



Universidad de Concepción  
Facultad Farmacia

**OPTIMIZACION DE LA DIGESTION ENZIMATICA  
ASISTIDA POR MICROONDAS PARA LA  
OBTENCION DE PEPTIDOS BIOACTIVOS A  
PARTIR DE  $\alpha$ -CASEINA DE LA LECHE  
POR**

**KATHERINE STEPHANÍA LOPEZ MUÑOZ**

Trabajo de Fin de Carrera presentado en la Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Concepción para optar al título profesional  
de Químico Farmacéutico

**Profesor Guía**

Karem Alejandra Henríquez Aedo  
Departamento de Ciencia y Tecnología de los alimentos  
Universidad de Concepción

Agosto, 2020  
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2020, Katherine López Muñoz.



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primera instancia a mi tutora Dra. Karem Henríquez por su inestimable guía, su entrega de conocimientos e importante apoyo para llevar a cabo la presente investigación.

Agradecer también a Dr. Mario Aranda y al profesor QF. Jonathan Carrasco por la asesoría e importante colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A los funcionarios y miembros del Departamento de Ciencia y Tecnología de los alimentos por su colaboración y gran disposición.

A mis compañeros de grupo, que hicieron muy grata la instancia durante el desarrollo de esta tesis, creando grandes lazos de apoyo.

Y finalmente a mi familia y amigos que estuvieron presentes brindándome su cariño y apoyo incondicional para que esta investigación se realizara de manera exitosa.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
1.1. Leche y aspectos generales.....	4
1.2. Caseínas.....	5
1.3. Péptidos bioactivos como componentes reguladores del organismo.....	7
1.3.1. Efectos de los péptidos bioactivos.....	8
1.3.2. Obtención de los peptidos bioactivos.....	12
1.4. Digestión asistida por Microondas (DAM).....	15
1.5. Caracterización mediante técnicas de separación .....	17
1.5.1. Cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC).....	18
1.6. Actividades biológicas de interés en el estudio y su papel en la salud....	18
1.6.1. Inhibición de acetilcolinesterasa (AChE).....	19
1.6.2. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa.....	20
1.6.3. Capacidad antioxidante.....	21
1.6.4. Actividad antimicrobiana.....	22
1.7. Aplicaciones comerciales de los péptidos bioactivos.....	23
<b>II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>25</b>

<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	26
3.1. Objetivos específicos .....	26
<b>4. MATERIAL Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
4.1. Reactivos y sustancias químicas.....	27
4.2. Preparación de soluciones.....	27
4.3. Digestión enzimática asistida por Microondas (DAM).....	29
4.3.1. Digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con tripsina.....	32
4.3.2. Digestion enzimatica de $\alpha$ -caseína con pepsina.....	33
4.4. Optimización de la digestión enzimática.....	34
4.5. Análisis cromatográfico utilizando HPTLC.....	34
4.6. Derivatización post cromatográfica.....	35
4.7. Cuantificación de bandas mediante procesamiento de imagen digital.....	35
4.8 Bioensayos de inhibición evaluadas de forma directa por HPTLC.....	37
4.8.1. Bioensayo de inhibición enzimática para acetilcolinesterasa..	37
4.8.2. Bioensayo de inhibición enzimática para $\alpha$ -glucosidasa.....	39
4.8.3. Capacidad antioxidante - DPPH.....	41
4.8.4. Actividad antimicrobiana - Bioautografía <i>Bacillus subtilis</i> .....	42
4.9. Análisis estadístico.....	43

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. Optimización de la digestión enzimática.....	44
5.1.1. Selección de parámetros para DAM.....	44
5.1.2. Optimización de la digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con tripsina.....	47
5.1.3. Optimización de la digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con pepsina.....	49
5.1.4. Cuantificación de las bandas objetivo.....	50
5.1.5. Diseño experimental de las condiciones de DAM en la obtención de péptidos.....	54
5.2. Detección de péptidos bioactivos mediante HPTLC/Bioensayo.....	58
5.2.1. Péptidos inhibidores de acetilcolinesterasa.....	58
5.2.2. Péptidos inhibidores de $\alpha$ -glucosidasa.....	61
5.2.3. Capacidad antioxidante de los péptidos por ensayo DPPH...65	
5.2.4. Actividad antimicrobiana de los péptidos por bioautografía <i>bacillus subtilis</i> .....	67
5.3. Cuantificación de los péptidos bioactivos.....	72
5.4. Optimización de las condiciones de DAM en la obtención de péptidos bioactivos.....	75
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1. Composición proteica expresada como porcentaje total de la leche, destacando a $\alpha$ -caseína como la proteína en estudio.....	7
FIGURA 1-2. Efectos de los péptidos bioactivos sobre los diferentes sistemas corporales .....	9
FIGURA 4-3. Métodos evaluados para realizar una correcta digestión por microondas. ....	31
FIGURA 4-4. Reacción de acetilcolinesterasa con acetato de 1-naftilo para dar 1-naftol y la posterior formación del colorante azo púrpura .....	38
FIGURA 4-5. Reacción de $\alpha$ -glucosidasa con 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y la posterior formación del colorante azo púrpura.....	40
FIGURA 4-6. Reacción del radical DPPH y la especie antioxidante .....	41
FIGURA 5-7. Diseño de experimentos de $\alpha$ -caseína digerida con tripsina a 0.01 mg/mL.....	48
FIGURA 5-8. Electroforesis en gel (SDS PAGE) de proteínas digeridas con tripsina 0.01 mg/mL .....	49
FIGURA 5-9. Diseño de experimentos de $\alpha$ -caseína digerida con pepsina a 1.5 mg/mL.....	50
FIGURA 5-10. Gráfico de Pareto estandarizado que muestra los factores mas influyentes para la intensidad de bandas obtenidas mediante (a) digestión con tripsina y (b) digestión con pepsina.....	55
FIGURA 5-11. Gráficos de superficie de respuesta para la digestión enzimática realizada con tripsina (a) y pepsina (b) asistidas por microondas.....	56
FIGURA 5-12. Muestras digeridas con pepsina y tripsina analizadas en el bioensayo de AChE. ....	60
FIGURA 5-13. HPTLC-Bioensayo de AChE.. ....	61
FIGURA 5-14. HPTLC-Bioensayos para $\alpha$ -glucosidasa.....	63

FIGURA 5-15. HPTLC-Bioensayo de peptidos digeridos con pepsina del diseño de experimentos (p1, p2, p3 y p4)..	64
FIGURA 5-16. HPTLC-Bioensayos de peptidos digeridos con tripsina del diseño de experimentos.....	64
FIGURA 5-17. Cromatogramas HPTLC muestran zonas bioactivas para ensayo DPPH.....	66
FIGURA 5-18. HPTLC-Bioautografía para <i>Bacillus subtilis</i> de muestras del diseño digeridas con tripsina.....	69
FIGURA 5-19. HPTLC-Bioautografía para <i>Bacillus subtilis</i> de muestras del diseño digeridas con tripsina.....	70
FIGURA 5-20. HPTLC-Bioautografía para <i>Bacillus subtilis</i> de muestras del diseño digeridas con pepsina .....	71
FIGURA 5-21. Gráfico de Pareto estandarizado que muestra los factores más influyentes para la intensidad de los péptidos bioactivos obtenidos mediante digestión con tripsina a partir de ensayo de capacidad antioxidante DPPH.....	77
FIGURA 5-22. Gráficos de Pareto estandarizados que muestran los factores más influyentes para la intensidad de los péptidos bioactivos obtenidos mediante digestión con pepsina. (a) bioensayo $\alpha$ -glucosidasa, (b) ensayo de capacidad antioxidante DPPH y (c) bioautografía <i>Bacillus subtilis</i> .....	78
FIGURA 5-23. Gráfico de superficie de respuesta para los péptidos bioactivos digeridos con tripsina obtenidos a partir de ensayo de capacidad antioxidante DPPH.....	79
FIGURA 5-24. Gráficos de superficie de respuesta para los péptidos bioactivos digeridos con pepsina. (a) bioensayo $\alpha$ -glucosidasa, (b) ensayo de capacidad antioxidante DPPH y (c) bioautografía <i>Bacillus subtilis</i> .....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1-1. Distribución porcentual de los componentes mayoritarios de la leche.....	4
TABLA 1-2. Péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas.....	11
TABLA 1-3. Péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas con actividad antioxidante y antimicrobiana . .....	12
TABLA 1-4. Alimentos funcionales a partir de proteínas de la leche disponibles en el mercado .....	24
TABLA 5-5. Rangos mínimos y máximos determinados para las variables independientes de ambos diseños en muestras digeridas con tripsina y pepsina. ....	46
TABLA 5-6. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad para la digestión de $\alpha$ -caseína utilizando tripsina .....	52
TABLA 5-7. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad para la digestión de $\alpha$ -caseína utilizando pepsina .....	53
TABLA 5-8 Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad de péptidos bioactivos (ensayo DPPH) para la digestión de $\alpha$ -caseína utilizando tripsina.....	73
TABLA.5-9 Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad de péptidos bioactivos (bioensayo $\alpha$ -glucosidasa, ensayo DPPH y bioautografía <i>Bacillus subtilis</i> ) para la digestión de $\alpha$ -caseína utilizando pepsina.....	74

## RESUMEN

La leche es un alimento de calidad nutricional, aportando ingredientes funcionales que ejercen un efecto saludable sobre el organismo, siendo las proteínas de la leche una fuente importante de péptidos bioactivos que permitirían la prevención y tratamiento de enfermedades como las Enfermedades Crónicas No Transmisibles y enfermedades infecciosas. El objetivo del presente trabajo fue obtener péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática de  $\alpha$ -caseína mediante Digestión Asistida por Microondas (DAM) utilizando un diseño central compuesto (DCC). Para ello, se evaluaron las condiciones óptimas de digestión (tiempo, temperatura y relación enzima/proteína). La máxima producción de los péptidos se determinó evaluando como respuestas la intensidad de bandas por digestión y la intensidad de péptidos bioactivos con inhibición sobre enzimas acetilcolinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa, antioxidante y antimicrobiano utilizando la técnica HPTLC-bioensayo. Los resultados revelaron que los péptidos lácteos obtenidos presentaron bioactividad de tipo antimicrobiana, antioxidante e inhibidora de las enzimas AChE y  $\alpha$ -glucosidasa, demostrando que DAM es una técnica rápida y eficaz para obtener péptidos con múltiples actividades funcionales donde juegan un rol fundamental sobre enfermedades de gran impacto, como el Alzheimer, diabetes mellitus y enfermedades infecciosas.

## ABSTRACT

Milk is a food of nutritional quality, providing functional ingredients that have a healthy effect on the body, being milk proteins an important source of bioactive peptides that would allow the prevention and treatment of diseases such as Chronic Non-communicable Diseases and infectious diseases. The objective of this work was to obtain bioactive peptides from the enzymatic hydrolysis of  $\alpha$ -casein by means of Microwave Assisted Digestion (MAD) using a composite central design (CCD). For this, the optimal digestion conditions (time, temperature and enzyme / protein ratio) were evaluated. Maximum production of peptides was determined by evaluating as responses the intensity of bands by digestion and the intensity of bioactive peptides with inhibition on acetylcholinesterase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes, antioxidant and antimicrobial using the HPTLC-bioassay technique. The results revealed that the dairy peptides obtained presented bioactivity: antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, demonstrating that MAD is a fast and effective technique for obtaining peptides with multiple functional activities where they play a critical role on high-impact diseases such as Alzheimer's, diabetes mellitus and infectious diseases.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) se caracterizan por ser de larga duración, lenta progresión, y que no se resuelven espontáneamente, logrando rara vez una curación total (OMS). En la actualidad, éstas han aumentado considerablemente, siendo una de las principales causas de muerte en gran parte del mundo (Bennett et al. 2018). Según las cifras de la Organización Mundial de Salud (OMS), para el año 2016 fueron responsables del 71% del total de las muertes equivalente a 41 millones de personas (aumentando en un 8% respecto al año anterior) de las cuales 32 millones de muertes se atribuyen a cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes mellitus tipo II (Bennett et al. 2018). En Latinoamérica, también concentran la mayor parte de las muertes, con cifras que se mantienen por sobre el 50% de los casos (MERCOSUR 2015), teniendo además una gran incidencia en la población más joven, contribuyendo a carga de morbilidad y mortalidad prematura. Respecto a la situación en Chile, las muertes por ECNT para el año 2017 correspondieron a un 84% del total, equivalente a 87.000 fallecidos y un riesgo de muerte prematura de un 11% (WHO 2017), siendo además uno de los países con mayor prevalencia de obesidad en el mundo (Sassi 2010), cuyas cifras rondan un 24.6% en niños y 31.2% en la población adulta, donde el alto índice de masa corporal y factores

relacionados con la dieta son una de las principales causas de muerte y discapacidad en el país (Petermann et al. 2020). Debido a esto, existe gran interés por encontrar formas de prevención y/o tratamiento oportuno de las mismas, para lograr prevenir así, complicaciones y mortalidad prematura. Además de las ECNT, existen enfermedades infecciosas cuyos tratamientos en ocasiones resultan ineficientes con los tratamientos farmacológicos actuales producto de los múltiples mecanismos de resistencia que estos patógenos adquieren, por lo que buscar alternativas terapéuticas es imprescindible. Es por ello que a lo largo de los años se ha estudiado con gran énfasis las propiedades intrínsecas de algunos alimentos, descubriéndose cualidades protectoras fuera de la nutrición propiamente tal. Estos alimentos se han denominado como “funcionales”, los cuales además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios específicos para la salud, al reducir el riesgo de enfermedad, abarcando con ello un gran interés por la relación directa que se forma entre alimentación y salud. En las últimas décadas se han estudiado péptidos bioactivos que han atraído un creciente interés como ingredientes de alimentos funcionales que promueven la salud, encontrándose gran variedad en productos como la leche, el queso y yogurt (Mohanty et al. 2016). También se han reportado en fuentes como el huevo, carnes y plantas (maíz y soja), sin embargo, las proteínas de la leche, se mantienen como la fuente más importante de péptidos bioactivos (Korhonen y Pihlanto 2003), cuya ingesta regulada ofrece un gran beneficio sobre los principales sistemas corporales, cuyos efectos

fisiológicos los han clasificado en ingredientes apropiados para su uso en **alimentos funcionales o formulaciones farmacéuticas** (Urista et al. 2011), ofreciendo así vías prometedoras para prevenir, controlar, e incluso tratar enfermedades y trastornos, llamando poderosamente la atención de los sectores industrial, nutracéutico y terapéutico.(Sah et al. 2018).

