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/14094/14956)
- Paddon-Jones, D., Campbell, W., Jacques, F., Kritchevsky, B., Moore, L., Rodríguez, R. & Van Loon, C. (2015). Protein and healthy aging. *American Journal of Clinical Nutrition*, 101 (2): 1339–1345. doi: 10.3945/ajcn.114.084061
- Palacios, V., Emetrio, S., Espinoza, C., Herrera, M. & Huamancaja, C. (2004). *Obtención de alcohol a partir de la malta de Lupinus mutabilis (tarwi)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Centro del Perú, Junín, Perú.

- Pazinatto, C., Malta, L., Pastore, G. & Netto, F. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food science and technology*, 33 (3): 485-493. Recuperado de <https://www.scielo.br/j/cta/a/vVRgQt5MzCZvGBbZxhjQJYB/?format=pdf>
- Pedroche, J., Yust, M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. & Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolate for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9): 960-965. doi: 10.1002/jsfa.1126
- Pérez, R. & Sainz de Vicuña, A. (2016). *Diseño de fármacos inhibidores de enzimas o sistemas de transporte en la Diabetes Mellitus Tipo II* (Tesis de pregrado, Universidad Complutense de Madrid). Recuperada de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/50246/>
- Pihlanto, A. & Korhonen, H. (2006) Bioactive peptides. Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (1): 945-960. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012
- Pinto, G., Brás, N., Pérez, M., Fernández, P., Russo, N., Ramos, M. & Toscano, M. (2015). Establishing the Catalytic Mechanism of Human Pancreatic  $\alpha$ -Amylase with QM/MM Methods. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11 (6): 2508-2516. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00222
- Power, O., Nongonierma, A., Jakeman, P. & FitzGerald, R. (2014). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73 (1): 34-46. doi: 10.1017/S0029665113003601
- Prieto, C. (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para las hidrólisis enzimáticas de proteínas* (Tesis doctoral, Universidad de Granada). Recuperada de <http://hdl.handle.net/10481/1722>
- Quirós del Bosque, A. (2007). *Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad* (Tesis Doctoral,

Universidad Autónoma de Madrid). Recuperada de <http://hdl.handle.net/10486/2480>

Quispe, D. (2015). *Composición nutricional de diez genotipos de lupino (L. Mutabilis y L. Albus) desamargado por proceso acuoso* (Tesis maestría, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/1816>

Raghavan, S., Kristinsson, H., Thorkelsson, G. & Johannsson, R. (2011). Antioxidative properties of fish protein hydrolysis. En C., Alasalvar, F., Shahidi, K., Miyashita, y U., Wanasundara (Eds.). *Handbook of seafood quality, safety and health applications*. (p. 494-507).

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W., Je, J. & Kim, S. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38: 175–182. doi: 10.1016/j.foodres.2004.10.002

Raju, C., Tiwari, K., Kumar, A., Ali, Z., Agawane, B., Saidachary, G. & Madhusudana, K. (2010). Alpha glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 18: 358-365. doi: 10.1016/j.bmc.2009.10.047

Ramos, E. (2016). *Búsqueda de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en las proteínas presentes en la cerveza* (Tesis de maestría, Universidad Oberta de Cataluña). Recuperada de <https://openaccess.uoc.edu/bitstream/10609/53333/4/eramosbTFM0716mem%C3%B2ria.pdf>

Rasmussen, M. (2005). Clinical studies with Evolus®. En *Foods and functionals: Research, Results, partnership and progress*, 1-36.

Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Y., Wu, H. & Lai, F. (2016). Identification and characterization of two novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory oligopeptides from

hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26: 439-450. doi: 10.1016/j.jff.2016.07.024

Reyes, R., Román-Ramos, R., Guerrero, I. & Soriano, J. (Junio del 2011). Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) como fuente de péptidos con capacidad para inhibir la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). En Sánchez, S. (Presidencia). XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería llevado a cabo por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería de Querétaro, México.

Rijkeljkhuizen, J., McQuarrie, K., Girman, C., Stein, P., Mari, A., Holst, J., Nijpels., G. & Dekker, J. (2010) Effects of meal size and composition on incretin, alpha-cell, and beta-cell responses. *Metabolism*, 59 (4): 502-511. doi: 10.1016/j.metabol.2009.07.039

Rodríguez, A. (2009). *Evaluación in vitro de la Actividad Antimicrobiana de los Alcaloides del Agua de Cocción del Proceso de desamargado del Chocho (Lupinus mutabilis Sweet)* (Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperada de <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/219/1/56T00193.pdf>

Rodríguez, L. (2016). *Análisis filogenético y de docking molecular de la proteína Conglutina y de Lupinus albus y su interacción con el receptor de insulina humana* (Tesis de pregrado, Universidad María Auxiliadora). Recuperada de <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/139>

Rodríguez, N., Cuautle, P. & Molina, J. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Revista Hospitalaria Juárez México*, 84 (4): 203-211. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2017/ju174e.pdf>

Romo, A. (2013). *Aislamiento y caracterización estructural de nuevos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa a partir de las raíces de Smilax sp.* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperada de <http://eprints.uanl.mx/3695/1/1080256631.pdf>

- Romo, D. (2008). *Aminoacid composition and nitrogen to protein conversion factors for three legumes and two pseudo-cereal* (Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperada de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/714>
- Roufik, S., Gauthier, S. & Turgeon, S. (2006). *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 16: 294 - 302. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.03.010
- Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D. & Chel Guerrero, L. (2013a). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutraceútico. En M. Segura, L. Chel Guerrero y D. Betancur (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 11-27). doi: 10.3926/oms.34
- Ruiz, R., Dávila, G., Chel, L. & Betancur, D. (2013b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal Food Biochemistry*, 37: 26-35. doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00594.x
- Ryan, F. & Brand, E. (1944). A method for the determination of leucine in protein hydrolysates, and in foodstuffs by the use of a neurospora mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 154-161. doi: 10.1016/S0021-9258(18)71954-6
- Sabelino, Z. (2020) *Modelos de calibración del contenido de proteína y fenólicos totales usando espectroscopia del infrarrojo medio en tarwi* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperada de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/4428>
- Saito, K., Jin, H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E. & Yasuhara, T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (12): 3668-3674. doi: 10.1021/jf021191n

- Salazar-Vega, I., Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. & Betancur-Ancona, D. (2012). Antihypertensive and Antioxidant Effects of Functional Foods Containing Chia (*Salvia hispanica*) Protein Hydrolysates, En Dr. Benjamin Valdez (Ed.), *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry* (pp-381-398). doi: 10.5772/30993.
- Salete, G. & Salas, M. (2008). Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Curitiba*, 26(1): 61-70. Recuperado de <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/download/11793/8311>
- Salgado, P., Fernández, G., Drago, S. & Mauri, A. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food hydrocolloids*, 25: 1433-1440. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.003
- Samaranayaka A. & Li-Chan E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3: 229-254. doi: 10.1016/j.jff.2011.05.006
- Sánchez-Mendoza, N., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G. & Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy* (pp. 117-142).
- Sarmadi, B. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31: 1949-1956. doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.020
- Sbroggio, M., Montilha, M., García de Figueiredo, V., Georgetti, S. & Kurozawa, L. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36 (2): 375-381. Recuperado de <https://www.scielo.br/j/cta/a/sQ5CHjZbG3b9ffxZHvbtPSb/?lang=en>
- Schlegel, K., Sontheimer, K., Eisner, P. & Schweiggert-Weisz, U. (2019). Effect of enzyme-assisted hydrolysis on protein pattern, technofunctional, and sensory



- properties of lupin protein isolates using enzyme combinations. *Food Science and Nutrition*, 1-11. doi: 10.1002/fsn3.1286
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. & Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista chilena de Nutrición*, 37 (3): 386-391. doi: 10.4067/S0717-75182010000300014
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. & Betancur-Ancona, D. (2011). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry*, 46: 864–872. doi: 10.1016/j.procbio.2010.12.008
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. & Betancur-Ancona, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. En *Omnia Publisher, USA* (p. 123-139). doi: 10.3926/oms.136
- Singh, A., Adak, S., Karmakar, S. & Banerjee, R. (2014). Impact of Processing Condition on Nutraceutical Potency of Soy Whey Hydrolysate. *Journal of food quality*, 37: 403-414. doi: 10.1111/jfq.12117
- Siow, H. & Gan, C. (2016). Extraction, identification, and structure activity relationship of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from cumin seeds (*Cuminum cyminum*). *Journal of Functional Foods*, 22: 1–12. doi: 10.1016/j.jff.2016.01.011
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I. & Rustad, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40 (6): 2021– 2033. doi: 10.1016/j.procbio.2004.07.016
- Sosa, C. (2000). *Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (L. mutabilis) en sus propiedades funcionales* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Sosa, I., Laviada, H., Chel, L., Ortiz, R. & Betancur, D. (2018). Efecto inhibitorio de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis de semillas de chía (*Salvia*

*hispanica*) sobre las enzimas alfa-amilasa y alfa-glucosidasa. *Nutrición Hospitalaria*, 35 (4): 928-935. doi: 10.20960/nh.1713

Statpoint Technologies INC. (2006). Statgraphics Centurion Versión XVIII. E.U.A: Stat Point, Inc.