Nuestra investigación está directamente relacionada con la evaluación de posibles propiedades activas presentes en las proteínas de la leche, específicamente capacidad inhibitoria de enzimas, antioxidante y antimicrobiana. Para ello, se seleccionó la  $\alpha$ -caseína de la leche como proteína precursora y se evaluó un método adecuado de digestión *in vitro*. Una técnica de vanguardia es el uso del microondas para hidrolizar muestras en poco tiempo, la que combinada con hidrólisis enzimática demuestra ser superior a otras técnicas convencionales en la liberación de péptidos bioactivos (Hall y Liceaga 2020), por lo que nuestro método involucra realizar una optimización mediante diseño central compuesto centrado en las caras, utilizando enzimas proteolíticas de origen animal como tripsina y pepsina. Finalmente, a través de una serie de bioensayos, se evalúa la actividad biológica de péptidos generados, siendo éste un camino para el seguimiento de nuevos métodos de prevención y tratamiento de las ECNT y enfermedades infecciosas.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Leche y aspectos generales

La leche según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA 2019), es el producto de la ordeña completa e ininterrumpida de vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro y que cumple con las características físicoquímicas y bacteriológicas estipuladas por la reglamentación vigente, siendo un alimento con una calidad nutricional excepcional. En cuanto a su composición, la leche es un alimento rico en macronutrientes como proteínas, carbohidratos, lípidos y sales minerales (Tabla 1-1) y también es posible encontrar enzimas, vitaminas, células y otros elementos como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

Tabla 1-1. Distribución porcentual de los componentes mayoritarios de la leche

<b>Componente lácteo</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	87.5
Lactosa	5.1
Grasa	4.1
Proteínas	3.6
Cenizas	0.7

Entre todos sus componentes, las proteínas de la leche poseen un alto valor biológico debido a la presencia de aminoácidos esenciales y a su adecuada digestibilidad para el ser humano. Las proteínas de la leche están representadas por las **caseínas** y **proteínas del suero**. Las caseínas, son los principales componentes proteicos de la leche con un 80% del total, las que están ampliamente categorizadas de acuerdo a sus subtipos correspondientes, tales como  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\gamma$ -caseína (Figura 1-1). Por otro lado, se encuentran las proteínas del suero, constituyendo el 20% restante, cuyos representantes son la  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina y proteínas menores como las inmunoglobulinas. Hoy en día, existe un creciente interés en estudiar las proteínas de la leche, debido a que son una fuente rica en péptidos biológicamente activos, identificándose un número cada vez mayor de péptidos en sus hidrolizados y productos fermentados (Korhonen y Pihlanto 2006), siendo las caseínas la fuente más abundante de péptidos bioactivos (Mohanty et al. 2016).

## 1.2. Caseínas

Las caseínas son fosfoproteínas complejas y muy diferentes a otras proteínas, debido al alto contenido de prolina y a las regiones ácidas que presentan, donde se incluyen residuos de fosfoserina. Son proteínas insolubles y por ende

precipitados de la leche, que poseen una estructura abierta y flexible lo que facilita su digestión e hidrólisis permitiendo liberar una gran cantidad de péptidos con distintas secuencias de aminoácidos (Urista et al. 2011). Poseen una diferente distribución de cargas e hidrofobicidad lo que hace que se unan entre sí asociándose a sales inorgánicas, principalmente calcio y fosfato, formando agregados coloidales denominadas micelas. Respecto a la  **$\alpha$ -caseína** de la leche, es una de las más abundantes constituyendo hasta el 45% de la fracción de caseína. Es una fosfoproteína monomérica cuyo peso molecular es de 23.6 kDa. Consta de 199 residuos de aminoácidos, sin incluir cisteína en su composición, y con 8 a 9 grupos fosfato. Presenta 3 zonas hidrofóbicas, y una zona muy polar en la que se encuentran los grupos fosfato, otorgándole la mayor parte de la carga de la proteína (Farrell et al. 2004). Contiene varios residuos de prolina en su secuencia, y por lo mismo su estructura terciaria esta poco organizada y definida, priorizando su estructura secundaria flexible lo que, como se dijo anteriormente, genera mayor facilidad de hidrólisis por acción de proteasas.

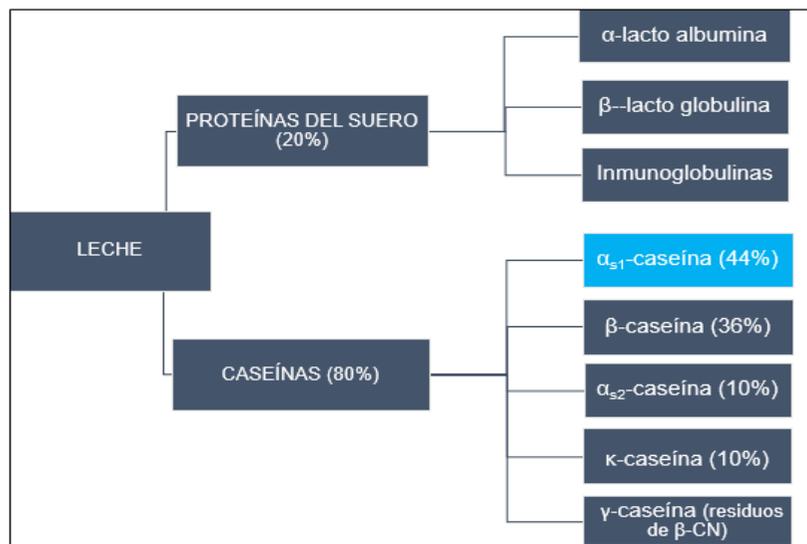
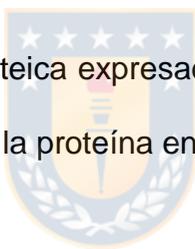


Figura 1-1. Composición proteica expresado como porcentaje total de la leche, destacando  $\alpha$ -caseína como la proteína en estudio.

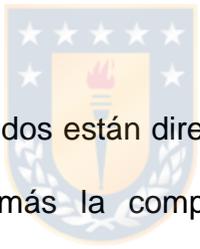


### 1.3. Péptidos bioactivos como componentes reguladores del organismo

Uno de los objetivos de este estudio, es descubrir péptidos bioactivos que promuevan la salud, dirigidos a enfermedades crónicas relacionadas con la dieta, por lo que las proteínas de la leche son fundamentales en la obtención de péptidos que cumplan con aquella función. Según (Meisel 2004), los péptidos bioactivos se definen como componentes genuinos o generados de alimentos listos para su consumo que pueden ejercer una función reguladora en el organismo, independiente de sus funciones nutritivas. La actividad de estos

fragmentos específicos de proteínas se basa en su composición de aminoácidos inherentes y la longitud de la secuencia resultante (Patil et al. 2015), cuyo tamaño comúnmente es de 3 a 20 residuos de aminoácidos, con una masa inferior a 6 kDa. (Moller et al. 2008; Sun et al. 2004). Estas biomoléculas se encuentran tanto en las fracciones de caseína como en las proteínas del suero (Tabla 1-2), presentando diversas funciones biológicas.

### **1.3.1. Efectos de los péptidos bioactivos**



Las funciones de los péptidos están directamente relacionadas con la fuente proteica que los origina, más la composición y largo de secuencia de aminoácidos que presente. Como se observa en la Figura 1-2, los péptidos bioactivos generados en la leche exhiben distintas actividades fisiológicas que modulan procesos en los principales sistemas del cuerpo, entre los que se encuentran el sistema cardiovascular, digestivo, endocrino, inmunológico y nervioso (Mohanty et al. 2016) además de presentar efectos sobre la diabetes tipo II y la obesidad (Moller et al. 2008). La regulación de estos sistemas se basa en sus efectos opioides, inmunomoduladores, antihipertensivos, antimicrobianos y antioxidantes, los cuales hacen que estos péptidos sean objeto de investigación intensiva en todo el mundo (Meisel y FitzGerald 2003), cuya finalidad principal es su utilización en formulaciones de alimentos funcionales,

nutracéuticos y fármacos, en respuesta a sus efectos beneficiosos que además en algunos casos pueden revelar propiedades multifuncionales (Korhonen 2009), siendo cada vez más reconocidas, caracterizadas por presentar dos o más actividades fisiológicas diferentes en alguna secuencia peptídica particular.

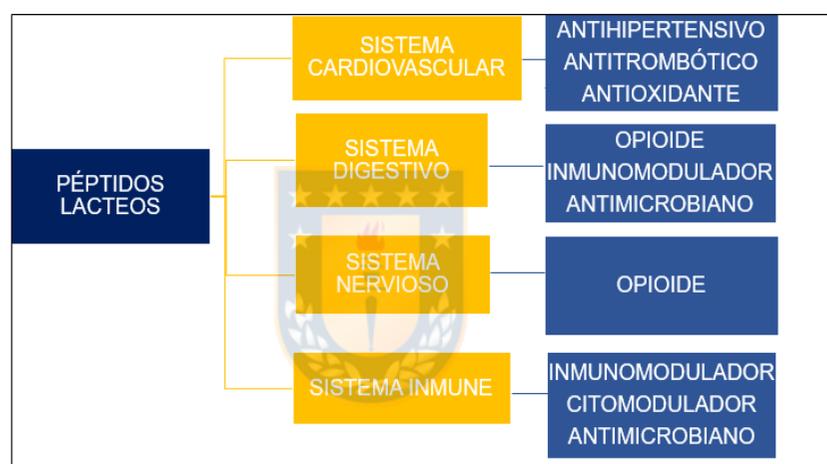


Figura 1-2. Efectos de los péptidos bioactivos sobre los distintos sistemas corporales (Korhonen y Pihlanto 2006).

Actualmente hay una gran cantidad de estudios científicos que demuestran la amplia gama de péptidos lácteos capaces de regular funciones específicas de salud o prevenir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas. Los primeros péptidos bioactivos documentados provenientes de la leche presentaron

actividad opioide e inmunomoduladora (Nagpal et al. 2011). En la Tabla 1-2 se resumen algunos ejemplos de péptidos bioactivos a partir de las proteínas lácteas, provenientes tanto de caseínas como de proteínas del suero, en donde se puede observar la secuencia peptídica correspondiente y la actividad fisiológica que presenta cada uno. Cabe mencionar que los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) han sido estudiados con mucho énfasis en los últimos años, reportándose gran cantidad de ellos como provenientes de fermentación microbiana por cepas de *Lactobacillus spp.* (Gobbetti et al. 2004). También se han reportado sustancias con actividad antioxidante a partir de fuentes como la leche y otras fuentes típicas naturales, cuya bioactividad juega un rol fundamental en la quelación de metales de transición y en la actividad de eliminación de radicales libres, además de estar involucrados en la disminución de la inflamación la cual es partícipe en la patogénesis de enfermedades crónicas como el cáncer, por lo que su búsqueda y estudio sigue vigente hasta el día de hoy. Por otro lado, se han reportado una gran cantidad de estudios relacionados con la actividad antimicrobiana de los péptidos de la leche, en donde sugieren que la importancia fisiológica de estos péptidos radica tanto en su capacidad para modular la microflora intestinal (Shimizu y Son 2007) como en su amplio espectro de actividad (Mohanty et al. 2016). En la Tabla 1-3 se muestran algunos ejemplos de péptidos con actividad antioxidante y antimicrobiana a partir de las caseínas y proteínas del suero.

Tabla 1-2. Péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas (Nagpal et al. 2011).