Steckelings, M., Kaschina E. & Unger, T. (2005). The AT2 receptors: a matter of love and hate. *Peptides*, 26: 1401-1409. doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.010

Suca, G. & Suca, C. (2016). Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18 (2): 55-71. doi: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/11791/10546>

Supriyadi, A., Arum, L., Nugraha, A., Ratnadewi, A. & Siswoyo, T. (2019). Revealing Antioxidant and Antidiabetic Potency of Melinjo (*Gnetum Gnemon*) Seed Protein Hydrolysate at Different Stages of Seed Maturation. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 7 (2): 479-487. doi: 10.12944/CRNFSJ.7.2.17

Tacias-Pascacio, R., Morellon-Sterling, E., Siar, E., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A. & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165: 2143-2196. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060

Tapia, M. (2015). *El tarwi, lupino andino*. Primera edición. Fondo Ítalo Peruano. Recuperado de <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>

Tapia, M. (2016). El estado de arte en el Perú sobre el Chocho, tarwi o tauri (*Lupinus mutabilis* Sweet). Asociación Nacional de Productores Ecológicos (ANPE). UNALM. Recuperado de [http://siatma.org/sitios/biblioteca/uploads/2.\\_Mario\\_Tapia\\_.pdf](http://siatma.org/sitios/biblioteca/uploads/2._Mario_Tapia_.pdf)

- Tapia, M. & Fries, A. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s.pdf>
- Tiengo, A., Faria, M. & Netto, F. (2009). Characterization and ACE-Inhibitory Activity of Amaranth Proteins. *Journal of Food Science*, 74 (5): 121-126. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01145.x
- Tironi, V. & Añón, M. (2010) Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis. *Food Research International*, 43(1): 315–322. doi: 10.1016/j.foodres.2009.10.001
- Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., ... Rigobello, M. (2020). Milk derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64: 103696. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G. & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* Seeds. *LWT. Food Science and Technology*, 42 (10): 1597-60. doi: 10.1016/j.lwt.2009.06.006
- Torruco-Uco, J., Domínguez-Magaña, G., Dávila-Ortíz, A., Martínez, A., Chel-Guerrero & Betancur-Ancona, D. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión antihypertensive peptides, una revisión. *CYTA - Journal of Food*, 6 (2): 158-168. doi: 10.1080/11358120809487641
- Tovar, A., Murguía, F., Cruz, C., Hernández-Pando, R., Aguilar-Salinas, C. & Pedraza-Chavarri, J. (2002) A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephritic syndrome. *Journal of Nutrition*, 132(9): 2562–2569. doi: 10.1093/jn/132.9.2562

- Tránsito-López, M. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *Oficina de Farmacia Ámbito Farmacéutico*, 25 (5): 82-88. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-plantas-medicinales-con-actividad-hipoglucemiante-13088633>
- Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T. & Yoshikawa, M. (2003). Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean  $\beta$ -conglycinin, is an fMLP agonist. *FEBS Letter*, 540: 206–210. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00265-5
- Tu, M., Cheng, S., Lu, W. & Du, M. (2018). Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105: 7-17. doi: 10.1016/j.trac.2018.04.005
- Ugartondo, V. (2009). *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares* (Tesis doctoral, Universidad de Barcelona). Recuperada de <http://hdl.handle.net/10803/1837>
- Urrutia, W. (2010). *Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi (Lupinus mutabilis)* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Micaela Bastidas). Recuperada de <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/311>
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V. & Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124 (4): 1316-1321. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.062
- Velarde-Salcedo A., Barrera-Pacheco A., Lara-González S., Montero-Morán, G., Díaz-Gois, A., González de Mejía, E. & Barba de la Rosa, A. (2013) *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth

(*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, 136: 758–764. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.032

Velásquez, M. (2017). *Hidrólisis enzimática de la proteína de kiwicha (Amaranthus caudatus L.) para obtener péptidos con propiedades antioxidante y antihipertensiva* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Velásquez, O., Rosas, M., Lara, A., Pastelín, G., Attie, F. & Tapia, C. (2003). Prevalencia e Interrelación de las Enfermedades Crónicas no Transmisibles y Factores de Riesgo Cardiovascular en México. *Archivos de Cardiología de México*, 73: 62-77. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/archi/ac-2003/ac031i.pdf>

Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C. & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal Functional Foods*, 35: 531–539. doi: 10.1016/j.jff.2017.06.024

Vilcacundo, R. (2017). *Liberación de péptidos multifuncionales durante la digestión gastrointestinal simulada de proteínas de quinua (Chenopodium quinua Willd) y amaranto (Amaranthus caudatus)* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid). Recuperada de <https://digital.csic.es/bitstream/10261/196093/1/liberacaudatu.pdf>

Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., Miralles, C. & Hernández-Ledesma., B. (2019). Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein under *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 99 (3): 1225-1232. doi: 10.1002/jsfa.9294

Villacreces, N. (2011). *Evaluación del procesamiento artesanal del Chocho (Lupinus mutabilis Sweet) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica* (Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito). Recuperada de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/963>

- Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L. & Segovia, G. (2006). Usos alternativos del chocho: Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) alimento andino redescubierto. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad de los Alimentos. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/298>
- Villaverde, S. (2011). *Evaluación de las propiedades funcionales del concentrado proteico del tarwi (Lupinus mutabilis) y su uso como extensor cárnico de jamonada* (Tesis de Pregrado). Universidad Tecnológica del Centro del Perú, Huancayo, Perú.
- Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Agroscic*, 26: 103-107. Recuperado de <https://digital.csic.es/handle/10261/5751>
- Vioque, J., Sánchez, R., Clemente, J., Pedroche, M., Yust, M. & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51 (5): 361-365. Recuperado de <https://digital.csic.es/handle/10261/22035>
- Wan, C., Yuan, T., Li, L., Kandhi, V., Cech, N., Xie, M. & Seeram, N. (2012). Maplexins, new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 597. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.10.073
- Wang, F., Zhang, Y., Yu, T., He, J., Cui, J., Wang, J., ... & Fan, J. (2018). Oat globulin peptides regulate antidiabetic drug targets and glucose transporters in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 42: 12–20. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.061
- Wang, T., Zhao, Q. & Wang, Q. (2013) Production and antioxidant properties of marine/derived bioactive peptides. En K., Se-Kwon (Ed.), *Marine proteins and peptides, biological activities and applications* (cap. 18). doi: 10.1002/9781118375082.ch18
- Wen, C., Zhang, H., Zhang, J., Duan, Y. & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application

in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105: 308–322. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.019

Worthington, V. (1993). *Enzyme manual: enzymes and related*, New Jersey, Estados Unidos, Worthington Biochemical Corporation.

Wu, J., Aluko, R. & Muir, E. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography*, 950: 125 - 130. doi: 10.1016/s0021-9673(02)00052-3

Wu, J., Aluko, R. & Nakai, S. (2006) Structural requirements of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 54 (3): 732-738. doi: 10.1021/jf0512631

Xie, Z., Huang, J., Xu, X. & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2): 370–376. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.078

Xu, S., Shen, Y. & Li, Y. (2019a) Antioxidant activities of sorghum kafirin alcalase hydrolysates and membrane/gel filtrated fractions. *Antioxidants*, 8 (5): 131-148. doi: 10.3390/antiox8050131

Xu, F., Yao, Y., Xu, X., Wang, M., Pan, M., Ji, S., ... Wang, L. (2019b). Identification and Quantification of DPP-IV Inhibitory Peptides from Hydrolyzed Rapeseed Protein-Derived Napin, with Analysis of The Interaction between Key Residues and Protein Domains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 3679-3690. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01069

Xu, L., Li, M., Huang, B., Wang, H., Nie, J. & Zhang, Z. (2006) A study on anti-oxidative activity of soybean peptides with linoleic acid peroxidation systems. *Chemical Research in Chinese Universities*, 22 (2): 205–208. doi: 10.1016/S1005-9040(06)60077-9

- Yap, P. & Gan, C. (2020). *In vivo* challenges of anti-diabetic peptide therapeutics: Gastrointestinal stability, toxicity and allergenicity. *Trends in Food Science and Technology*, 105: 161-175. doi: 10.1016/j.tifs.2020.09.005
- Yilmazer-Musa, M., Griffith, A., Michels, A., Schneider, E. & Frei, B. (2012). Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity by tea and grape seeds extracts and their constituent catechins. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 60 (36): 8924-8929. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60219-6
- Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y. & Wäsche, A. (2004). Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52(25): 7681-7689. doi: 10.1021/jf049583c
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120(3): 810–816. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.018
- Yu, Y., Fan, F., Wu, D., Yu, C., Wang, Z. & Du, M. (2018). Antioxidant and ACE Inhibitory Activity of Enzymatic Hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. *Molecules*, 23 (5):1-15. doi: 10.3390/molecules23051189
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, B., Liu, J. & Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase *Food Chemistry*, 129 (4): 1376-1382. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.067
- Yust, M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2003) Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81: 363–369. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00431-4
- Zhang T., Li, Y., Miao, M. & Jiang, B. (2011). Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 128(1): 28–33. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.072

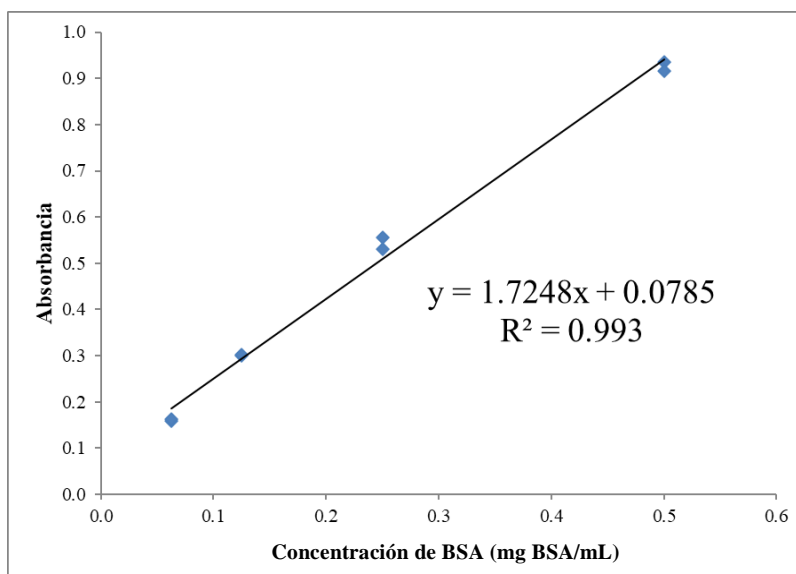


- Zhang, H., Yu, L., Yang, Q., Sun, J., Bi, J., Liu, S., ... Tang, L. (2012) Optimization of a microwave-coupled enzymatic digestion process to prepare peanut peptides. *Molecules*, 17: 5661–5674. doi: 10.3390/molecules17055661
- Zhang, J., Xu, J., Liu, L., Liu, Y., Zhao, T., Sun-Waterhouse, D., ... Su, G. (2015). Physicochemical and sensory characteristics of soya protein isolate hydrolysates with added substrate-like amino acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 51 (1): 69–77. doi: 10.1111/ijfs.12943
- Zhang, Y., Tan, C., Zhang, X., Xia, S., Jia, C., Eric, K., ... Zhong, F. (2014). Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate. *Europe Food Research and Technology*, 238: 957–968. doi: 10.1007/s00217-014-2164-5
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Dong, X., Zhong, H., Wang, S., ... Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, 134 (3): 1360 – 1367. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.033

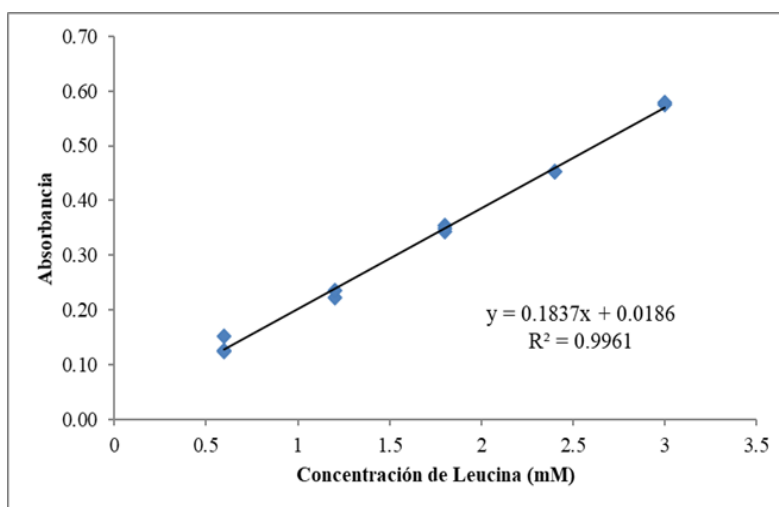
## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR PARA LOS MÉTODOS REALIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN

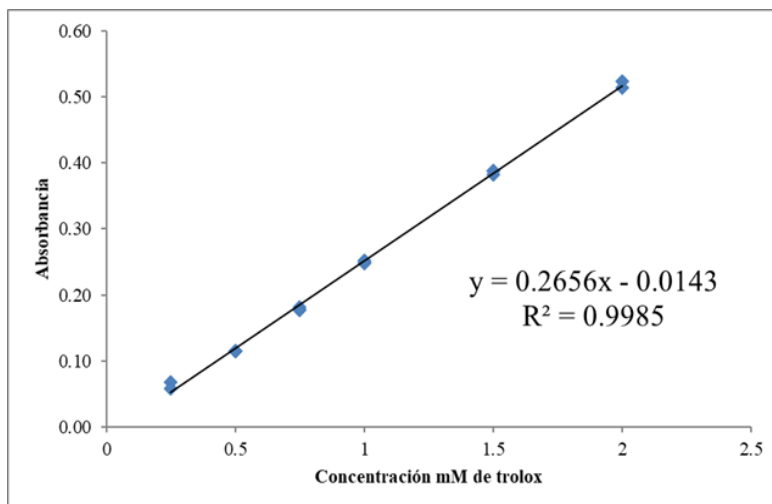
#### Anexo 1a: Curva estándar de Proteína Soluble (Lowry)



#### Anexo 1b: Curva estándar de Leucina para determinación del grado de hidrólisis



### Anexo 1c: Curva estándar del trolox para la capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>



## ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA GRADO DE HIDRÓLISIS POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

### Anexo 2a: ANOVA Simple de GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 0 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.46813	5	0.293626	5.13	0.0096
Intra grupos	0.687349	12	0.0572791		
Total (Corr.)	2.15548	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Flavourzyme-T0	3	0.0666667	X
NF-T0	3	0.101427	X
AF-T0	3	0.132144	X
AN-T0	3	0.1739	X
Neutrasa-T0	3	0.402	X
Alcalasa-T0	3	0.884193	X

### Anexo 2b: ANOVA Simple de GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 15 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	971.671	5	194.334	61.06	0.0000
Intra grupos	38.1952	12	3.18294		
Total (Corr.)	1009.87	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Flavourzyme-T15	3	4.72037	X
Neutrasa-T15	3	5.78833	XX
NF-T15	3	8.64896	X
Alcalasa-T15	3	19.4154	X
AN-T15	3	21.4844	X
AF-T15	3	21.5703	X

**Anexo 2c: ANOVA Simple de GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 30 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1373.08	5	274.615	51.57	0.0000
Intra grupos	63.9073	12	5.32561		
Total (Corr.)	1436.98	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T30	3	5.60831	X
Neutrasa-T30	3	8.029	XX
NF-T30	3	10.5034	X
Alcalasa-T30	3	24.0001	X
AN-T30	3	25.714	X
AF-T30	3	26.0037	X

## Anexo 2d: ANOVA Simple de GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 60 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1556.85	5	311.37	80.98	0.0000
Intra grupos	46.1417	12	3.84514		
Total (Corr.)	1602.99	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T60	3	7.99145	X
Neutrasa-T60	3	9.353	XX
NF-T60	3	12.3063	X
Alcalasa-T60	3	27.9933	X
AF-T60	3	28.155	X
AN-T60	3	28.7597	X

**Anexo 2e: ANOVA Simple de GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 90 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2165.46	5	433.093	159.55	0.0000
Intra grupos	32.5729	12	2.71441		
Total (Corr.)	2198.04	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T90	3	10.0075	X
Neutrasa-T90	3	11.1047	X
NF-T90	3	20.3427	X
Alcalasa-T90	3	33.115	X
AN-T90	3	33.3637	X
AF-T90	3	37.2605	X

**Anexo 2f: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 120 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2384.37	5	476.875	89.10	0.0000
Intra grupos	64.2221	12	5.35185		
Total (Corr.)	2448.59	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T120	3	12.0013	X
Flavourzyme-T120	3	12.6141	X
NF-T120	3	23.9176	X
AN-T120	3	36.0425	X
Alcalasa-T120	3	36.9285	X
AF-T120	3	40.155	X

## Anexo 2g: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 180 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2769.93	5	553.987	161.37	0.0000
Intra grupos	41.197	12	3.43308		
Total (Corr.)	2811.13	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T180	3	14.487	X
Flavourzyme-T180	3	16.728	X
NF-T180	3	29.6225	X
AN-T180	3	40.4937	X
Alcalasa-T180	3	41.0979	X
AF-T180	3	46.9645	X



**Anexo 2h: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS al tiempo 240 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4042.07	5	808.414	541.49	0.0000
Intra grupos	17.9154	12	1.49295		
Total (Corr.)	4059.98	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T240	3	17.441	X
Flavourzyme-T240	3	19.2538	X
NF-T240	3	36.273	X
AN-T240	3	43.5904	X
Alcalasa-T240	3	52.2988	X
AF-T240	3	56.3274	X

## ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL GRADO DE HIDRÓLISIS POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 3a: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento ALCALASA

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5026.87	7	718.124	67.10	0.0000
Intra grupos	171.237	16	10.7023		
Total (Corr.)	5198.11	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos homogéneos
Alcalasa T0	3	0.884193	X
Alcalasa T15	3	19.4154	X
Alcalasa T30	3	24.0001	XX
Alcalasa T60	3	27.9933	XX
Alcalasa T90	3	33.1151	XX
Alcalasa T120	3	36.9285	XX
Alcalasa T180	3	41.0979	X
Alcalasa T240	3	52.2988	X

**Anexo 3b: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento NEUTRASA**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:**24

**Número de niveles:**8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	583.946	7	83.4209	21.68	0.0000
Intra grupos	61.5745	16	3.8484		
Total (Corr.)	645.521	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrassa T0	3	0.401967	X
Neutrassa T15	3	5.78807	X
Neutrassa T30	3	8.0289	XX
Neutrassa T60	3	9.3531	XX
Neutrassa T90	3	11.105	XXX
Neutrassa T120	3	12.0014	XX
Neutrassa T180	3	14.4867	XX
Neutrassa T240	3	17.441	X

### Anexo 3c: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento FLAVOURZYME

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	859.401	7	122.772	85.70	0.0000
Intra grupos	22.9212	16	1.43257		
Total (Corr.)	882.322	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme T0	3	0.066667	X
Flavourzyme T15	3	4.72037	X
Flavourzyme T30	3	5.60831	X
Flavourzyme T60	3	7.99145	X
Flavourzyme T90	3	10.0075	X
Flavourzyme T120	3	12.6141	X
Flavourzyme T180	3	16.728	X
Flavourzyme T240	3	19.2538	X

**Anexo 3d: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento ALCALASA seguido de NEUTRASA**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3933.6	7	561.943	219.94	0.0000
Intra grupos	40.8795	16	2.55497		
Total (Corr.)	3974.48	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AN-T0	3	0.1739	X
AN-T15	3	21.4844	X
AN-T30	3	25.714	X
AN-T60	3	28.7595	X
AN-T90	3	33.3637	X
AN-T120	3	36.0425	X
AN-T180	3	40.4937	X
AN-T240	3	43.5904	X

**Anexo 3e: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento ALCALASA seguido de FLAVOURZYME**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6265.14	7	895.02	2645.81	0.0000
Intra grupos	5.41244	16	0.338278		
Total (Corr.)	6270.55	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AF-T0	3	0.132144	X
AF-T15	3	21.409	X
AF-T30	3	26.0037	X
AF-T60	3	28.1557	X
AF-T90	3	37.2605	X
AF-T120	3	40.155	X
AF-T180	3	46.9645	X
AF-T240	3	56.3274	X

**Anexo 3f: ANOVA Simple-GRADO DE HIDRÓLISIS con el tratamiento NEUTRASA seguido de FLAVOURZYME**

**Variable dependiente:** Grado de hidrólisis (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3021.25	7	431.607	2880.69	0.0000
Intra grupos	2.39724	16	0.149828		
Total (Corr.)	3023.64	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T0	3	0.101427	X
NF-T15	3	8.54777	X
NF-T30	3	10.5034	X
NF-T60	3	12.3063	X
NF-T90	3	20.3427	X
NF-T120	3	23.9176	X
NF-T180	3	29.6218	X
NF-T240	3	36.273	X

## ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

### Anexo 4a: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 0 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.217585	5	0.043517	3.51	0.0348
Intra grupos	0.148858	12	0.0124048		
Total (Corr.)	0.366443	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T0	3	0.254328	X
AN-T0	3	0.40138	XX
AF-T0	3	0.408756	XX
NF-T0	3	0.42855	XX
Alcalasa-T0	3	0.5287	X
Flavourzyme-T0	3	0.606169	X

### Anexo 4b: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 15 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6



**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.67392	5	0.334785	97.72	0.0000
Intra grupos	0.0411131	12	0.00342609		
Total (Corr.)	1.71504	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T15	3	0.730134	X
NF-T15	3	0.758297	X
Flavourzyme-T15	3	0.766981	X
AF-T15	3	1.28282	X
AN-T15	3	1.32007	X
Alcalasa-T15	3	1.45417	X

**Anexo 4c: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 30 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol TE/mg proteína}$ )

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.13902	5	0.427804	23.89	0.0000
Intra grupos	0.214931	12	0.0179109		
Total (Corr.)	2.35395	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T30	3	0.76494	X
Neutrasa-T30	3	0.838946	X
Flavourzyme-T30	3	0.856412	X
AF-T30	3	1.39665	X
AN-T30	3	1.47344	X
Alcalasa-T30	3	1.6155	X

## Anexo 4d: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 60 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.6852	5	0.53704	62.10	0.0000
Intra grupos	0.10378	12	0.00864835		
Total (Corr.)	2.78898	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T60	3	0.80799	X
Neutrasa-T60	3	0.88125	X
Flavourzyme-T60	3	0.897418	X
AF-T60	3	1.50526	X
AN-T60	3	1.59183	X
Alcalasa-T60	3	1.7579	X