Proteína precursora	Fragmento	Secuencia peptídica	Nombre del péptido	Función biológica
<b><math>\alpha_{s1}</math>-caseína</b>	90-96	Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu	$\alpha$ -caseína exorfina	Agonista opiode
	91-96	Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu	$\alpha$ -caseína exorfina	Agonista opiode
	23-27	Phe-Phe-Val-Ala-Pro	$\alpha$ -casokinina-5	Inhibidor de la ECA
	104-109	Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu		Inhibidor de la ECA
	194-199	Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	$\alpha$ -casokinina-6	Inhibidor de la ECA, inmunomodulador
<b><math>\beta</math>-caseína</b>	60-70	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu	$\beta$ -casomorfina-11	Agonista opiode
	60-66	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile	$\beta$ -casomorfina-7	Agonista opiode, Inhibidor de la ECA, inmunomodulador
	177-183	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	$\beta$ -casokinina-7	Inhibidor de la ECA
	193-202	Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg	$\beta$ -casokinina-10	Inhibidor de la ECA, inmunomodulador
	169-175	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln		Inhibidor de la ECA
<b><math>\kappa</math>-caseína</b>	25-34	Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg	Casoxina C	Opiode
	106-116	Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys	Casoplatelina	Antitrombotico
<b>Alfa lactoalbumina</b>	50-53	Tyr-Gly-Leu-Phe	Alfa-lactorfina	Agonista opiode, Inhibidor de la ECA
<b>Beta lactoglobulina</b>	102-105	Thyr-Leu-Leu-Phe	Beta-lactorfina	Inhibidor de la ECA

Tabla 1-3. Péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas con actividad antioxidante y antimicrobiana (Mohanty et al. 2016; Sah et al. 2018).

Proteína precursora	Enzima u origen	Fragmento o Secuencia	Nombre del péptido	Función biológica	Actividad específica
$\alpha_{s1}$ -caseína	Quimosina		Casesidina	Antimicrobiano	Bacterias Gram +
	Quimosina	f(1-23)	Isracidina	Antimicrobiano	Bacterias Gram + y Gram -
$\alpha_{s2}$ -caseína	Tripsina	f(150-188)	Casocidina-I	Antimicrobiano	Bacterias Gram + y Gram -
	Quimosina	f(181-207)	Casocidina-I	Antimicrobiano	Bacterias Gram + y Gram -
	Pepsina	f(165-170)	Casocidina-I	Antimicrobiano	Bacterias Gram + (en su mayoría)
$\beta$ -caseína	Tripsina			Antioxidante	Actividad inhibitoria de reacción de oxidación catalizada por lipoxigenasa y actividad anti radical DPPH
$\kappa$ -caseína	Pepsina	f(106-169)	Kappacina f	Antimicrobiano	Bacterias Gram + (en su mayoría)
	Fermentación de la leche por <i>Lactobacillus bulgaricus</i>			Antioxidante	Actividad de eliminación radical DPPH
Caseína	Pepsina	Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu		Antioxidante	Actividad de eliminación de radicales DPPH y anion superoxido
$\beta$ -lactoglobulina	Tripsina	f(15-20)	$\beta$ -lactoglobulina f	Antimicrobiano	Bacterias Gram +
	Termolisina			Antioxidante	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

### 1.3.2. Obtención de los péptidos bioactivos

Los péptidos requieren ser liberados de su proteína precursora para lograr obtener una actividad determinada, puesto que inicialmente se encuentran

inactivos al interior de la secuencia proteica (Gobbetti et al. 2004; Korhonen y Pihlanto 2003). Para ello, existen distintos procesos de hidrólisis que permiten romper los enlaces químicos de la proteína, generando péptidos con una secuencia específica de aminoácidos y con ello una actividad fisiológica en el organismo. Estos péptidos pueden obtenerse a través de procedimientos *in vivo* o *in vitro*. (Korhonen y Pihlanto 2006). La digestión gastrointestinal y la fermentación de la leche con cultivos proteolíticos de iniciación son ejemplos de procesos *in vivo* en donde se han reportado una serie de péptidos de importancia, ya sea inmunomoduladores o inhibidores de la ECA (Korhonen y Pihlanto 2006).



Por otro lado, el rompimiento de los enlaces peptídicos con ácidos o bases, la proteólisis por enzimas provenientes de microorganismos o plantas, y la hidrólisis enzimática por enzimas digestivas son los procedimientos *in vitro* documentadas (Korhonen y Pihlanto 2003). Enzimas como papaína, termolisina y alcalase son algunas de las enzimas provenientes de bacterias o vegetales utilizadas para obtener péptidos como caseinofosfopéptidos (CPP), que presentan una actividad quelante de metales (Urista et al. 2011) y péptidos inhibidores de la ECA, que derivan con éxito principalmente de enzimas microbianas (Korhonen y Pihlanto 2003). Sin embargo, la hidrólisis proteica a partir de enzimas digestivas es una de las técnicas más comúnmente utilizadas, especialmente a partir de enzimas como tripsina (Moller et al. 2008) u otras enzimas específicas, desempeñando

un papel importante en la producción de péptidos bioactivos y a través de la cual se realizará nuestro estudio. Una vez que se obtiene el hidrolizado de proteínas o el péptido bioactivo, es necesario desarrollar métodos *in vitro* para detectar las propiedades de los péptidos que puedan tener beneficios potenciales *in vivo* (Hartmann y Meisel 2007).

### **Hidrólisis enzimática con enzimas digestivas**

La forma más común de producir péptidos con bioactividad es a través de la hidrólisis enzimática de proteínas completas. Existen muchos péptidos conocidos y documentados que se han obtenido utilizando enzimas gastrointestinales, por lo general tripsina o pepsina. Por ejemplo, los péptidos inhibidores de la ECA y los fosfopéptidos de unión al calcio (caseinofosfopéptidos) se producen comúnmente con tripsina (Meisel y FitzGerald 2003) además de obtenerse péptidos con actividad antimicrobiana a partir de proteínas séricas (Gobbetti et al. 2004). Por otro lado, se han utilizado otras enzimas o combinaciones de las mismas, como alcalase, quimotripsina, pancreatina y pepsina. Estudios han reportado que con pepsina se han obtenido péptidos con actividad opioide, antimicrobiana e inmunomoduladora a partir de distintas variantes de caseína y también a partir de las proteínas del suero. (Gobbetti et al. 2004). Este método se realiza con tratamientos de temperatura a

condiciones óptimas de cada enzima, donde generalmente se requiere gran cantidad de horas para el proceso de hidrólisis (método convencional), sin embargo, diversos estudios han utilizado la técnica de digestión asistida por microondas, optimizando así el tiempo en el proceso.

#### **1.4. Digestión Asistida por Microondas (DAM)**

La Digestión Asistida por Microondas (DAM) es un procedimiento utilizado para la preparación de muestras en el análisis de la química analítica. En general, el uso del microondas está principalmente enfocado a procesos de extracción de compuestos volátiles y fenólicos y en procesos de digestión con ácidos, no obstante, en esta oportunidad utilizamos la técnica de DAM para hidrólisis de muestras con enzimas. Las microondas son radiaciones electromagnéticas con un rango de frecuencia entre 300 a 300000 MHz y con una longitud de onda entre 1 mm a 1m (Lill et al. 2007). Para procesos de digestión la microonda utilizada es de 2450 MHz equivalente a 12.25 cm de longitud de onda. Las ventajas del uso de microondas por sobre otros procesos convencionales de calentamiento es la selectividad que presenta, permitiendo realizar digestiones en un corto periodo de tiempo (Pramanik et al. 2002), esto debido al calentamiento selectivo obtenido de la fricción intermolecular producto de la alineación de iones y dipolos al campo eléctrico oscilante de las microondas

y una disipación posterior de la energía por calentamiento en el núcleo, siendo además un proceso limpio que conlleva un ahorro de energía entre el 25 y 75%, permitiendo además, el control de parámetros como la presión, tiempo y temperatura de trabajo, obteniéndose así resultados óptimos y en tiempos más reducidos. Los resultados experimentales indican que la temperatura de digestión, tiempo de reacción, relación enzima a sustrato y solución buffer de digestión, son los factores primordiales a la hora de optimizar el método para una hidrólisis exitosa (Reddy et al. 2010).

En la actualidad, las proteínas de la leche son las fuentes más conocidas de ingredientes activos, pero recientemente la producción comercial de estos péptidos se ha visto limitada por la falta de tecnologías adecuadas a gran escala (Korhonen 2009), por lo que incorporar técnicas que sean viables y reproducibles puede ser un enfoque importante a nivel industrial. Además, en los últimos años, la utilización del microondas para la digestión de muestras orgánicas ha ido en aumento. Por las ventajas mencionadas previamente, en la presente tesis se optimizará un método para la digestión de proteínas lácteas mediante esta técnica.

### 1.5. Caracterización mediante técnicas de separación

Existen diversas técnicas de separación de componentes, entre ellas la electroforesis y la cromatografía. En relación a la electroforesis, una de las más frecuentes es la electroforesis en gel de poliacrilamida, que consiste en la migración de moléculas cargadas a través de un medio por la acción de un campo eléctrico, cuyas moléculas con carga positiva migran al cátodo y las que presentan carga negativa al ánodo. La velocidad de migración depende de la carga de la molécula que migra, la intensidad del campo eléctrico y las características del medio en que tiene lugar la migración.

Por otro lado, tenemos la cromatografía, técnica más utilizada que la anterior, en donde los solutos se separan en base a las distintas velocidades de desplazamiento cuando son arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria (sólida o líquida). Entre las más utilizadas se encuentra la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual consiste en un sistema de flujo impulsado por bomba a alta presión de una mezcla disuelta en la fase móvil a través de una columna empaquetada con la fase estacionaria, cuya separación de componentes es por interacciones químicas entre el analito y la columna. También tenemos la cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC), técnica que será utilizada en este estudio y que se describe a continuación.

### **1.5.1. Cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC)**

Es un método de elección por su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y versatilidad en la detección de sustancias en comparación a otros métodos de separación de mezclas, con una fase estacionaria y una móvil. El principio de separación se basa en un proceso de adsorción en la cual la fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (adsorbente) aplicada como una capa fina y uniforme sobre un soporte inerte. Por tanto, la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o migrará con la fase móvil viajando a una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. Esta técnica comprende diferentes etapas: preparación de la fase móvil en la cámara de desarrollo, activación de la placa, siembra de las muestras, desarrollo de la placa y finalmente revelado, siendo esta técnica la elegida para la separación de las proteínas digeridas.

### **1.6. Actividades biológicas de interés en el estudio y su papel en la salud**

En la presente tesis, se determinará la bioactividad de péptidos lácteos de  $\alpha$  - caseína, mediante técnicas de inhibición enzimática sobre las enzimas acetilcolinesterasa y  $\alpha$ -glucosidasa, involucradas en la patogénesis de enfermedades crónicas como la enfermedad de Alzheimer y diabetes mellitus

tipo II respectivamente. También se determinará capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de los posibles péptidos generados. A continuación, se detalla la importancia de cada una de estas actividades biológicas y su papel relevante en la salud.

### **1.6.1. Inhibición de acetilcolinesterasa (AChE)**

La acetilcolinesterasa es la enzima encargada de catalizar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, lo que conlleva a la inactivación de la misma en la placa motora. Este neurotransmisor está implicado en varios procesos nerviosos de gran importancia, cuya deficiencia significativa genera un mal funcionamiento de las vías colinérgicas e impide el correcto mensaje entre las células nerviosas provocando enfermedades de gran impacto como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Kumar et al. 2015) y el Parkinson (Rolinski et al. 2012). Debido a esto, la inhibición de la AChE es fundamental para impedir que siga degradando la acetilcolina que se está sintetizando de manera escasa en estas patologías, siendo un enfoque terapéutico contra dichas enfermedades (se incluyen también la esquizofrenia y el autismo). En el caso de la EA, los medicamentos que fueron introducidos en la industria para su tratamiento actúan precisamente inhibiendo la AChE, como lo son donepezil, rivastigmina y galantamina, corrigiendo de esta manera la deficiencia en los niveles del neurotransmisor acetilcolina. Sin

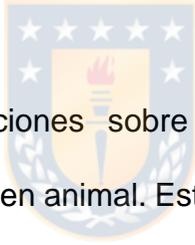
embargo, los fármacos administrados en la actualidad solo muestran una ralentización de la progresión de la EA, además de los efectos adversos propios que conllevan, por lo que encontrar nuevos posibles inhibidores de AChE es relevante.

### **1.6.2. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasa**

Las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV tienen un rol importante en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo II (DT2), por lo que la inhibición de su actividad es una estrategia en el manejo de esta enfermedad crónica de alto impacto a nivel global. Específicamente, la  $\alpha$ -glucosidasa es una enzima clave en la síntesis y degradación de carbohidratos, en donde disminuir la hiperglucemia postprandial y retardar la absorción de glucosa mediante la inhibición de enzimas hidrolizantes de carbohidratos es un enfoque terapéutico para pacientes diabéticos (Patil et al. 2015). Actualmente, los compuestos que inhiben las glucosidasas son potencialmente útiles como agentes antidiabéticos, antiobesidad, antivirales, antibacterianos o antimetastásicos (Mehta et al. 1998). Por lo tanto, hay numerosos estudios enfocados en identificar inhibidores en fuentes naturales, informándose en una variedad de frutas, como arándanos y fresas, vegetales como el brócoli y en proteína de clara de huevo. (Patil et al. 2015). La búsqueda de inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa de la naturaleza llevó al

descubrimiento de miglitol y acarbosa, medicamentos que se usan actualmente como agentes terapéuticos, además de otros como la voglibosa y el emiglit. Todos estos se utilizan en pacientes con hiperglucemia postprandial, sin embargo, su uso crónico puede producir efectos secundarios como los provocados a nivel GI, por lo que encontrar otros enfoques terapéuticos es de gran importancia.