**Anexo 4e: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 90 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.43263	5	0.686526	55.79	0.0000
Intra grupos	0.14766	12	0.012305		
Total (Corr.)	3.58029	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T90	3	0.859118	X
Flavourzyme-T90	3	0.95148	X
NF-T90	3	1.03937	X
AN-T90	3	1.77499	X
AF-T90	3	1.79918	X
Alcalasa-T90	3	1.87147	X

**Anexo 4f: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 120 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.15952	5	0.631904	49.79	0.0000
Intra grupos	0.152283	12	0.0126903		
Total (Corr.)	3.31181	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T120	3	0.929893	X
Flavourzyme-T120	3	0.961553	X
NF-T120	3	1.18577	X
AN-T120	3	1.82682	X
Alcalasa-T120	3	1.84487	X
AF-T120	3	1.87121	X

### Anexo 4g: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 180 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.38354	5	0.876708	78.21	0.0000
Intra grupos	0.134509	12	0.0112091		
Total (Corr.)	4.51805	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T180	3	0.851982	X
Flavourzyme-T180	3	1.03181	X
NF-T180	3	1.29616	X
AN-T180	3	1.95348	X
Alcalasa-T180	3	1.97687	X
AF-T180	3	2.0954	X

**Anexo 4h: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> al tiempo 240 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.38469	5	0.876938	106.79	0.0000
Intra grupos	0.0985395	12	0.00821163		
Total (Corr.)	4.48323	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa-T240	3	0.930097	X
Flavourzyme-T240	3	1.04736	X
NF-T240	3	1.41042	X
Alcalasa-T240	3	2.0033	X
AN-T240	3	2.01147	X
AF-T240	3	2.18268	X

## ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 5a: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) con el tratamiento Alcalasa

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>(μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:**8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.85931	7	0.694187	31.59	0.0000
Intra grupos	0.351649	16	0.021978		
Total (Corr.)	5.21096	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos homogéneos
Alcalasa T0	3	0.530833	X
Alcalasa T15	3	1.45417	X
Alcalasa T30	3	1.6155	XX
Alcalasa T60	3	1.7579	XX
Alcalasa T120	3	1.84487	XX
Alcalasa T90	3	1.87147	XX
Alcalasa T180	3	1.97687	X
Alcalasa T240	3	2.0033	X

### Anexo 5b: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) con el tratamiento Neutrasa

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>(μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:**8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.03786	7	0.148266	8.40	0.0002
Intra grupos	0.282545	16	0.017659		
Total (Corr.)	1.32041	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa T0	3	0.254328	X
Neutrasa T15	3	0.730134	X
Neutrasa T30	3	0.838946	X
Neutrasa T180	3	0.851982	X
Neutrasa T90	3	0.859118	X
Neutrasa T60	3	0.88125	X
Neutrasa T120	3	0.919718	X
Neutrasa T240	3	0.930097	X

**Anexo 5c: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína) con el tratamiento Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>( $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:**8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.451893	7	0.0645561	14.17	0.0000
Intra grupos	0.0729124	16	0.00455702		
Total (Corr.)	0.524805	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme T0	3	0.606198	X
Flavourzyme T15	3	0.766981	X
Flavourzyme T30	3	0.856412	XX
Flavourzyme T60	3	0.897418	X
Flavourzyme T90	3	0.95148	XX
Flavourzyme T120	3	0.961551	XX
Flavourzyme T180	3	1.03181	X
Flavourzyme T240	3	1.04736	X

## Anexo 5d: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) con el tratamiento Alcalasa seguido de Neutrasa

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>(μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:**8

### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.52062	7	0.78866	65.00	0.0000
Intra grupos	0.194127	16	0.0121329		
Total (Corr.)	5.71475	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AN-T0	3	0.420033	X
AN-T15	3	1.32007	X
AN-T30	3	1.47344	XX
AN-T60	3	1.59183	XX
AN-T90	3	1.77499	XX
AN-T120	3	1.82682	XX
AN-T180	3	1.95348	XX
AN-T240	3	2.01147	X



**Anexo 5e: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) con el tratamiento Alcalasa seguido de Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>(μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:**8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.02337	7	1.00334	165.28	0.0000
Intra grupos	0.0971293	16	0.00607058		
Total (Corr.)	7.1205	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AF-T0	3	0.37414	X
AF-T15	3	1.28282	X
AF-T30	3	1.39665	XX
AF-T60	3	1.50526	X
AF-T90	3	1.79918	X
AF-T120	3	1.87121	X
AF-T180	3	2.0954	X
AF-T240	3	2.18268	X

**Anexo 5f: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup> (μmol TE/mg proteína) con el tratamiento Neutrassa seguido de Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>(μmol TE/mg proteína)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:**24

**Número de niveles:**8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.27223	7	0.324605	146.10	0.0000
Intra grupos	0.0355487	16	0.0022218		
Total (Corr.)	2.30778	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T0	3	0.428557	X
NF-T15	3	0.758297	X
NF-T30	3	0.76494	X
NF-T60	3	0.80799	X
NF-T90	3	1.03937	X
NF-T120	3	1.18577	X
NF-T180	3	1.29616	X
NF-T240	3	1.41042	X

## ANEXO 6: ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS

### Análisis de correlación entre las variables

	Columna 1	Columna 2
Columna 1		Correlación Valor-P
Columna 2	Correlación Valor-P	

### El StatAdvisor

Las tablas muestran las correlaciones de Pearson entre cada par de variables. Estos coeficientes de correlación oscilan entre -1 y +1 y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El valor en rojo en cada ubicación de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Los valores-P por debajo de 0.05 indican correlaciones estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95 %.

### Anexo 6a: Análisis de Correlación entre el Grado de Hidrólisis y Capacidad Antioxidante ABTS<sup>+</sup> para los tratamientos enzimáticos en una y dos etapas

#### Tratamiento Alcalasa

	A_GH	A_CAOX
A_GH		0.9010 0.0000
A_CAOX	0.9010 0.0000	

#### Tratamiento Neutrasa

	N_GH	N_CAOX
N_GH		0.7971 0.0000
N_CAOX	0.7971 0.0000	

### Tratamiento Flavourzyme

---

	F_GH	F_CAOX
F_GH		0.9524
		0.0000
F_CAOX	0.9524	
	0.0000	

---

### Tratamiento Alcalasa-Neutrasa

---

	AN_GH	AN_CAOX
AN_GH		0.9912
		0.0000
AN_CAOX	0.9912	
	0.0000	

---

### Tratamiento Alcalasa-Flavourzyme

---

	AF_GH	AF_CAOX
AF_GH		0.9852
		0.0000
AF_CAOX	0.9852	
	0.0000	

---

### Tratamiento Neutrasa-Flavourzyme

---

	NF_GH	NF_CAOX
NF_GH		0.9914
		0.0000
NF_CAOX	0.9914	
	0.0000	

---

**Anexo 6b: Análisis de Correlación entre el Grado de Hidrólisis y % de inhibición de la ECA para los tratamientos enzimáticos en una y dos etapas**

**Tratamiento Alcalasa**

	A_GH	A_ECA
A_GH		0.8587
		0.0000
A_ECA	0.8587	
	0.0000	

**Tratamiento Neutrasa**

	N_GH	N_ECA
N_GH		0.7840
		0.0000
N_ECA	0.7840	
	0.0000	

**Tratamiento Flavourzyme**

	F_GH	F_ECA
F_GH		0.8255
		0.0000
F_ECA	0.8255	
	0.0000	

**Tratamiento Alcalasa-Neutrasa**

	AN_GH	AN_ECA
AN_GH		0.8779
		0.0000
AN_ECA	0.8779	
	0.0000	

### Tratamiento Alcalasa-Flavourzyme

	AF_GH	AF_ECA
AF_GH		0.7580 0.0000
AF_ECA	0.7580 0.0000	

### Tratamiento Neutrasa-Flavourzyme

	NF_GH	NF_ECA
NF_GH		0.1530 0.4755
NF_ECA	0.1530 0.4755	

\*No existe significancia entre las correlaciones estimadas

## Anexo 6c: Análisis de Correlación entre el Grado de Hidrólisis y % de inhibición de la $\alpha$ -amilasa para los tratamientos enzimáticos en una y dos etapas

### Tratamiento Alcalasa

	A_GH	A_AMILASA
A_GH		0.8032 0.0000
A_AMILASA	0.8032 0.0000	

### Tratamiento Neutrasa

	N_GH	N_AMILASA
N_GH		0.7653 0.0000
N_AMILASA	0.7653 0.0000	

### Tratamiento Flavourzyme

---

	F_GH	F_AMILASA
F_GH		0.7262 0.0001
F_AMILASA	0.7262 0.0001	

---

### Tratamiento Alcalasa-Neutrasa

---

	AN_AMILASA	AN_GH
AN_AMILASA		0.8907 0.0000
AN_GH	0.8907 0.0000	

---

### Tratamiento Alcalasa-Flavourzyme

---

	AF_GH	AF_AMILASA
AF_GH		0.9522 0.0000
AF_AMILASA	0.9522 0.0000	

---

### Tratamiento Neutrasa-Flavourzyme

---

	NF_GH	NF_AMILASA
NF_GH		0.9381 0.0000
NF_AMILASA	0.9381 0.0000	

---

**Anexo 6d: Análisis de Correlación entre el Grado de Hidrólisis y % de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa para los tratamientos enzimáticos en una y dos etapas**

**Tratamiento Neutrasa**

	N_GH	N_GLUCOSIDASA
N_GH		0.7905 0.0000
N_GLUCOSIDASA	0.7905 0.0000	

**Tratamiento Neutrasa-Flavourzyme**

	NF_GH	NF_GLUCOSIDASA
NF_GH		0.9540 0.0000
NF_GLUCOSIDASA	0.9540 0.0000	



## ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ECA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

### Anexo 7a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 15 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10604.1	5	2120.82	1529.82	0.0000
Intra grupos	16.6359	12	1.38632		
Total (Corr.)	10620.7	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T15	3	3.48433	X
NF-T15	3	57.4437	X
Neutrasa-T15	3	59.1187	X
AF-T15	3	71.5187	X
AN-T15	3	71.8903	X
Alcalasa-T15	3	72.4823	X

### Anexo 7b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 30 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12040.4	5	2408.09	1662.68	0.0000
Intra grupos	17.3798	12	1.44832		
Total (Corr.)	12057.8	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T30	3	2.64467	X
Neutrasa-T30	3	64.3943	X
NF-T30	3	64.6353	X
AF-T30	3	74.6373	X
AN-T30	3	74.705	X
Alcalasa-T30	3	75.9407	X

**Anexo 7c: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 60 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12891.6	5	2578.31	1793.41	0.0000
Intra grupos	17.2519	12	1.43766		
Total (Corr.)	12908.8	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T60	3	1.83833	X
Neutrasa-T60	3	65.5507	X
NF-T60	3	66.4837	X
AN-T60	3	73.7423	X
AF-T60	3	76.4273	X
Alcalasa-T60	3	79.6237	X

## Anexo 7d: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 90 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12679.7	5	2535.94	581.85	0.0000
Intra grupos	52.3014	12	4.35845		
Total (Corr.)	12732.0	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T90	3	3.21033	X
NF-T90	3	53.6667	X
Neutrasa-T90	3	69.5067	X
AF-T90	3	74.475	X
Alcalasa-T90	3	77.4513	XX
AN-T90	3	78.9267	X

**Anexo 7e: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 120 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11703.2	5	2340.63	600.98	0.0000
Intra grupos	46.7363	12	3.89469		
Total (Corr.)	11749.9	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T120	3	10.3553	X
NF-T120	3	40.4197	X
Neutrasa-T120	3	65.4347	X
AF-T120	3	76.8107	X
AN-T120	3	78.3733	X
Alcalasa-T120	3	80.3637	X

**Anexo 7f: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 180 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12015.4	5	2403.07	1572.33	0.0000
Intra grupos	18.3402	12	1.52835		
Total (Corr.)	12033.7	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T180	3	8.558	X
NF-T180	3	40.0663	X
Neutrassa-T180	3	63.974	X
AF-T180	3	75.019	X
AN-T180	3	78.2027	X
Alcalasa-T180	3	80.494	X

## Anexo 7g: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) al tiempo 240 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje) a 1mg/ml

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11410.4	5	2282.08	324.55	0.0000
Intra grupos	84.3775	12	7.03146		
Total (Corr.)	11494.8	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T240	3	10.598	X
NF-T240	3	40.628	X
Neutrassa-T240	3	66.794	X
AF-T240	3	75.1907	X
AN-T240	3	77.2363	XX
Alcalasa-T240	3	80.6593	X

## ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ECA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 8a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Alcalasa

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16191.1	7	2313.02	2484.78	0.0000
Intra grupos	14.894	16	0.930875		
Total (Corr.)	16206.0	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos homogéneos
Alcalasa T0	3	0	X
Alcalasa T15	3	72.4825	X
Alcalasa T30	3	75.9407	X
Alcalasa T90	3	77.4493	X
Alcalasa T60	3	79.5081	X
Alcalasa T120	3	80.3634	X
Alcalasa T180	3	80.4941	X
Alcalasa T240	3	80.6595	X

### Anexo 8b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Neutrasa

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11258.6	7	1608.37	2254.73	0.0000
Intra grupos	11.4133	16	0.713329		
Total (Corr.)	11270.0	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa T0	3	0	X
Neutrasa T15	3	59.1188	X
Neutrasa T180	3	63.9737	X
Neutrasa T30	3	64.3863	X
Neutrasa T120	3	65.4348	XX
Neutrasa T60	3	65.5498	XX
Neutrasa T240	3	66.794	X
Neutrasa T90	3	69.4979	X

**Anexo 8c: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	355.622	7	50.8032	8.41	0.0002
Intra grupos	96.6626	16	6.04142		
Total (Corr.)	452.285	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme T0	3	0	X
Flavourzyme T60	3	1.83667	X
Flavourzyme T30	3	2.64467	X
Flavourzyme T90	3	3.23	X
Flavourzyme T15	3	3.484	X
Flavourzyme T180	3	8.56533	X
Flavourzyme T120	3	10.3547	X
Flavourzyme T240	3	10.5887	X

### Anexo 8d: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Alcalasa seguido de Neutrasa

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	15339.6	7	2191.37	2887.56	0.0000
Intra grupos	12.1424	16	0.7589		
Total (Corr.)	15351.7	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )



## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AN-T0	3	0	X
AN-T15	3	71.8903	X
AN-T60	3	73.744	X
AN-T30	3	74.5577	X
AN-T240	3	77.2363	X
AN-T180	3	78.2027	X
AN-T120	3	78.3823	X
AN-T90	3	78.7947	X

## Anexo 8e: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Alcalasa seguido de Flavourzyme

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14767.0	7	2109.58	975.49	0.0000
Intra grupos	34.6011	16	2.16257		
Total (Corr.)	14801.6	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AF-T0	3	0	X
AF-T15	3	71.5177	X
AF-T90	3	74.474	X
AF-T30	3	74.6373	X
AF-T180	3	75.019	X
AF-T240	3	75.1907	X
AF-T60	3	76.4273	X
AF-T120	3	76.8107	X

**Anexo 8f: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ECA (1 mg/ml) con el tratamiento Neutrasa seguido de Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Inhibición de la ECA (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9492.41	7	1356.06	235.47	0.0000
Intra grupos	92.1428	16	5.75893		
Total (Corr.)	9584.55	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T0	3	0	X
NF-T180	3	40.0663	X
NF-T120	3	40.4197	X
NF-T240	3	40.628	X
NF-T90	3	53.6923	X
NF-T15	3	57.4437	X
NF-T30	3	64.6353	X
NF-T60	3	66.451	X

## ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA IC<sub>50</sub> DE LA ECA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 9a: ANOVA Simple- IC<sub>50</sub> (mg de proteína/ml) por Tratamiento Enzimático

**Variable dependiente:** IC<sub>50</sub> (mg de proteína/ml)

**Factor:** Tratamientos enzimáticos a diferentes tiempos de reacción

**Número de observaciones:** 36

**Número de niveles:** 12

**Tabla ANOVA para IC<sub>50</sub> por Tratamiento Enzimático**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.305606	11	0.0277823	55.03	0.0000
Intra grupos	0.0121167	24	0.000504861		
Total (Corr.)	0.317722	35			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos homogéneos
AN-T180	3	0.103667	X
AN-T240	3	0.12	X
Alcalasa T240	3	0.159333	X
Neutrasa T240	3	0.173	XX
Neutrasa T180	3	0.18	XX
AN-T120	3	0.21	XX
Alcalasa T120	3	0.24	XX
Neutrasa T120	3	0.245333	XX
Alcalasa T180	3	0.26	X
AF-T120	3	0.36	X
AF-T240	3	0.368333	X
AF-T180	3	0.39	X

## **Anexo 9b: ANOVA Simple- IC<sub>50</sub> (mg de proteína/ml) para el tiempo de reacción en Neutrasa seguido de Flavourzyme**

**Variable dependiente:** IC<sub>50</sub> (mg de proteína/ml)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 9

**Número de niveles:** 3

**Tabla ANOVA para IC<sub>50</sub> de Neutrasa seguido de Flavourzyme**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0746776	2	0.0373388	3.28	0.1088
Intra grupos	0.0682047	6	0.0113674		
Total (Corr.)	0.142882	8			

### **El Stat Advisor**

Puesto que el valor-P de la prueba-F es mayor igual que 0.05 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de IC<sub>50</sub> entre un nivel de Tiempo de reacción para Neutrasa seguido de Flavourzyme.

### **PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T120	3	1.517	X
NF-T240	3	1.666	X
NF-T180	3	1.73533	X

## ANEXO 10: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC<sub>50</sub> DE LA ECA

### Anexo 10a: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la ECA del tratamiento Alcalasa 240 min

Variable dependiente: % Inh ECA

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

#### TABLA ANOVA

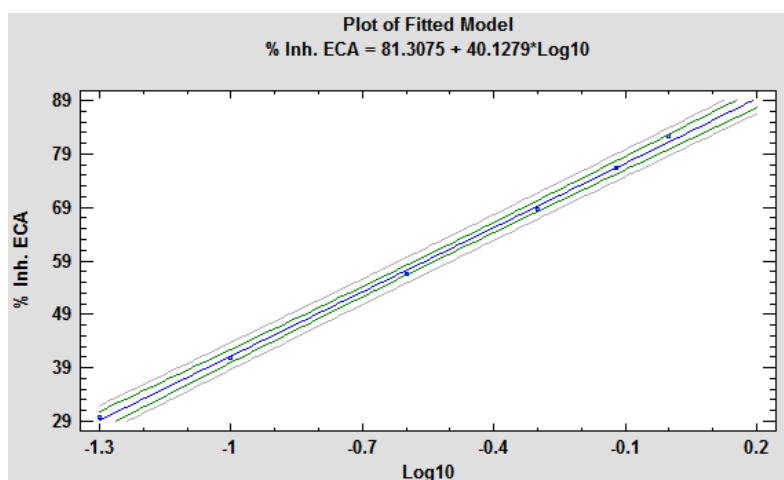
Fuente	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medios	Valor-F	P-Valor
Modelo	2121.24	1	2121.24	3343.99	0.0000
Residual	2.53737	4	0.634343		
Total (Corr.)	2123.77	5			

Coefficiente de Correlación = 0.999402

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh. ECA = 81.3075 + 40.1279\*Log10**

R-cuadrado = 99.8805 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min
-0.78	0.16

## Anexo 10b: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la ECA del tratamiento Alcalasa y Neutrasa 180 min

Variable dependiente: % Inh ECA

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### TABLA ANOVA

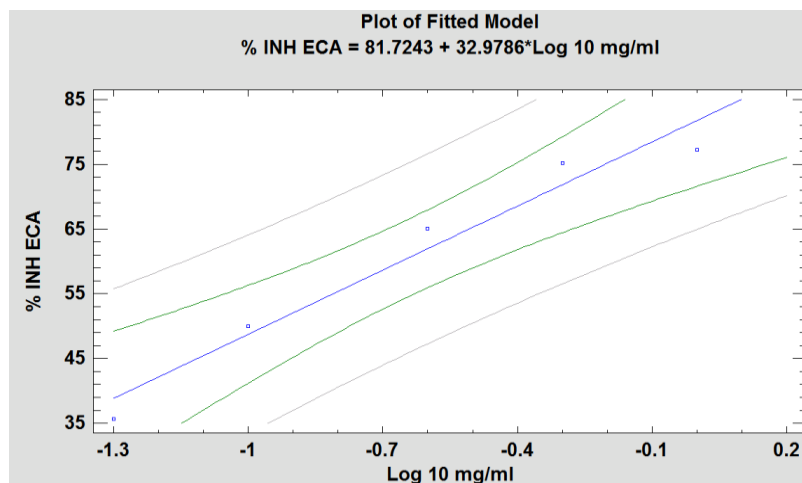
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	1187.64	1	1187.64	67.28	0.0038
Residual	52.9598	3	17.6533		
Total (Corr.)	1240.6	4			