### **1.6.3. Capacidad antioxidante**



Existen muchas publicaciones sobre las propiedades antioxidantes de vegetales o proteínas de origen animal. Esto se debe principalmente al conocido estrés oxidativo, el que se define como un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que a su vez está relacionado con una gran variedad de patologías según los estudios epidemiológicos que se muestran cada año: diabetes mellitus tipo II, enfermedades coronarias como aterosclerosis, inflamación crónica, cáncer y trastornos neurodegenerativos. Por ello, es que la ingesta de compuestos antioxidantes es tan importante y se asocia con un menor riesgo de morbilidad y mortalidad. Debido a lo anterior, es que se requieren pruebas simples y rápidas para determinar la propiedad antioxidante de una variedad de muestras, para lo

cual se han desarrollado diferentes ensayos in vitro como DPPH, ORAC, ABTS, entre otros (López y Denicola 2013).

#### 1.6.4. Actividad antimicrobiana

A pesar de la existencia de potentes antibióticos disponibles para el tratamiento de infecciones microbianas, la resistencia de las bacterias a estos medicamentos se ha convertido en una amenaza mundial que ha provocado aumento de casos infecciosos, y con ello mortalidad. Los péptidos antimicrobianos derivados de las caseínas de la leche muestran ciertas ventajas desde ese ámbito, puesto que matan células diana rápidamente, presentando un amplio espectro de actividad (McCann et al. 2006) puesto que exhiben actividades contra diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre los que se encuentran *Staphylococcus spp*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, además de levaduras y hongos. Sus mecanismos no son del todo específicos y en consecuencia los patógenos no pueden generar gran resistencia como sí ocurre con algunos antibióticos (Zhang et al. 2005), lo que según (Phelan et al. 2009) conlleva a que la tasa de multiplicación bacteriana sea menor respecto a la tasa de muertes generada. Uno de los mecanismos de acción que describen la acción inhibitoria de estos péptidos podría ser la permeabilización de la membrana celular mediante la

formación de poros transmembrana (Mohanty et al. 2016). Los péptidos antimicrobianos también son importantes en la inmunidad innata, por lo que desempeñan un papel crucial en la promoción de la protección inmunológica natural al reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Mohanty et al. 2016).

### **1.7. Aplicaciones comerciales de los péptidos bioactivos**

El interés creciente por incorporar sustancias bioactivas a los alimentos se justifica por todos los beneficios potenciales que aportarían a la salud y el bienestar, por lo que tanto la industria alimentaria como la farmacéutica han estado presentes en ese contexto. Hoy en día los péptidos bioactivos son fundamentales en los productos comercializados como alimentos funcionales o nutracéuticos, por lo que la leche ha expandido aún más su valor al ser fuente de proteínas productoras de ingredientes funcionales. En la Tabla 1-4 se incluyen algunos ejemplos disponibles en el comercio.

Tabla 1-4. Alimentos funcionales a partir de proteínas de la leche disponibles en el mercado (Hartmann y Meisel 2007).

Nombre del Producto comercial	Fabricante	Tipo de alimento	Péptido bioactivo	Efecto en la salud
Calpis AMEEL S	Calpis Co, Japón	Leche agria	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro de $\beta$ -CN y $\kappa$ -CN	Antihipertensivo
C12 Pepton	DMV, Países Bajos	Ingrediente	Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys f(23-34) de $\alpha_{s1}$ -CN	Antihipertensivo
ProDiet F200	Ingredia, Francia	Bebida láctea, confitería	f (91-100) de $\alpha_{s1}$ -CN	Reducción del estrés
Capolac	Arla Foods, Dinamarca	Ingrediente	Caseinofosfopeptido (CPP)	Absorción de minerales
BioPURE-GMP	Davisco, EE.UU	Hidrolizado de proteína del suero	Glicomacropéptido (GMP)	Antimicrobiano Antitrombotico Anticariogenico

## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### Presentación y justificación de la elección del problema

El impacto de las enfermedades crónicas no transmisibles y su índice de mortalidad ha ido en incremento en los últimos años tanto en Chile como a nivel mundial. Uno de los factores desencadenantes primordiales es la dieta, por lo que encontrar formas de reducir su avance a través de la misma es esencial. Es por esto, que mediante las proteínas de la leche se desea encontrar péptidos con actividad biológica que aporten en su prevención y tratamiento oportuno, incluyendo también las enfermedades infecciosas que han tenido un alza en resistencia a tratamientos convencionales, todo esto para mejorar la calidad de vida de las personas disminuyendo así la tasa de morbilidad y mortalidad prematura.

## 2. HIPÓTESIS

La digestión de  $\alpha$ -caseína de la leche mediante la radiación de ondas de microondas genera péptidos con actividad biológica.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Obtener péptidos bioactivos a partir de  $\alpha$ -caseína de la leche mediante la Digestión Asistida por Microondas (DAM).



### 3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Optimizar mediante diseño de experimentos la digestión enzimática de  $\alpha$ -caseína en la generación de péptidos mediante DAM.
- 3.1.2. Evaluar bioactividad de péptidos generados como antioxidantes, antibacterianos e inhibidores enzimáticos ( $\alpha$ -glucosidasa y acetilcolinesterasa) mediante HPTLC- bioensayo.
- 3.1.3. Optimizar la producción de péptidos bioactivos obtenidos por DAM utilizando diseño de experimentos.

## 4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 4.1. Reactivos y sustancias químicas

Tripsina de páncreas bovino,  $\alpha$ -caseína bovina, pepsina, ácido clorhídrico, acetilcolinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa, Tris base, bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 99%), iodoacetamida (IAM), DL-ditiotreitol (DTT), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), fosfato mono-potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato di-sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), trietilamina 10% v/v, fluorescamina, 2-propanol, n-butanol, amoníaco 32% v/v, agua ultrapura (18 M $\Omega$  cm), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), etanol absoluto, metanol, placas HPTLC sílica gel 60F<sub>254</sub>, 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, ácido cafeico, 1-naftil-acetato, donepezilo, fast blue B.

### 4.2. Preparación de soluciones

**Buffer bicarbonato de amonio 0.05 M:** Esta solución fue preparada pesando 395.3 mg de bicarbonato de amonio en 100 mL de agua destilada.

**Buffer IES:** Compuesta por una mezcla de sales, 50 g/L de NaCl; 6g/L de KCl y 3 g/L de CaCl<sub>2</sub> (ésta última se prepara a partir de una solución de 100g/L) disueltas a un volumen final de 250 mL de agua destilada.

**Buffer fosfato 0.1 M:** En 100 mL de agua ultrapura fueron disueltos 910 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 570 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se ajusta pH a 7.4 con KOH 2M.

**Donepezilo 100 mg/L:** Se disuelven 10 mg en 100 mL de metanol.

**Ácido cafeico 300 mg/L:** Se disuelven 3 mg en 10 mL de solución metanol/agua (7/3).

**Sustrato 1-naftil acetato:** Se disuelven 15 mg en 12 mL de metanol y se almacena en frasco ámbar.

**Sustrato 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido:** Se disuelven 15 mg en 12 mL de metanol y se almacena en frasco ámbar.

**Revelador Fast Blue:** Se disuelven 9 mg en 12 mL de agua ultrapura y se almacena en frasco ámbar.

**Solución DPPH:** Se disuelven 80 mg de DPPH en 220 mL de metanol.

**Caldo Muller-Hinton:** Se disuelven 2.1 g en 100 mL de agua purificada y se autoclava.

**Buffer PBS:** Se pesan 24.5 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 800.6 mg de NaCl, 20.1 mg de KCl y 141.96 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 100 mL de agua destilada, y luego se ajusta pH a 7.4 con KOH 2M.

**Solución MTT 0.2% p/v (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-bromuro de difenil tetrazolium):** Se disuelve 200 mg en 100 mL de buffer PBS.

**Oxitetraciclina 1mg/mL:** Se prepara en una mezcla metanol: agua (40:60).

#### **4.3. Digestión enzimática asistida por microondas (DAM)**

Como se mencionó anteriormente, la utilidad del microondas para digerir muestras tiene como uso principal hidrólisis con ácidos, pero para efectos de este estudio se utilizó hidrólisis por medio de enzimas. El equipo utilizado es un microondas ETHOS X (Milestone, Italia), el cual contiene una puerta de acero inoxidable con un mecanismo que controla la apertura o cierre de la misma ante las distintas condiciones, brindando una mayor seguridad. Contiene una termocupla para la lectura de la temperatura dentro del sistema, por ende, los vasos cerrados de 250 mL que contiene, deben tener un rango mínimo de 12-15 mL de muestra para la correcta lectura de la misma, esto principalmente en el vaso usado como referencia durante el proceso. El terminal compacto con el software y pantalla táctil que presenta permite ajustar los parámetros deseados para cada una de las digestiones, y así guardar los métodos deseados. En cuanto a la potencia utilizada, ésta depende de la cantidad de vasos que se encuentren en uso durante la digestión, en el cual, para un mínimo de 3 vasos la potencia utilizada fue de 500 a 800 W. Para este caso, se utilizó como máximo 4 vasos simultáneos, por ende, la potencia usada fue de 800 W. Finalmente, la lectura de la temperatura se divide en tres secciones: temperatura de elevación,

mantenimiento y enfriamiento, en donde la temperatura de elevación y de enfriamiento se dejó con un tiempo de 5 minutos cada uno.

Para realizar el proceso de digestión por microondas, se probaron dos métodos para determinar la mínima concentración de enzima/proteína (E/P) a utilizar para ser detectada por HPTLC. En el **método 1**, incorporamos directamente en vaso de microondas la mezcla de enzima y de proteína preparada previamente en tubo falcon, teniendo como mínimo un volumen final en vaso de 15 mL, como se observa en la Figura 4-3 a modo de ejemplo con una relación de E/P 1/20. Por otro lado, en el **método 2**, la solución de caseína y enzima fue preparada en un tubo de 1.5 mL, para reducir a una cantidad menor de ambas soluciones. Luego, esta solución es diluida en el vaso con buffer, y así completar el volumen mínimo de 15 mL requerido. En la Figura 4-3 se observa un esquema ejemplificando el procedimiento, con una relación E/P de 1/20, evaluando la mínima concentración de péptidos digeridos detectable por HPTLC.

Para efectos de este estudio, finalmente se utilizó el método 1, puesto que las muestras digeridas con tripsina no se lograron detectar por HPTLC con el método 2, posiblemente por la dilución requerida para completar el volumen en el vaso de microondas, sin embargo, comparando los métodos en cuanto a consumo de enzima y proteínas, ambos utilizan cantidades similares de reactivos.

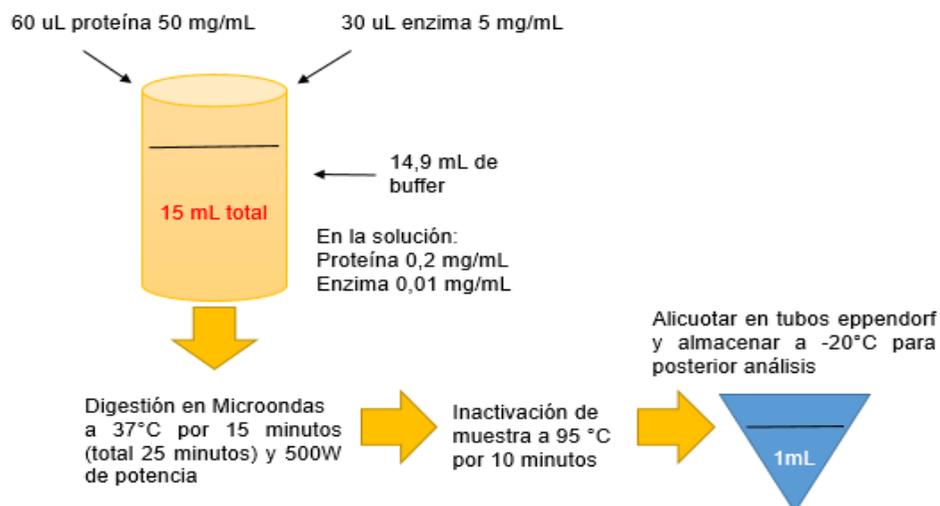
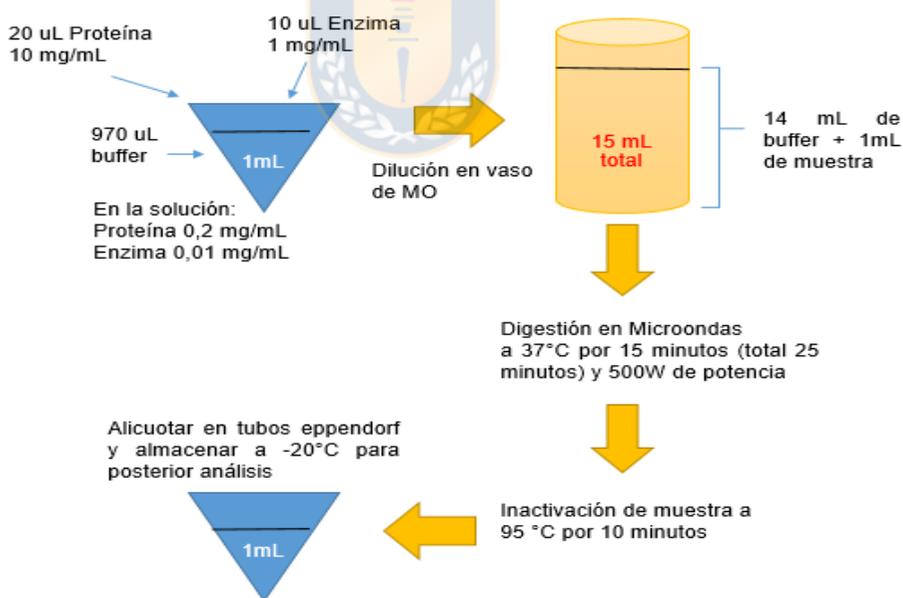
**Método 1****Método 2**

Figura 4-3. Métodos evaluados para realizar una correcta digestión por microondas.