Coefficiente de Correlación = 0.978423

### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh ECA = 81.7243 + 32.9786\*Log 10 mg/ml**

R-cuadrado = 95.7311 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min
-0.96	0.108

**ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA**

**Anexo 11a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 0 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65.0601	5	13.012	23.61	0.0000
Intra grupos	6.61378	12	0.551148		
Total (Corr.)	71.6739	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AF-T0	3	2.03772	X
Alcalasa-T0	3	3.17624	XX
Flavourzyme-T0	3	3.50676	X
AN-T0	3	3.94403	X
NF-T0	3	6.54479	X
Neutrasa-T0	3	7.40171	X

**Anexo 11b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 15 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	159.574	5	31.9148	61.18	0.0000
Intra grupos	6.26028	12	0.52169		
Total (Corr.)	165.834	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Alcalasa-T15	3	3.95502	X
Flavourzyme-T15	3	4.0544	X
AF-T15	3	7.24956	X
AN-T15	3	8.70371	X
NF-T15	3	8.7358	X
Neutrasa-T15	3	12.572	X

**Anexo 11c: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 30 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	121.427	5	24.2855	47.13	0.0000
Intra grupos	6.18312	12	0.51526		
Total (Corr.)	127.611	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )



## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T30	3	5.70571	X
Alcalasa-T30	3	6.14964	X
NF-T30	3	8.54164	X
AN-T30	3	10.5253	X
AF-T30	3	11.243	X
Neutrasa-T30	3	12.7511	X

## Anexo 11d: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 60 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	120.625	5	24.125	23.80	0.0000
Intra grupos	12.1649	12	1.01374		
Total (Corr.)	132.79	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T60	3	7.97051	X
AN-T60	3	9.45241	X
Alcalasa-T60	3	9.49922	X
Neutrasa-T60	3	12.3643	X
AF-T60	3	14.1004	XX
NF-T60	3	14.9804	X

**Anexo 11e: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 90 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	171.694	5	34.3389	13.08	0.0002
Intra grupos	31.5016	12	2.62513		
Total (Corr.)	203.196	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T90	3	9.37026	X
Alcalasa-T90	3	10.532	X
AN-T90	3	12.2784	XX
Neutrasa-T90	3	14.6611	XX
NF-T90	3	16.7264	XX
AF-T90	3	17.7586	X

**Anexo 11f: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 120 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	283.908	5	56.7816	101.60	0.0000
Intra grupos	6.70634	12	0.558862		
Total (Corr.)	290.614	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Alcalasa-T120	3	10.9234	X
Flavourzyme-T120	3	12.4482	X
AN-T120	3	14.1495	X
Neutrasa-T120	3	19.2933	X
NF-T120	3	20.5106	XX
AF-T120	3	20.7258	X

### Anexo 11g: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 180 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	379.805	5	75.9611	45.21	0.0000
Intra grupos	20.1642	12	1.68035		
Total (Corr.)	399.97	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T180	3	11.3315	X
Alcalasa-T180	3	14.2019	X
Neutrasa-T180	3	16.3772	X
AN-T180	3	20.8153	X
AF-T180	3	23.1828	X
NF-T180	3	23.5347	X

**Anexo 11h: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -AMILASA (a 15 mg/ml proteína) al tiempo 240 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	633.216	5	126.643	260.12	0.0000
Intra grupos	5.84232	12	0.48686		
Total (Corr.)	639.058	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento Enzimático</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme-T240	3	8.09451	X
Alcalasa-T240	3	11.1316	X
Neutrasa-T240	3	16.3365	X
AF-T240	3	21.692	X
AN-T240	3	22.7197	XX
NF-T240	3	23.5214	X

## ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -AMILASA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 12a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Alcalasa

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	313.959	7	44.8513	69.52	0.0000
Intra grupos	10.3227	16	0.645166		
Total (Corr.)	324.282	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tiempo	Casos	Media	Grupos homogéneos
Alcalasa T0	3	3.17624	X
Alcalasa T15	3	3.95502	X
Alcalasa T30	3	6.14964	X
Alcalasa T60	3	9.49922	X
Alcalasa T90	3	10.532	XX
Alcalasa T120	3	10.9234	XX
Alcalasa T240	3	11.1316	X
Alcalasa T180	3	14.2019	X

**Anexo 12b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA  $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Neutrasa**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	268.11	7	38.3015	44.72	0.0000
Intra grupos	13.7048	16	0.85655		
Total (Corr.)	281.815	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa T0	3	7.40172	X
Neutrasa T60	3	12.3643	X
Neutrasa T15	3	12.572	X
Neutrasa T30	3	12.7511	X
Neutrasa T90	3	14.6611	X
Neutrasa T240	3	16.3365	X
Neutrasa T180	3	16.3772	X
Neutrasa T120	3	19.2933	X

**Anexo 12c: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA  $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Flavourzyme**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	220.515	7	31.5021	55.26	0.0000
Intra grupos	9.12079	16	0.570049		
Total (Corr.)	229.635	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Flavourzyme T0	3	3.50676	X
Flavourzyme T15	3	4.0544	X
Flavourzyme T30	3	5.70571	X
Flavourzyme T60	3	7.97051	X
Flavourzyme T240	3	8.09451	XX
Flavourzyme T90	3	9.37026	X
Flavourzyme T180	3	11.3315	X
Flavourzyme T120	3	12.4482	X

**Anexo 12d: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA  $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Alcalasa seguido de Neutrasa**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	828.97	7	118.424	250.42	0.0000
Intra grupos	7.56635	16	0.472897		
Total (Corr.)	836.536	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AN-T0	3	3.94402	X
AN-T15	3	8.70371	X
AN-T60	3	9.45241	XX
AN-T30	3	10.5253	X
AN-T90	3	12.2784	X
AN-T120	3	14.1495	X
AN-T180	3	20.8153	X
AN-T240	3	22.7197	X

### Anexo 12e: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Alcalasa seguido de Flavourzyme

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1179.66	7	168.523	243.01	0.0000
Intra grupos	11.0956	16	0.693476		
Total (Corr.)	1190.76	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )



## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
AF-T0	3	2.03772	X
AF-T15	3	7.24956	X
AF-T30	3	11.243	X
AF-T60	3	14.1004	X
AF-T90	3	17.7586	X
AF-T120	3	20.7258	X
AF-T240	3	21.5887	X
AF-T180	3	23.1828	X

## Anexo 12f: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA (15 mg/ml proteína) con el tratamiento Neutrasa seguido de Flavourzyme

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	993.577	7	141.94	51.51	0.0000
Intra grupos	44.0907	16	2.75567		
Total (Corr.)	1037.67	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T0	3	6.43479	X
NF-T30	3	8.54164	X
NF-T15	3	8.7358	X
NF-T60	3	14.9804	X
NF-T90	3	16.7264	X
NF-T120	3	20.4313	X
NF-T240	3	23.5214	X
NF-T180	3	23.5347	X

**ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA**

**Anexo 13a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 15 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0993924	1	0.0993924	4.15	0.1112
Intra grupos	0.0957014	4	0.0239254		
Total (Corr.)	0.195094	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
NF-T15	3	6.0	X
Neutrasa-T15	3	6.25741	X

**Anexo 13b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 30 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.104475	1	0.104475	0.76	0.4334
Intra grupos	0.552006	4	0.138002		
Total (Corr.)	0.656482	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
NF-T30	3	7.52333	X
Neutrasa-T30	3	7.78725	X

### Anexo 13c: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 60 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0157512	1	0.0157512	0.04	0.8515
Intra grupos	1.58085	4	0.395212		
Total (Corr.)	1.5966	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
NF-T60	3	7.58333	X
Neutrasa-T60	3	7.68581	X

### Anexo 13d: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 90 minutos de reacción enzimática

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.898273	1	0.898273	1.51	0.2868
Intra grupos	2.38314	4	0.595786		
Total (Corr.)	3.28142	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Neutrasa-T90	3	7.68281	X
NF-T90	3	8.45667	X

**Anexo 13e: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 120 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	36.8777	1	36.8777	241.98	0.0001
Intra grupos	0.609612	4	0.152403		
Total (Corr.)	37.4873	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Neutrasa-T120	3	7.71833	X
NF-T120	3	12.6767	X

**Anexo 13f: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 180 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65.4445	1	65.4445	78.31	0.0009
Intra grupos	3.34305	4	0.835763		
Total (Corr.)	68.7876	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Neutrasa-T180	3	6.44472	X
NF-T180	3	13.05	X

**Anexo 13g: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tiempo 240 minutos de reacción enzimática**

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tratamientos Enzimáticos

**Número de observaciones:** 6

**Número de niveles:** 2

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45.9613	1	45.9613	36.56	0.0038
Intra grupos	5.02815	4	1.25704		
Total (Corr.)	50.9895	5			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
<i>Enzimático</i>			
Neutrasa-T240	3	9.80458	X
NF-T240	3	15.34	X

## ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

### Anexo 14a: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tratamiento con Neutrasa

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

#### TABLA ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	176.821	7	25.2601	61.40	0.0000
Intra grupos	6.58204	16	0.411378		
Total (Corr.)	183.403	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Neutrasa T0	3	0	X
Neutrasa T15	3	6.25741	X
Neutrasa T180	3	6.44472	X
Neutrasa T90	3	7.68282	X
Neutrasa T60	3	7.68581	X
Neutrasa T120	3	7.71833	X
Neutrasa T30	3	7.78725	X
Neutrasa T240	3	9.80458	X

### Anexo 14b: ANOVA Simple- % INHIBICIÓN DE LA ENZIMA $\alpha$ -GLUCOSIDASA (a 15 mg/ml proteína) para el tratamiento con Neutrasa seguido de Flavourzyme

**Variable dependiente:** Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa (porcentaje)

**Factor:** Tiempo de reacción

**Número de observaciones:** 24

**Número de niveles:** 8

**TABLA ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	494.643	7	70.6633	157.06	0.0000
Intra grupos	7.19847	16	0.449904		
Total (Corr.)	501.841	23			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
NF-T0	3	0	X
NF-T15	3	6.0	X
NF-T30	3	7.52333	X
NF-T60	3	7.58333	X
NF-T90	3	8.45667	X
NF-T120	3	12.7433	X
NF-T180	3	13.05	X
NF-T240	3	15.34	X



## ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV

### ANOVA Simple- IC<sub>50</sub> (mg de proteína/ml) de la DPPIV por Tratamiento Enzimático

**Variable dependiente:** IC<sub>50</sub> de la enzima DPP-IV (mg proteína/ml)

**Factor:** Tratamientos enzimáticos a diferentes tiempos de reacción

**Número de observaciones:**45

**Número de niveles:**15

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.219	14	1.01564	39.49	0.0000
Intra grupos	0.7716	30	0.02572		
Total (Corr.)	14.9906	44			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

#### PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos homogéneos
AF-T240	3	2.13	X
Alcalasa T240	3	2.14	X
AF-T120	3	2.25333	XX
Alcalasa T180	3	2.44	XX
AF-T180	3	2.44	XX
AN-T180	3	2.57667	X
AN-T240	3	2.61	X
AN-T120	3	2.93667	X
Neutrasa T240	3	2.97333	XX
Neutrasa T180	3	2.97667	XX
Neutrasa T120	3	3.11	XX
Alcalasa T120	3	3.21333	XX
NF-T240	3	3.25333	X
Flavourzyme T240	3	3.64667	X
NF-T180	3	4.21333	X

## ANEXO 16: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC<sub>50</sub> DE LA DPP-IV

### Anexo 16a: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la DPP-IV del tratamiento Alcalasa 240 min

Variable dependiente: % Inh DPP-IV

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

#### TABLA ANOVA

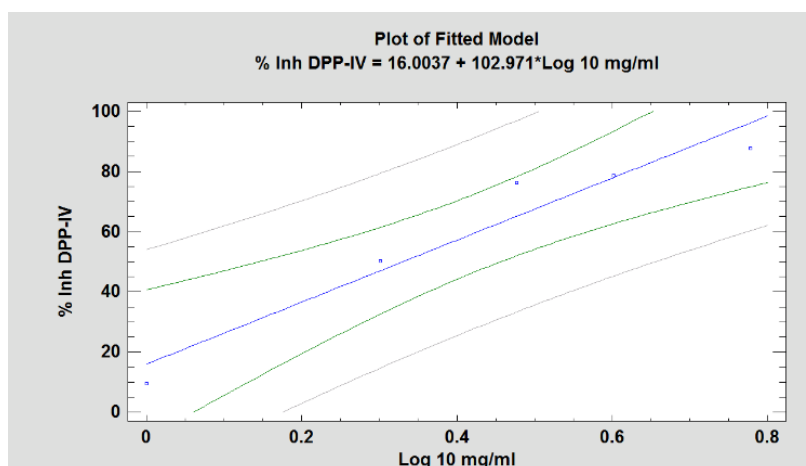
Fuente	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medios	Valor-F	P-Valor
Modelo	3759.87	1	3759.87	45.41	0.0067
Residual	248.394	3	82.7979		
Total (Corr.)	4008.26	4			

Coefficiente de Correlación = 0.968519

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 16.0037 + 102.971\*Log 10 mg/ml**

R-cuadrado = 93.803 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min
0.33	2.138

## Anexo 16b: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la DPP-IV del tratamiento Alcalasa y Neutrasa 180 min

Variable dependiente: % Inh DPP-IV

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### TABLA ANOVA

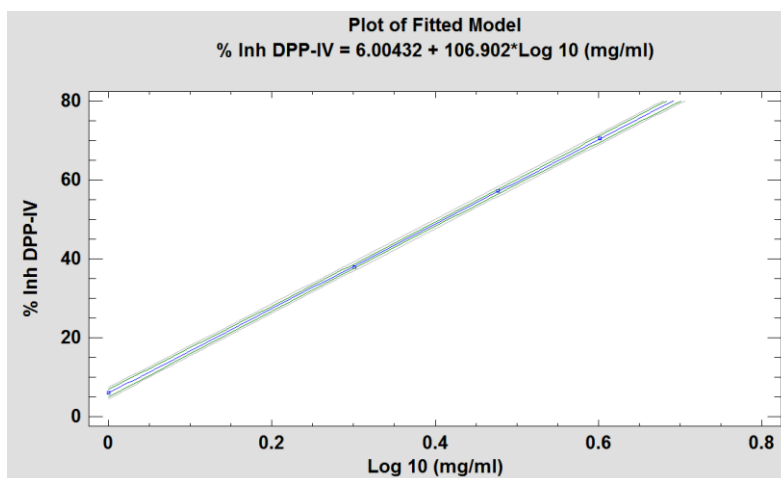
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	2337.16	1	2337.16	39320.98	0.0000
Residual	0.118876	2	0.0594379		
Total (Corr.)	2337.27	3			

Coefficiente de Correlación = 0.999975

### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 6.00432 + 106.902\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 99.9949 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min</b>
0.4115	2.579

**ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL HIDROLIZADO SOMETIDO A CONDICIONES DE DIGESTIÓN *in vitro***

**Anexo 17a: ANOVA Simple- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS<sup>+</sup>( $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína) por FASE en la digestión de Alcalasa-Neutrasa 180 minutos y de Alcalasa 240 min**

**Variable dependiente:** Capacidad antioxidante ABTS<sup>+</sup>( $\mu\text{mol TE/mg}$  proteína)

**Factor:** Fases de la digestión *in vitro*

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.93073	5	1.78615	289.38	0.0000
Intra grupos	0.0740667	12	0.00617222		
Total (Corr.)	9.0048	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos homogéneos
Pepsina A 240	3	1.2	X
Pepsina 180	3	1.30667	X
Hidrolizado AN 180	3	1.95333	X
Hidrolizado A 240	3	2.00333	X
Pepsina y pancreatina A 240	3	2.91667	X
Pepsina y pancreatina 180	3	3.02	X

**Anexo 17b: ANOVA Simple- IC<sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la ECA por FASE en la digestión de Alcalasa-Neutrasa 180 minutos y de Alcalasa 240 min**

**Variable dependiente:** IC<sub>50</sub> de la inhibición de la ECA (mg proteína/mL)

**Factor:** Fases de la digestión *in vitro*

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0137712	5	0.00275423	86.22	0.0000
Intra grupos	0.000383333	12	0.0000319444		
Total (Corr.)	0.0141545	17			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

**PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS**

Método 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Hidrolizado AN 180	3	0.101333	X
Pepsina AN 180	3	0.107333	X
Pepsina y pancreatina AN 180	3	0.133667	X
Pepsina A 240	3	0.152	X
Hidrolizado A 240	3	0.168333	X
Pepsina y pancreatina A 240	3	0.172333	X

**Anexo 17c: ANOVA Simple IC<sub>50</sub> (mg de proteína/mL) de la DPP IV por FASE de Alcalasa-Neutrasa 180 minutos y de Alcalasa 240 min**

**Variable dependiente:** IC<sub>50</sub> de la inhibición de la DPP-IV (mg de proteína/mL)

**Factor:** Fases de la digestión *in vitro*

**Número de observaciones:** 18

**Número de niveles:** 6

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.93449	4	0.483623	38.38	0.0000
Intra grupos	0.126	10	0.0126		
Total (Corr.)	2.06049	14			

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

## PRUEBA DE MÚLTIPLES RANGOS

Método 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Pepsina y pancreatina AN 180	3	1.52667	X
Pepsina y pancreatina A 240	3	2.01333	X
Hidrolizado A 240	3	2.14	X
Pepsina AN 180	3	2.39	X
Hidrolizado AN 180	3	2.57667	X

## ANEXO 18: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC<sub>50</sub> DE LA ECA EN LA DIGESTIÓN *in vitro*

### Anexo 18a: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la ECA del tratamiento Alcalasa 240 min

Variable dependiente: % Inh ECA

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### DIGESTIÓN CON PEPSINA

#### TABLA ANOVA

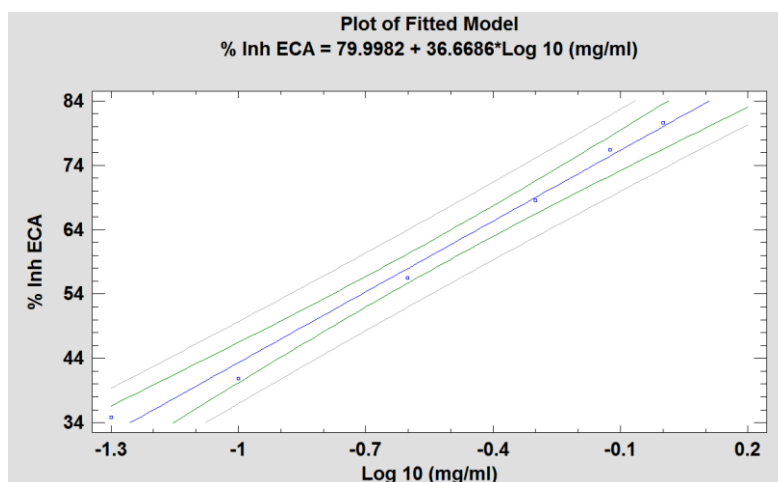
Fuente	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medios	Valor-F	P-Valor
Modelo	1765.15	1	1765.15	441.63	0.0000
Residual	15.9877	4	3.99692		
Total (Corr.)	1781.14	5			

Coefficiente de Correlación = 0.9955

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh ECA = 79.9982 + 36.6686\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 99.1024 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min
-0.818	0.152

## DIGESTIÓN CON PEPSINA Y PANCREATINA

### TABLA ANOVA

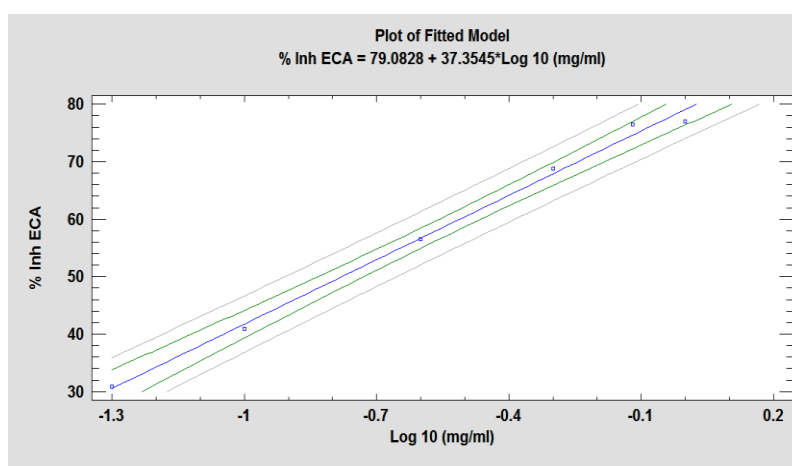
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	1838.15	1	1838.15	772.88	0.0000
Residual	9.51323	4	2.37831		
Total (Corr.)	1847.66	5			

Coefficiente de Correlación = 0.9974

### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: % Inh ECA = 79.0828 + 37.3545\*Log 10 (mg/ml)

R-cuadrado = 99.4851 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min</b>
-0.7786	0.166