#### 4.3.1. Digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con tripsina

La preparación de las muestras de  $\alpha$ -caseína digeridas con tripsina, se realizó siguiendo el método propuesto por (Matarozzi et al. 2014) con algunas modificaciones.

En primera instancia, se preparó un buffer adecuado para solubilizar la enzima, seleccionando en este caso bicarbonato de amonio 0,05 M, el cual también se utilizó para solubilizar la proteína. Una vez lista las soluciones, se adicionó la cantidad deseada para la relación determinada de E/P agitándose cuidadosamente. Las muestras fueron introducidas en los vasos del microondas y una de ellas en el vaso de referencia y se ajustó la termocupla para la lectura de temperatura de digestión. Posteriormente las muestras fueron digeridas en el microondas utilizando las condiciones de digestión con los distintos parámetros de tiempo, temperatura y relación E/P determinadas en el diseño de experimentos.

Además, se evaluó la digestión previa reducción y alquilación utilizando IAM y DTT. A la muestra de proteína se adicionó 12  $\mu$ L de IAM 0.01 M, se incubó por 5 minutos a 95°C y fue enfriado. Luego se adicionó 24  $\mu$ L de DTT 0.01 M y fue incubado por 15 minutos en oscuridad. Una vez realizado este procedimiento, se

adicionó 20  $\mu$ L de tripsina modificada para la hidrólisis de la muestra y se realizó la digestión en microondas por 15 minutos a 37 °C.

#### 4.3.2. Digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con pepsina

Se utilizó el método de hidrólisis *in vitro* descrito en el estudio de Bove (Bove et al. 2013), con algunas modificaciones de tiempo y temperatura de digestión descritos en (Miquel et al. 2006).

Pepsina fue preparada a una concentración de 240 mg/mL en buffer IES, agitando suavemente hasta disolver por completo. Luego, estas fueron alicuotadas en volúmenes de 1 mL y almacenadas a -20 °C para su posterior uso. Por otro lado, caseína fue preparada a una concentración de 40 mg/mL en bicarbonato de amonio 0.05 M agitando cuidadosamente. Se adicionan 312  $\mu$ L de pepsina en 25 mL de caseína, realizando la posterior digestión por 15 minutos. Finalmente, la relación E/P fue de 1/13, donde la concentración final de pepsina fue de 3 mg/mL. Este método se utilizó de manera previa como referencia para analizar la separación de las bandas, ya que las concentraciones definitivas utilizadas en este estudio se determinaron mediante diseño central compuesto.

#### 4.4. Optimización de la digestión enzimática

Para optimizar el proceso de digestión asistido por microondas se utilizó un modelo estadístico: **diseño central compuesto (DCC)** centrado en las caras con dos puntos centrales, el cual entregó una cantidad de experimentos de manera aleatoria según las variables elegidas a partir de la respuesta del diseño.

#### 4.5. Análisis cromatográfico utilizando HPTLC

Las muestras digeridas se analizaron mediante TLC Sampler 4 (ATS 4, CAMAG, Muttenz, Suiza). La cromatografía fue realizada sobre placas de HPTLC sílica gel 60F<sub>254</sub> (20 x 10 cm), aplicando carriles de 7 mm, velocidad de banda de 10 mm/s, primera aplicación en eje x: 12 mm y eje y: 10 mm, para 16 carriles por placa. La separación cromatográfica se realizó mediante la cámara de revelado automático ADC2, CAMAG, utilizando una fase móvil compuesta por 2- propanol / n-butanol / amoníaco / agua (57/20/20/3 v/v/v/v) hasta una distancia de migración de 70 mm. La placa desarrollada fue secada en placa calefactora CAMAG TLC por 30 minutos a 95 °C. Los instrumentos fueron controlados mediante el software CAMAG WinCats 1.4.7.

#### 4.6. Derivatización post cromatográfica

La placa desarrollada fue derivatizada con una solución de fluorescamina al 0,02% p/v en acetona por dos segundos, y secada por 20 minutos a 95 °C. Luego, la placa es sumergida en una solución de trietilamina al 10% v/v en acetona, dejando secar por 20 minutos a 95 °C. La visualización y evaluación se realizó por medio del sistema de foto documentación Digistore 2 Camag, con una fluorescencia de 366 nm y 254 nm.



#### 4.7. Cuantificación de bandas mediante procesamiento de imagen digital

El procesamiento de imagen fue aplicado para cuantificar las dos variables dependientes o críticas de ambos diseños de experimento, estas son: **intensidad del total de bandas por digestión e intensidad de bandas de los péptidos bioactivos**, cuyas respuestas permiten evaluar la mejor condición de digestión por microondas que genera la mayor cantidad de péptidos y péptidos bioactivos respectivamente. La evaluación se hizo a partir de fotografías de cromatograma de placa, cuyo procesamiento y análisis de imagen se llevó a cabo utilizando el software ImageJ versión 1.53a (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Todas las fotografías de los cromatogramas en placa fueron trabajadas en formato tiff con una resolución de 500 dpi. Sobre esta imagen se realizó un pretratamiento utilizando el software Adobe Photoshop CC versión 2017.1.1. En el software ImageJ, cada banda objetivo fue seleccionada con la herramienta "Rectangle", considerando un tamaño de selección uniforme y que abarque toda la banda. Los diagramas de perfil de bandas se obtuvieron utilizando el menú "Analyze", luego la opción "Gels" y en ella seleccionar "First lane" para numerar la primera banda objetivo, y "Next lane" para las bandas siguientes, cuyo término de selección se cierra con "Plot lanes". Luego, cada pico fue definido usando la herramienta "Straight", el cual permite trazar una línea recta en la base del pico para posteriormente seleccionar toda el área trazada a partir de la herramienta "Wand". Finalmente, el área se obtuvo aplicando en el menú "Analyze" la opción "Measure". Las áreas obtenidas permiten cuantificar las intensidades relativas de cada banda objetivo, y así aplicar los datos al software Modde 7 para posterior análisis de óptimo de respuesta.

## 4.8. Bioensayos de inhibición evaluadas de forma directa por HPTLC

### 4.8.1. Bioensayo de inhibición enzimática para acetilcolinesterasa

Existen dos métodos para evaluar la actividad biológica de los compuestos y lograr la detección de inhibidores de AChE, utilizando HPTLC: método de diazotización, que utiliza acetato de 1-naftilo y fast blue B para producir un tinte diazonio de color púrpura, cuyos compuestos inhibidores se ven como manchas blancas sobre la placa (Marston et al. 2002) (Figura 4-4), y el segundo método utiliza el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) y la solución de yoduro de acetiltiocolina para producir 5-tio-2-nitrobenzoato de color amarillo (Rhee, van de Meent et al. 2001) . Para efectos de este estudio se utilizó el **método de detección por diazotización** descrito por Marston (Marston 2011) con algunas modificaciones, cuyo procedimiento se detalla a continuación:

Los péptidos digeridos son sembrados y desarrollados como se describe en el punto 4.5. Posteriormente en placas cortadas en dimensiones 5 x 10 cm fue sembrado 3  $\mu$ L del control positivo donepezilo a una distancia de 45 mm y sumergidas por 2 segundos en una cámara de inmersión que contiene 15 mL de buffer fosfato 0,1 M, donde el exceso de líquido fue retirado con papel absorbente y secada por 15 minutos a 70°C en placa calefactora. El sustrato 1-naftil acetato

fue aplicado de la misma manera que el buffer, sin embargo, fue secado por 15 minutos a 60°C. Luego, la placa fue sumergida por 2 segundos en esta solución de enzima AChE en buffer fosfato 0.1 M, el exceso es retirado con papel absorbente e incubada por 15 minutos a 37°C en cámara de incubación implementada, la que contiene en el fondo papel humedecido con agua ultrapura para atmósfera de humedad, evitando el contacto de la placa con el fondo del recipiente. Finalmente, las placas son atomizadas con la solución reveladora fast blue y luego secadas a temperatura ambiente. La foto documentación se realiza con luz blanca.

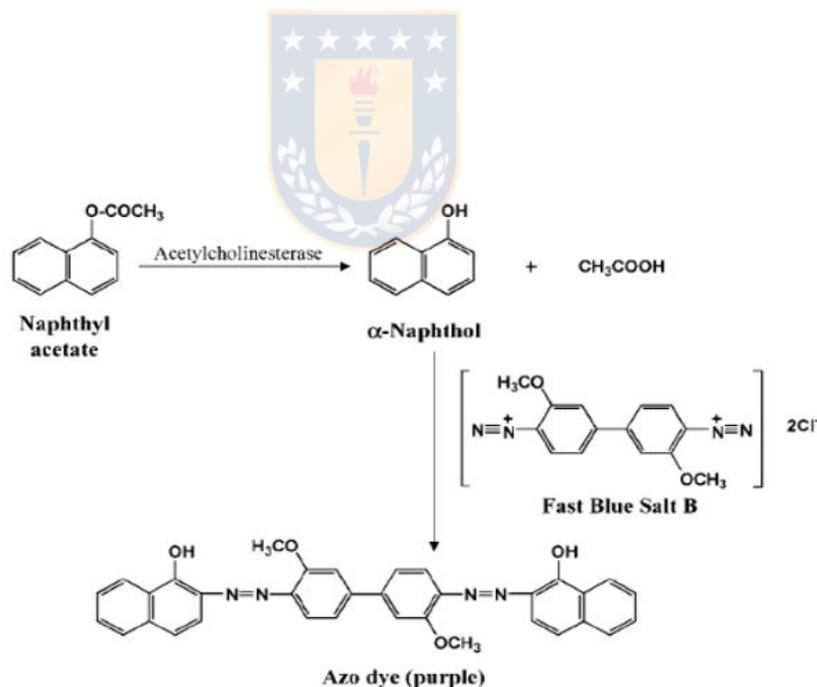
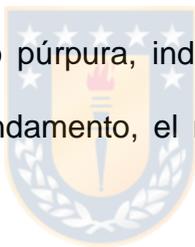


Figura 4-4. Reacción de acetilcolinesterasa con acetato de 1-naftilo para dar 1-naftol y la posterior formación del colorante azo púrpura (Marston 2011).

#### 4.8.2. Bioensayo de inhibición enzimática para $\alpha$ -glucosidasa

Para detectar inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa por HPTLC-bioensayo se tomó de referencia un método espectrofotométrico que implica la escisión de 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido por inhibidores de glucosidasa para formar 2-naftol (Simoes et al. 2009). El 2-naftol que se forma reacciona con la sal Fast Blue B, para dar un colorante diazo de color púrpura (Figura 4-5), de la misma forma como se encuentra en el ensayo para la detección de inhibidores de la acetilcolinesterasa. Al encontrarse actividad biológica de los compuestos, se observa una decoloración sobre el fondo púrpura, indicando actividad inhibitoria de estos mismos. En base a ese fundamento, el método utilizado en este estudio se describe a continuación:



En placa sembrada y desarrollada con los péptidos digeridos como se describe en el punto 4.5, se siembra 3  $\mu$ L del control positivo ácido cafeico a una altura de 70 mm en la placa y luego esta se corta a dimensiones de 5 x10 cm. La placa es sumergida por 2 segundos en una cámara de inmersión con 15 mL de buffer fosfato 0,1 M y el exceso de líquido se retira con papel absorbente, para luego secar sobre placa calefactora por 15 minutos a 70°C. Posteriormente, la placa se sumerge en el sustrato 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido con las mismas condiciones mencionadas anteriormente, sin embargo, la placa es secada por 15 minutos a 60°C. Luego, la placa es sumergida por 2 segundos en la solución de enzima  $\alpha$ -glucosidasa en buffer fosfato 0.1 M, el exceso de líquido retirado

con papel absorbente e incubada a 37°C por 15 minutos en cámara de incubación implementada como se describe en el punto anterior. Finalmente, las placas son atomizadas con el revelador fast blue y secadas a temperatura ambiente. La foto documentación se realiza con luz blanca.

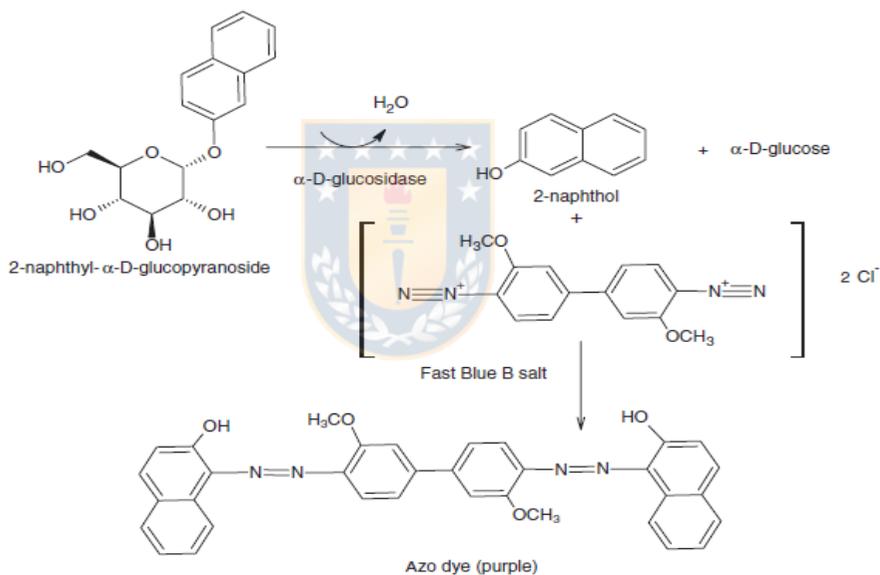


Figura 4-5. Reacción de  $\alpha$ -glucosidasa con 2-naftil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y la posterior formación del colorante azo púrpura (Simoies et al. 2009).

### 4.8.3. Capacidad Antioxidante - DPPH

El radical libre y coloreado 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), es empleado para determinar capacidad antioxidante. Presenta un máximo de absorción a 517 nm, que disminuye con la reducción a través de la reacción con un eliminador de radicales (Figura 4-6). Para el ensayo por HPTLC, la placa es sembrada con los péptidos digeridos, desarrollada y secada como se describe en el punto 4.5. Luego la placa es sumergida por 2 segundos en cromatógrafo de inmersión con la solución de DPPH y conservada por 20 minutos en oscuridad. Una reacción positiva indica zonas decoloradas en el fondo morado de la placa.

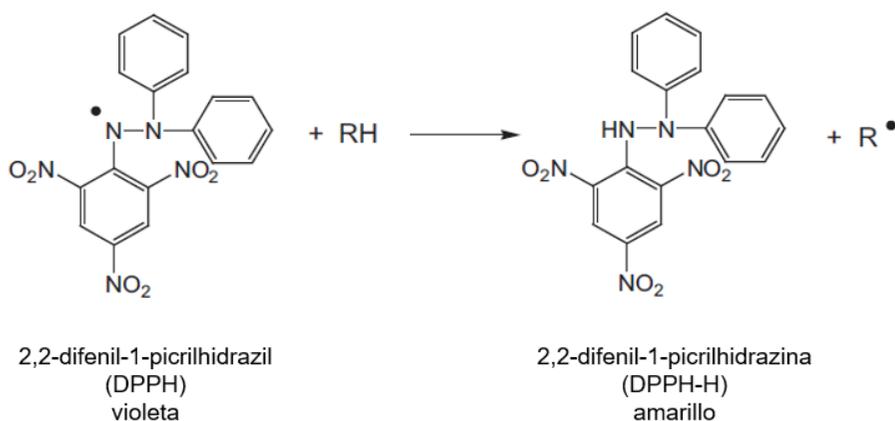


Figura 4-6. Reacción del radical DPPH y la especie antioxidante (Marston 2011).

#### 4.8.4. Actividad antimicrobiana - Bioautografía *Bacillus subtilis*

Se han reportado técnicas bioautográficas que permiten determinar la actividad antimicrobiana de diversas sustancias. Dentro de estas se encuentran la difusión de agar o de contacto, y la detección bioautográfica directa en placa de HPTLC (Choma y Grzelak 2011), cuya técnica es una de las más empleadas y la que se utilizara en el presente estudio. La presencia de compuestos antibacterianos se evaluó aplicando una bioautografía directa con *Bacillus subtilis* siguiendo el método descrito por (Jamshidi y Morlock 2015) con algunas modificaciones:



Los péptidos digeridos fueron sembrados, desarrollados y secados en la placa como se describe en el punto 4.5, además de sembrar 3  $\mu$ L del control positivo oxitetraciclina. Luego, las placas se sumergen en buffer fosfato, y se secan por 20 minutos a 100°C. Una vez secas, las placas fueron sumergidas en caldo de cultivo Muller-Hinton con  $1 \times 10^7$  UFC/mL en una cámara de inmersión (CAMAG) por 6 segundos a una velocidad de inmersión de 3.5 cm/s y luego incubada en cámara implementada con papel humedecido, por 2 horas a 37°C. Finalmente, las placas fueron reveladas, aplicando mediante atomización una solución salina de MTT al 0.2% p/v e incubadas a 37°C por 30 minutos, dejándolas secar en placa calefactora a 50°C durante 5 minutos. Los microorganismos metabólicamente activos reducen el MTT a púrpura de formazán (asociado con

la oxidación de las enzimas oxidoreductasa celulares dependientes de NADPH), y la presencia de péptidos antibacterianos se traduce en zonas incoloras sobre el fondo purpura. La imagen de la placa se fotodocumentó con luz blanca utilizando el sistema de documentación CAMAG.

#### **4.9. Análisis estadístico**

Los datos fueron evaluados utilizando estadística descriptiva (media, desviación estándar). El diseño central compuesto fue diseñado y analizado mediante el software MODDE versión 7.0.0.1 (Umetrics, Umea, Sweden). Los datos estadísticos se evaluaron con un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0.05 con el software estadístico Statgraphics Centurion XVII versión 15.1.02 (Rockville, MD, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Optimización de la digestión enzimática

#### 5.1.1. Selección de parámetros para DAM

Para una óptima digestión por microondas, se determinó que los parámetros a considerar son **temperatura de digestión, tiempo y relación E/P**, siendo estos los factores primordiales a la hora de optimizar un método para una hidrólisis exitosa (Reddy et al. 2010). Por lo tanto, se consideraron estas variables evaluando que son factores que pueden influir en la respuesta requerida, seleccionando como respuestas (variables dependientes o críticas) la **sumatoria de las intensidades de bandas por cada digestión y la intensidad de péptidos bioactivos por cada digestión**. En primera instancia, se realizó una pre optimización (screening) de las distintas variables o factores que podrían afectar la variable crítica, seleccionando finalmente las tres mencionadas anteriormente: temperatura (X1), tiempo (X2) y relación E/P (X3), además, se determinó que los otros factores experimentales no tuvieron mayor relevancia.

Para la digestión enzimática realizada con tripsina, se evaluaron distintas concentraciones de enzima: 0.01; 0.1 y 1 mg/mL, según lo realizado por (Pavon et al. 2019), evaluando la mínima concentración de enzima a utilizar y que fuera visiblemente detectada por el HPTLC, determinando una concentración de enzima de 0.01 mg/mL, y a partir de este, se probaron diferentes relaciones E/P manteniendo la concentración de enzima constante, puesto que en este estudio se pretende lograr el máximo rendimiento y detección con una concentración mínima de enzima. Además, es fundamental un control de la misma, debido a que puede ocurrir autólisis y disminuir la actividad enzimática (Hustoft et al. 2011). Finalmente, los parámetros de elección para las relaciones E/P seleccionadas en el experimento fueron de un mínimo de 1/20, con una concentración de enzima de 0.01 mg/mL y de sustrato 0.2 mg/mL; y un máximo de 1/200, con una concentración de enzima de 0.01 mg/mL y sustrato 2 mg/mL. La temperatura se determinó por literatura a partir de los rangos óptimos de actividad de la enzima, con un mínimo de 37°C y un máximo de 65°C (Reddy et al. 2010), y los tiempos de digestión seleccionados fueron de un mínimo y máximo de 3 y 30 minutos.

Por otro lado, para la digestión enzimática realizada con pepsina, también se realizó un screening probando distintas concentraciones de enzima: 0.1; 0.5; 1 y 1.5 mg/mL con una relación E/P de 1/13, basados en el estudio de (Bove et al. 2013). La concentración de elección fue de 1.5 mg/mL, a partir del cual se

probaron distintas relaciones E/P manteniendo la concentración de enzima constante. Se determinaron relaciones E/P con un mínimo de 1/13, correspondiente a una concentración de enzima de 1.5 mg/mL y de proteína 20 mg/mL y un máximo de 1/40, correspondiente a una concentración de proteína de 60 mg/mL. La temperatura de digestión se determinó por literatura a partir de los rangos óptimos de actividad de la enzima, obteniendo un mínimo de 30°C y un máximo de 55°C (Jesus et al. 2017). Finalmente, los tiempos de digestión seleccionados fueron de un mínimo y máximo de 3 y 20 minutos. En la Tabla 5-5 se resumen los intervalos determinados para cada una de las variables independientes.



Tabla 5-5. Rangos mínimos y máximos determinados para las variables independientes de ambos diseños en muestras digeridas con tripsina y pepsina.

<b>Variable Diseño de Experimento</b>	<b>Digestión con Tripsina<sup>a</sup></b>	<b>Digestión con Pepsina<sup>b</sup></b>
Relación E/P	1/20 a 1/200	1/13 a 1/40
Temperatura de digestión (°C)	37 a 65	30 a 55
Tiempo de digestión (min)	3 a 30	3 a 20

<sup>a</sup> concentración de tripsina 0.01 mg/mL

<sup>b</sup> concentración de pepsina 1.5 mg/mL

### 5.1.2. Optimización de la digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con tripsina

Para optimizar las condiciones de digestión enzimática, se realizó un **diseño central compuesto centrado en las caras**, método seleccionado porque presenta una alta eficiencia con un número reducido de experimentos (Dejaegher 2011). El software utilizado fue Modde 7 el cual arrojó experimentos de manera aleatoria. En la Tabla 5-6 se observa la ronda de experimentos determinados por el software según el diseño de experimentos seleccionado. Luego de obtener los parámetros de cada experimento, se realizaron las digestiones en microondas, y se inactivaron con calor a 95°C por 10 minutos. Para la separación cromatográfica mediante HPTLC, se sembraron en placa 12  $\mu$ L de cada condición de digestión, y desarrollada con la fase móvil descrita en el punto 3.5. Luego la placa fue secada a 95°C por 30 minutos, derivatizada y nuevamente secada, para finalmente realizar la foto documentación a 366 nm. Según los resultados observados, la relación E/P fue la variable que más influyó en cada una de las muestras, observándose con mayor nitidez las digestiones con una relación E/P de 1/110 y 1/200, debido a la mayor concentración de proteína en ellas (Figura 5-7). Por ende, la proporción E/P es fundamental para lograr una adecuada digestión y mayor rendimiento. En cuanto a la temperatura y tiempo de digestión, no hubo mayor diferencia entre muestras. También, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 5-8) para evaluar que

efectivamente hubo digestión y no una autólisis enzimática. La autólisis puede evitarse cambiando la tripsina tradicional utilizada en el diseño, por tripsina modificada la cual es mucho más costosa pero proporciona gran especificidad al producir una molécula activa muy estable resistente a la autólisis (Finehout et al. 2005). En relación a lo anterior, se seleccionaron 2 de las 16 digestiones para realizar el procedimiento con tripsina modificada, basándonos en las diferencias cualitativas entre una digestión y otra, considerando que la variable más influyente (relación E/P) no se repita en las dos digestiones seleccionadas (n° exp 11 y 14).

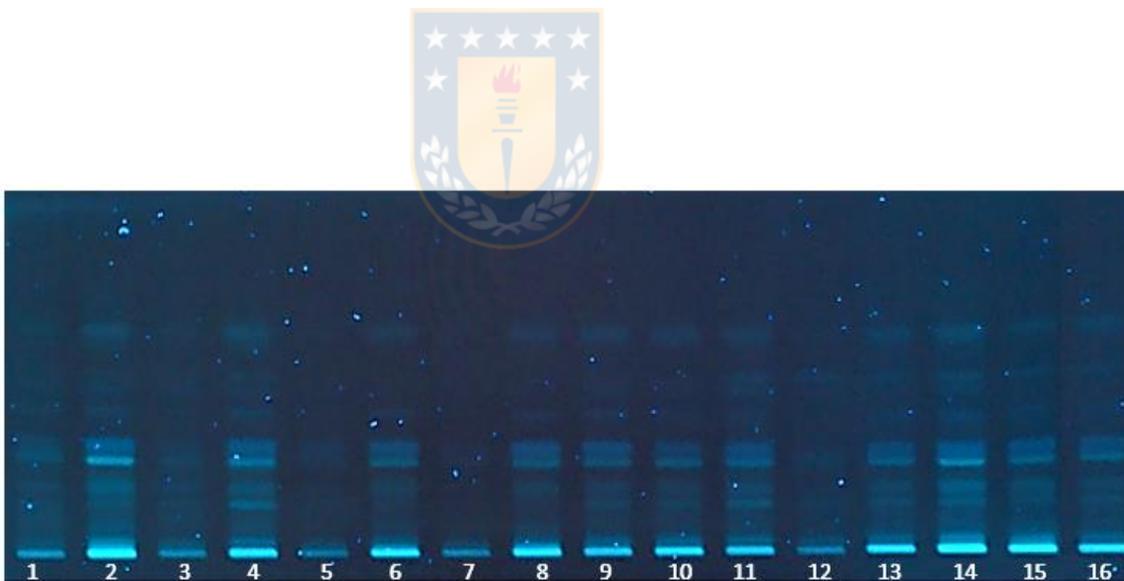


Figura 5-7. Diseño de experimentos de  $\alpha$ -caseína digerida con tripsina a 0.01 mg/mL. Cada número indica condiciones de digestión. Volumen de sembrado de péptidos 12  $\mu$ L en placa ProteoChrom HPTLC.