## Anexo 18b: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la ECA del tratamiento Alcalasa y Neutrasa 180 min

Variable dependiente: % Inh ECA

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### DIGESTIÓN CON PEPSINA

#### TABLA ANOVA

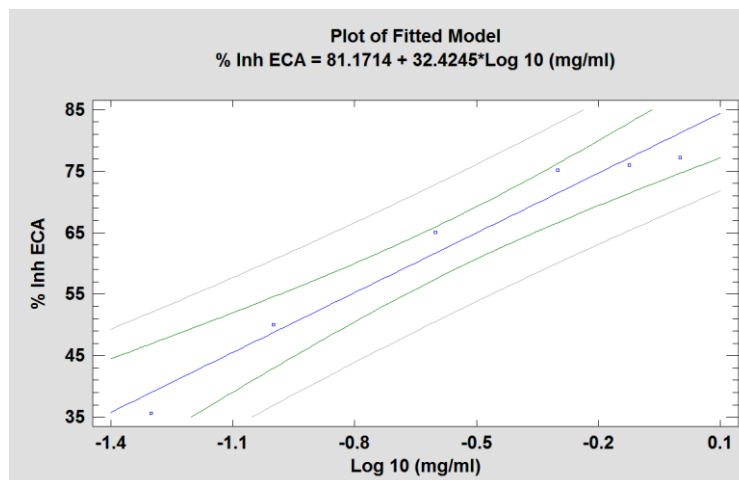
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	1381.76	1	1381.76	100.02	0.0006
Residual	55.2616	4	13.8154		
Total (Corr.)	1437.02	5			

Coefficiente de Correlación = 0.9805

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: % Inh ECA = 81.1714 + 32.4245\*Log 10 (mg/ml)

R-cuadrado = 96.1544 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min
-0.9614	0.109

## DIGESTIÓN CON PEPSINA Y PANCREATINA

**TABLA ANOVA**

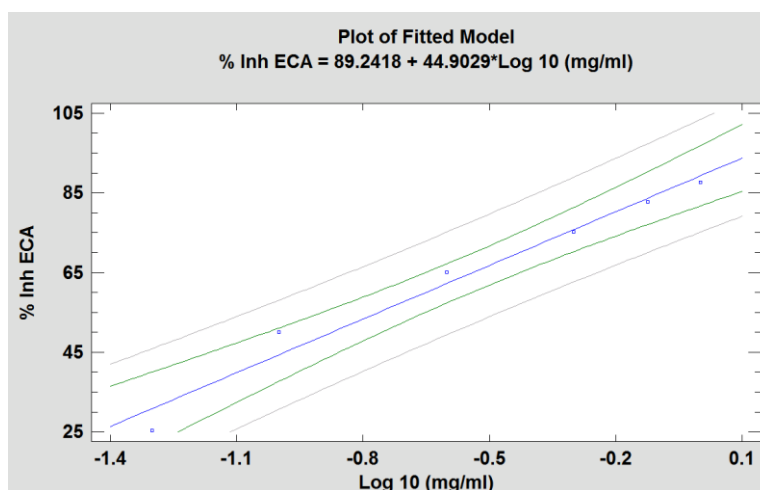
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	2649.95	1	2649.95	143.47	0.0003
Residual	73.8799	4	18.47		
Total (Corr.)	2723.83	5			

Coefficiente de Correlación = 0.9863

### **El StatAdvisor**

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh ECA = 89.2418 + 44.9029\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 97.2876 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh ECA y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min</b>
-0.873	0.133

## ANEXO 19: ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA EL CÁLCULO DEL VALOR IC<sub>50</sub> DE LA DPP-IV EN LA DIGESTIÓN *in vitro*

### Anexo 19a: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la DPP-IV del tratamiento Alcalasa 240 min

Variable dependiente: % Inh DPP-IV

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### DIGESTIÓN CON PEPSINA

#### TABLA ANOVA

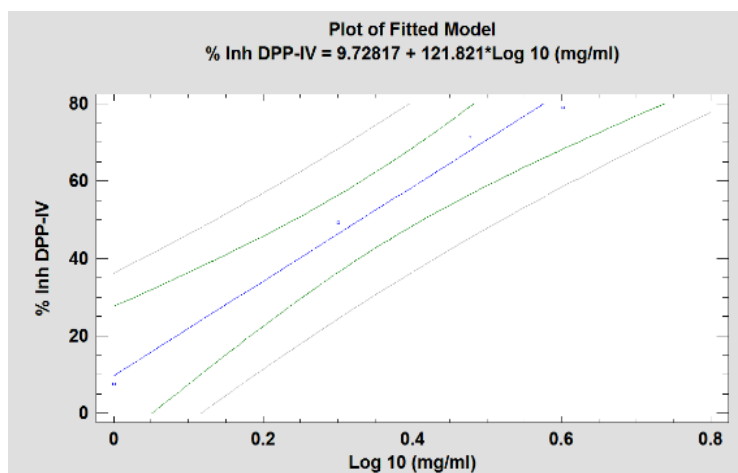
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	3035.03	1	3035.03	146.73	0.0067
Residual	41.3684	2	20.6842		
Total (Corr.)	3076.4	3			

Coefficiente de Correlación = 0.9933

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 9.72817 + 121.821\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 98.6553 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min</b>
0.33	2.14

## DIGESTIÓN CON PEPSINA Y PANCREATINA

**TABLA ANOVA**

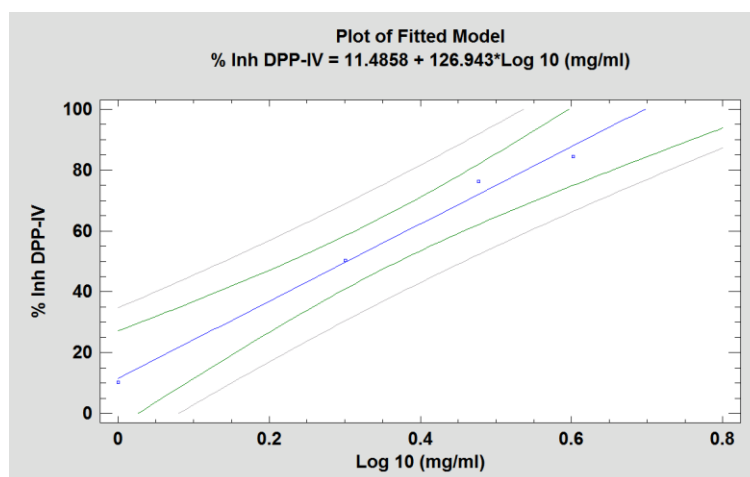
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	3295.61	1	3295.61	207.68	0.0048
Residual	31.7378	2	15.8689		
Total (Corr.)	3327.35	3			

Coefficiente de Correlación = 0.9952

### **El StatAdvisor**

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 11.4858 + 126.943\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 99.0462 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 240 min</b>
0.3033	2.010

## Anexo 19b: Análisis de Regresión para el cálculo del IC<sub>50</sub> de la DPP-IV del tratamiento Alcalasa y Neutrasa 180 min

Variable dependiente: % Inh DPP-IV

Variable independiente: Log<sub>10</sub> del mg/mL

Modelo lineal:  $Y = a + b \cdot X$

### DIGESTIÓN CON PEPSINA

#### TABLA ANOVA

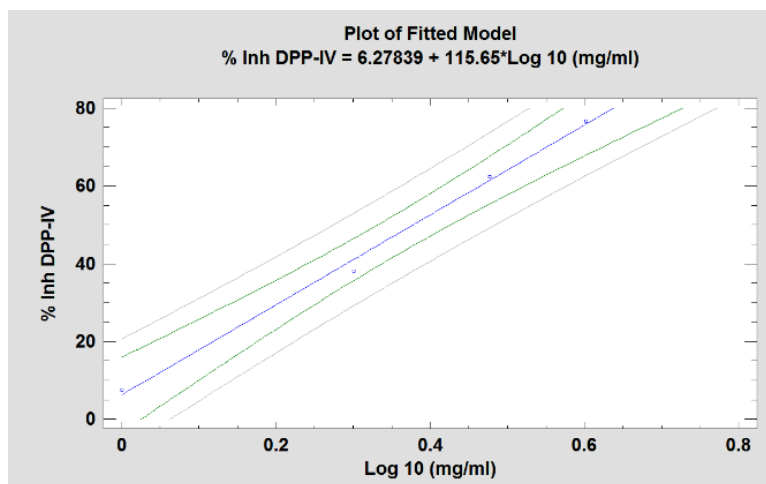
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	2735.34	1	2735.34	450.68	0.0022
Residual	12.1387	2	6.06933		
Total (Corr.)	2747.48	3			

Coefficiente de Correlación = 0.9977

#### El StatAdvisor

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 6.27839 + 115.65\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 99.5582 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

Log IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min
0.3781	2.388

## DIGESTIÓN CON PEPSINA Y PANCREATINA

**TABLA ANOVA**

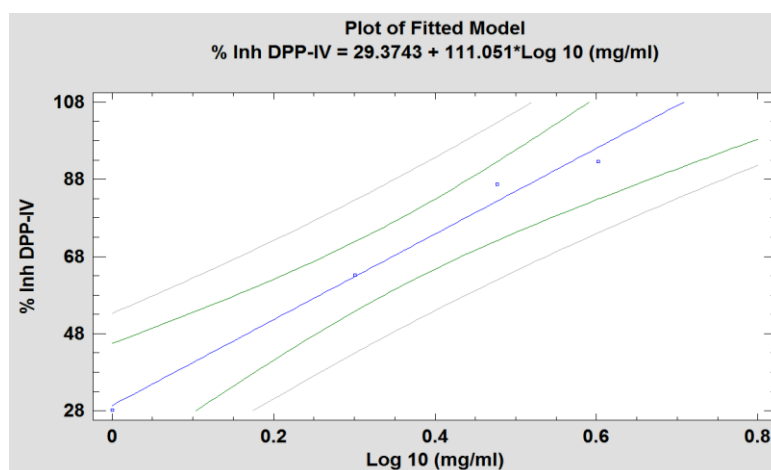
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medios</i>	<i>Valor-F</i>	<i>P-Valor</i>
Modelo	2522.11	1	2522.11	150.01	0.0066
Residual	33.6249	2	16.8125		
Total (Corr.)	2555.74	3			

Coefficiente de Correlación = 0.9934

### **El StatAdvisor**

La ecuación del modelo ajustado es: **% Inh DPP-IV = 29.3743 + 111.051\*Log 10 (mg/ml)**

R-cuadrado = 98.6843 por ciento



Dado que el P-Valor en la tabla ANOVA es menor de 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre % Inh DPP-IV y el Log<sub>10</sub> de la concentración (mg/mL) a un nivel de confianza de 95.0%. Reemplazando el valor de 50% en la ecuación, se tiene:

<b>Log IC<sub>50</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL) a 180 min</b>
0.185	1.53