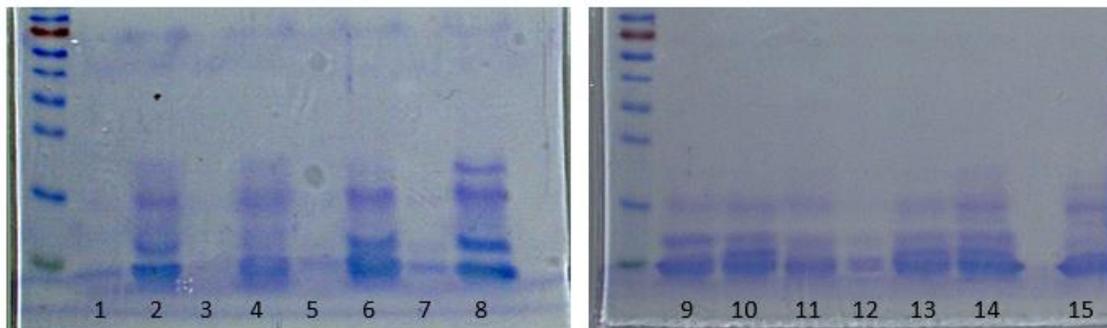


Figura 5-8. Electroforesis en gel (SDS PAGE) de proteínas digeridas con tripsina 0.01 mg/mL. Cada número indica condiciones de digestión del diseño de experimentos.



### 5.1.3. Optimización de la digestión enzimática de $\alpha$ -caseína con pepsina

La optimización de la digestión enzimática con pepsina fue realizada de la misma manera que la digestión enzimática con tripsina, la cual arrojó los datos mostrados en la Tabla 5-7. Una vez obtenidos los parámetros, se realizaron las digestiones en microondas, inactivándose cada una de las muestras con calor a 95°C por 10 minutos. Para el análisis por HPTLC, se sembraron 10  $\mu$ L de cada una de las muestras, se realizó el desarrollo y derivatización y finalmente la foto documentación a 366 nm donde se observaron péptidos de cada una de las muestras (Figura 5-9).

A simple vista la imagen nos indica que cualitativamente no existe mayor diferencia entre muestras, sin embargo, se puede observar diferencia en cuanto a cantidad e intensidad de péptidos por cada muestra digerida.



Figura 5-9. Diseño de experimentos de  $\alpha$ -caseína digerida con pepsina a 1.5 mg/mL. Cada número indica condiciones de digestión. Volumen de sembrado de péptidos 10  $\mu$ L en placa ProteoChrom HPTLC.

#### 5.1.4. Cuantificación de las bandas objetivo

Para evaluar la mejor condición de digestión y obtener el óptimo individual de nuestra primera variable dependiente o variable crítica de ambos diseños de

experimentos se utilizó la imagen del cromatograma HPTLC, cuya fotografía fue obtenida en formato tiff a una resolución de 500 dpi para su análisis. Entre los softwares utilizados para el procesamiento de imagen se encuentran ImageJ, Sorbfil TLC, Just TLC entre otros (Ristivojevic et al. 2020) resultando confiables, eficientes y de fácil manejo para la cuantificación de bandas a partir de una fotografía de placa cromatográfica por HPTLC, sin embargo, por su accesibilidad al ser un software gratuito se seleccionó ImageJ. Previo a utilizar el software, se realizó un pretratamiento de la imagen con el software Adobe Photoshop, cuyo objetivo fue reducir el ruido de la imagen (aplicando filtro desenfoque gaussiano), aumentar el contraste e invertir los colores para cambiar la imagen a escala de grises. Luego, la imagen obtenida en modo estándar estuvo en condiciones de ser analizada para la cuantificación en el software ImageJ. Posteriormente, cada condición de digestión (carril) fue seleccionado y cada banda digerida fue transformada a un pico cromatográfico, en donde a partir de éstos nuevos cromatogramas los valores de área de cada banda fueron obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 4.7 de la sección metodología. La áreas o intensidades dadas por el software se determinan para cada carril como la sumatoria de las bandas objetivos, obteniendo así las intensidades relativas para cada condición de digestión. Los valores se tratan en Microsoft Excel para obtener intensidades relativas porcentuales para las digestiones realizadas con tripsina (Tabla 5-6) y con pepsina (Tabla 5-7), en donde para ambos casos se dejó como 100% de referencia al carril 1 correspondiente al experimento 1 del

diseño y así de forma proporcional se distribuyó para el resto de los valores de acuerdo a los obtenidos en ImageJ.

Tabla 5-6. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad para la digestión de  $\alpha$ -caseína utilizando tripsina.

N° exp	Factores			Respuesta
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Relación E/P	Intensidad de bandas (%)
1	37	3	1/20	100.0
2	37	3	1/200	153.8
3	37	30	1/20	86.0
4	37	30	1/200	130.8
5	65	3	1/20	72.4
6	65	3	1/200	112.5
7	65	30	1/20	60.9
8	65	30	1/200	108.7
9	51	3	1/110	105.2
10	51	30	1/110	101.4
11	37	17	1/110	124.6
12	51	17	1/20	74.2
13	51	17	1/110	111.2
14	51	17	1/200	139.9
15	65	17	1/110	113.6
16	51	17	1/110	111.7

Tabla 5-7. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad para la digestión de  $\alpha$ -caseína utilizando pepsina.

N° exp	Factores			Respuesta
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Relación E/P	Intensidad de bandas (%)
1	30	3	1/13	100.0
2	30	20	1/13	113.2
3	55	3	1/13	89.5
4	55	20	1/13	91.8
5	30	3	1/40	127.3
6	30	20	1/40	114.2
7	55	3	1/40	120.0
8	55	20	1/40	107.5
9	43	3	1/27	104.9
10	43	20	1/27	110.8
11	30	12	1/27	99.7
12	55	12	1/27	95.4
13	43	12	1/13	106.6
14	43	12	1/40	128.4
15	43	12	1/27	125.1
16	43	12	1/27	127.6

### 5.1.5. Diseño experimental de las condiciones de DAM en la obtención de péptidos

Un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 fue realizado para la digestión con las enzimas, y así determinar cuáles de los factores afecta significativamente la variable intensidad. En la Figura 5-10a, para la digestión con tripsina se puede observar que factores modifican de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) la respuesta en intensidad de los picos cromatográficos. De acuerdo con los resultados observados, la proporción de E/P afecto los rendimientos ( $p = 0.001$ ), al igual que la temperatura de digestión ( $p = 0.002$ ), siendo el tiempo de digestión ( $p = 0.06$ ) el factor que no afecto significativamente el proceso. Las condiciones óptimas entregadas por el modelo para la digestión con tripsina consideran tiempo de digestión 10 minutos, temperatura de digestión 37°C y relación E/P de 1/200, cuyo gráfico de superficie de respuesta se muestra en la Figura 5-11a.

En cambio, para el diseño de experimento realizado con pepsina, se puede observar en la Figura 5-10b los factores que afectaron de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) la variable intensidad, siendo en este caso la proporción E/P ( $p = 0.01$ ). El tiempo ( $p = 0.88$ ) y la temperatura de digestión ( $p = 0.12$ ) fueron factores que no afectaron significativamente el proceso.

Las condiciones óptimas entregadas por el modelo para la digestión con pepsina consideran tiempo de digestión 4 minutos, temperatura de digestión 41°C y relación E/P de 1/40, cuyo gráfico de superficie de respuesta se muestra en la Figura 5-11b.

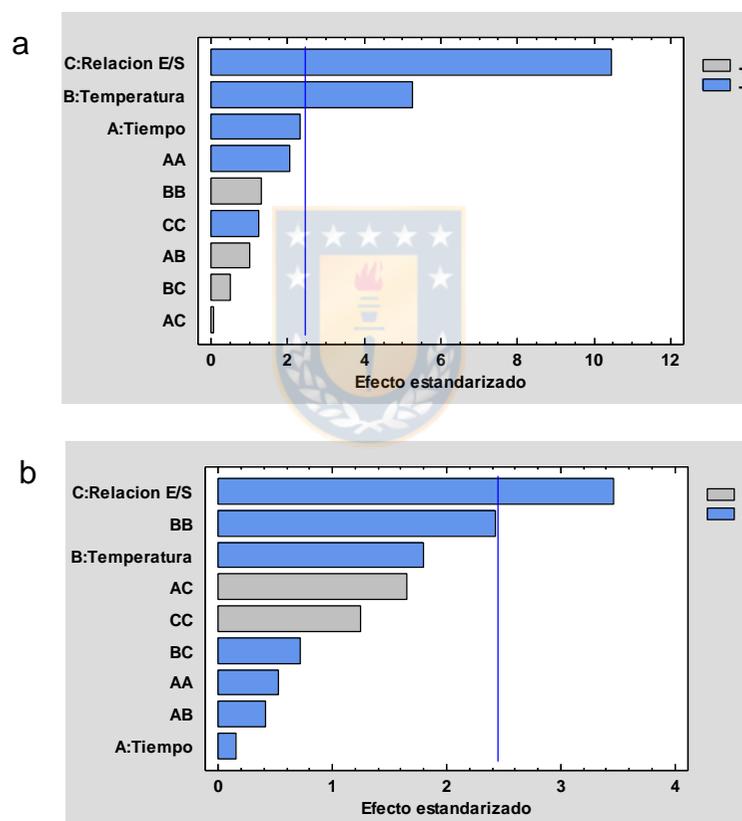


Figura 5-10. Gráfico de Pareto estandarizado que muestra los factores más influyentes para la intensidad de bandas obtenidas mediante (a) digestión con tripsina y (b) digestión con pepsina.

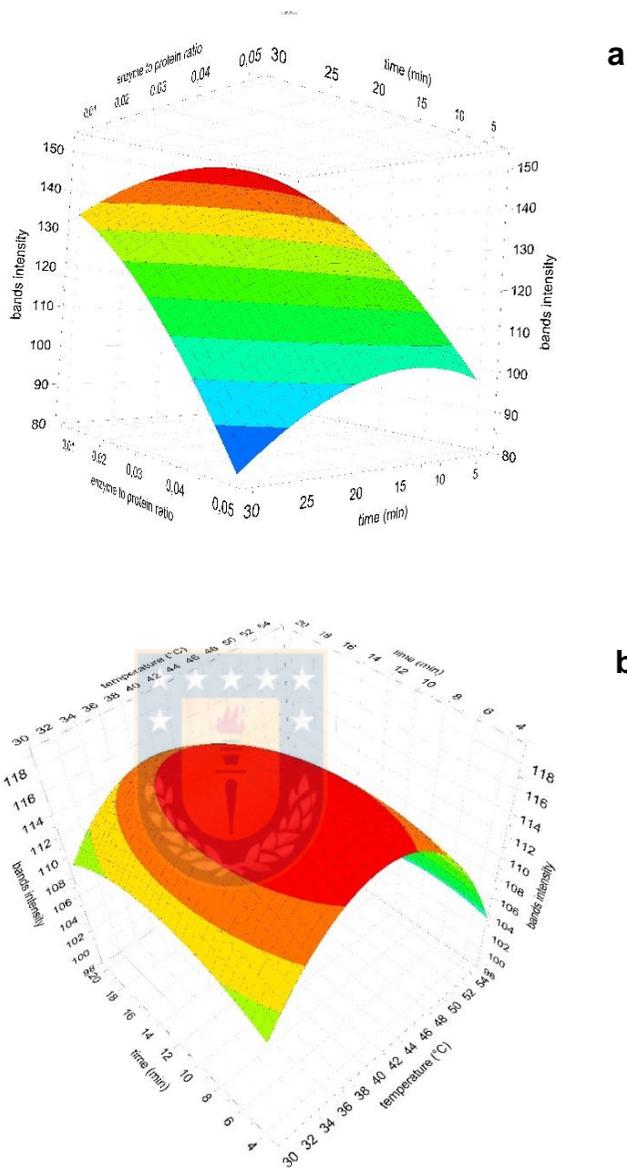


Figura 5-11. Gráficos de superficie de respuesta para la digestión enzimática realizada con tripsina (a) y pepsina (b) asistidas por microondas.

A partir de los experimentos realizados, se puede concluir que la DAM es una técnica eficiente para mejorar la velocidad de digestión de proteínas, en comparación a los métodos convencionales que pueden abarcar varias horas. Esta técnica reduce el tiempo a tan solo unos minutos, tal y como se ha reportado en los estudios de (Pramanik et al. 2002) y (Chen et al. 2014), en donde la alta eficiencia del método ha sido demostrada. En un estudio reportado por (Izquierdo et al. 2008), donde analizan un concentrado proteico a partir del suero bovino, también utilizan la técnica de DAM acotando el proceso de digestión a 5 minutos, donde además reducen las propiedades inmunoreactivas del suero comercial, y en el estudio reportado por (Elizabeth et al. 2017) analizan hidrolizados de proteínas de trucha arcoíris utilizando también ambos métodos, resultando la digestión por microondas la más eficiente.

Como se observa en el presente estudio y en los mencionados anteriormente, es fundamental optimizar las condiciones para el proceso de digestión por microondas, en donde las características individuales de los hidrolizados dependerán principalmente del tipo de enzima utilizada, pH, temperatura y tiempo de hidrólisis, cuyos factores determinan el tipo de corte de la proteína, obteniendo diferentes secuencias de aminoácidos con posibles características potenciales.

## 5.2. Detección de péptidos bioactivos mediante HPTLC/Bioensayo

El uso de la técnica por HPTLC permitió realizar los ensayos de forma simultánea logrando analizar una cantidad de muestras en un corto periodo de tiempo. Además, acoplado esta técnica a bioensayo, nos permite identificar los compuestos de manera in situ con actividad biológica (Galarce et al. 2019; Galarce et al. 2019). En este trabajo, utilizando esta metodología se aplicó para identificar diferentes actividades funcionales de los péptidos generados mediante DAM.



### 5.2.1. Péptidos inhibidores de acetilcolinesterasa

El método descrito por Marston el cual fue modificado en la sección métodos, se optimizó para este tipo de muestras de proteínas y así mejorar la detección de inhibidores de AChE. Después de algunos ensayos en donde se tendía a observar cierta inhibición, pero con poco éxito, se determinó realizar algunas modificaciones: La técnica empleada en este caso fue atomizar con las soluciones de enzima, sustrato y Fast blue en las placas, reduciendo la concentración de enzima en un 50%, además de realizar algunos cambios de tiempo y temperatura de secado de las placas, a 80°C por 10 minutos en todas las etapas. Las muestras analizadas fueron solo las de mayor concentración,

tanto las realizadas con pepsina como con tripsina, para reducir gastos de enzima y observar si dichos cambios fueron óptimos. Para el ensayo realizado con las muestras seleccionadas, se sembró en placa 22  $\mu\text{L}$  de los digeridos con tripsina y 15  $\mu\text{L}$  de los digeridos con pepsina. El proceso de secado de las placas post desarrollo fue optimizado debido a que luego de la atomización con el agente derivatizante era posible observar zonas de inhibición pero que rápidamente desaparecían de la placa, posiblemente por la temperatura de secado utilizada previamente ( $95^{\circ}\text{C}$ ) la cual no era suficiente para evaporar por completo la fase móvil, quedando de esta forma residuos en la placa, lo que pudo interferir en la inhibición de la enzima o también en la degradación de la misma, por tanto, es importante eliminar completamente los solventes residuales (Galarce et al. 2019). Es por esto, que la temperatura de secado post desarrollo de  $95^{\circ}\text{C}$  fue modificada a temperaturas de  $110$  y  $140^{\circ}\text{C}$ . Además, como se observa en la Figura 5-12, con este cambio se logró obtener una mayor fluorescencia de los péptidos y con ello una posible respuesta mejorada del ensayo. Los resultados mostraron que los péptidos digeridos con pepsina tendieron a decolorar la placa, pero desaparecieron al cabo de unos segundos, indicando que probablemente existió inhibición, pero las muestras no eran lo suficientemente potentes en relación a la capacidad inhibitoria que pudiesen presentar, por lo que concentrando las muestras se podría exhibir una mayor y más prolongada actividad. Por otro lado, péptidos digeridos con tripsina si mostraron actividad biológica sobre acetilcolinesterasa (Figura 5-13).

observándose con poca claridad tanto a 366 nm como a 254 nm probablemente por la baja sensibilidad del HPTLC y por las muestras que poseen una baja concentración, sin embargo, a pesar de esto se obtuvo decoloración sobre el fondo púrpura indicativas de inhibición sobre AChE, por lo que someter la placa a una mayor temperatura de secado permitió observar péptidos con bioactividad.



Figura 5-12. Muestras digeridas con pepsina y tripsina analizadas en el bioensayo de AChE. Se observa en (A), (B) y (C) péptidos digeridos del 1 al 9 del diseño realizado con pepsina y (D) muestras 4,6 y 8 del diseño realizado con tripsina. Fotodocumentadas a 366 nm,

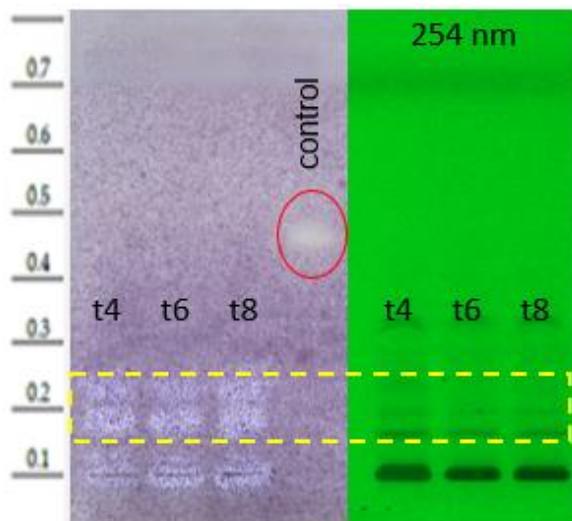


Figura 5-13. HPTLC-Bioensayo de AChE. Muestra zonas bioactivas en t4, t6 y t8 correspondiente a péptidos digeridos del diseño de experimento con tripsina. Fotodocumentada bajo luz blanca y a 254 nm. Volumen de sembrado de control positivo donepezilo 3  $\mu$ L y péptidos digeridos 22  $\mu$ L.

### 5.2.2. Péptidos inhibidores de $\alpha$ -glucosidasa

Los ensayos de bioactividad sobre  $\alpha$ -glucosidasa, se realizaron con ambos diseños de experimentos (muestras digeridas con tripsina y pepsina), encontrando diferencias en cada uno. Los resultados indicaron que los péptidos procedentes de la caseína de la leche digeridas con pepsina a 1.5 mg/mL en microondas presentaron actividad biológica sobre  $\alpha$ -glucosidasa. De los 16

experimentos del diseño, todos presentaron efecto inhibitorio sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 5-14), observándose bandas con un  $R_f=0.43$  en donde las placas (c) y (d) presentaron zonas decoloradas más intensas que el resto. La Figura 5-15 corresponde a la Figura 5-14a, sin embargo, en la Figura 5-15 se observan 2 péptidos bioactivos con bastante claridad, cuya imagen fue fotografiada al instante, pero al transcurrir unos minutos la claridad en la división de bandas se perdió, quedando solo la decoloración completa. No hay mayores diferencias cualitativas ni de cantidad de bandas bioactivas en cada uno de los ensayos. En cuanto a las muestras, inicialmente se sembraron 10  $\mu\text{L}$  obteniendo resultados poco intensos, por lo mismo, la cantidad utilizada de sembrado fue de 15  $\mu\text{L}$ , obteniéndose resultados visiblemente satisfactorios, sin embargo, las decoloraciones en las placas mantuvieron la tenuidad, pero a diferencia del ensayo con AChE para muestras digeridas con pepsina, éstas no desaparecieron al transcurrir el tiempo. Por otro lado, los bioensayos realizados con las muestras digeridas con tripsina a 0.01 mg/mL no presentaron actividad biológica sobre  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 5-16).

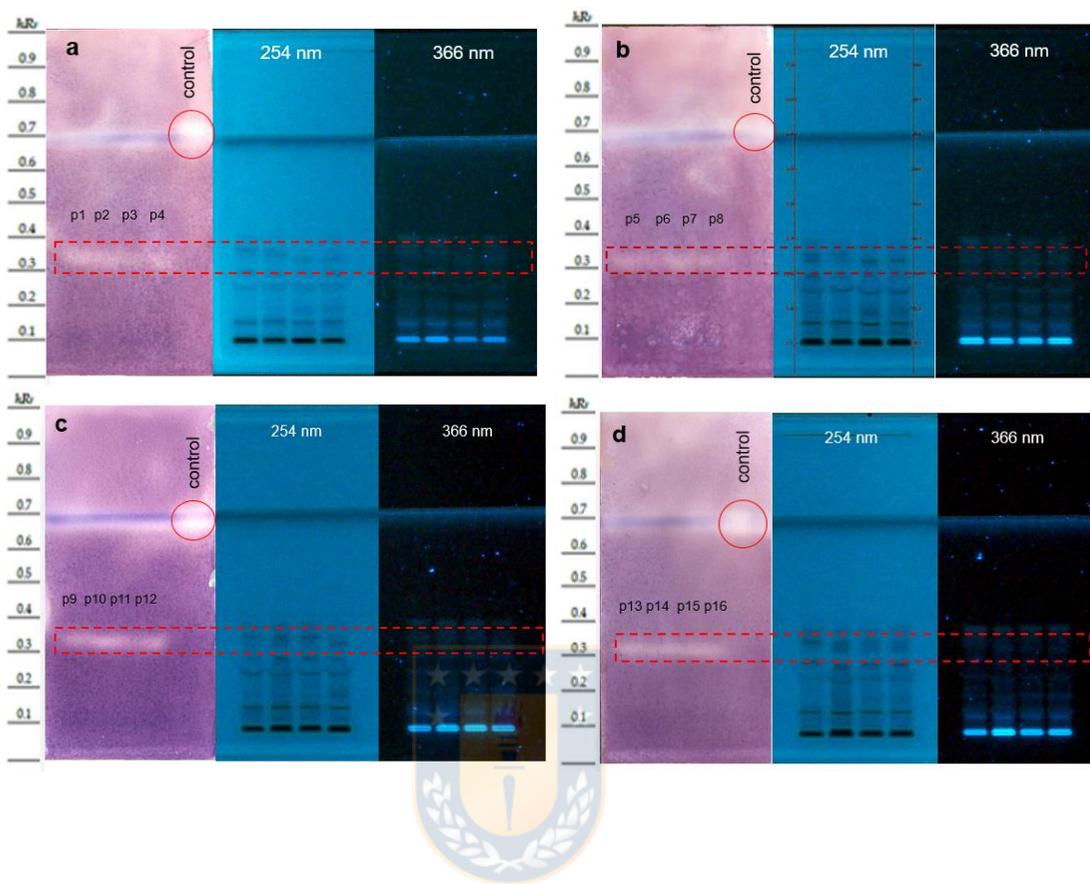


Figura 5-14. HPTLC-Bioensayos para  $\alpha$ -glucosidasa. Placas a, b, c y d corresponden a péptidos digeridos con pepsina del diseño de experimentos (p1 al p16). Se observan zonas bioactivas en cada experimento. Volumen de sembrado de control positivo ácido cafeico 3  $\mu$ L y péptidos digeridos 15  $\mu$ L. Fotodocumentadas bajo luz blanca, 254 y 366 nm.

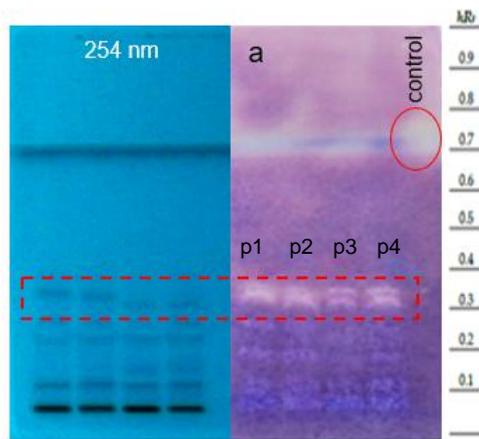


Figura 5-15. HPTLC-Bioensayo de péptidos digeridos con pepsina del diseño de experimentos (p1, p2, p3 y p4). Se observan zonas bioactivas para  $\alpha$ -glucosidasa con 2 péptidos claramente identificados en cada experimento.

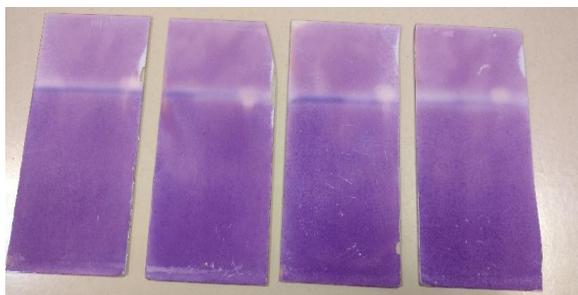


Figura 5-16. HPTLC- Bioensayos de péptidos digeridos con tripsina del diseño de experimentos. No se identifican zonas bioactivas para  $\alpha$ -glucosidasa.

### 5.2.3. Capacidad antioxidante de los péptidos por ensayo DPPH

El ensayo se realizó para las muestras digeridas con pepsina y tripsina, cuyos resultados mostraron capacidad antioxidante de los péptidos, identificándose como zonas decoloradas sobre el fondo púrpura, las cuales se intensificaron con el paso de las horas. Como se observa en la Figura 5-17, las digestiones del diseño de experimentos realizados con tripsina (A) presentan zonas decoloradas mucho menos intensas en comparación con los de pepsina (B), debido probablemente a la concentración de las muestras, en donde solo algunas muestras del diseño en (A) presentaron actividad antioxidante (las muestras más concentradas) identificándose como máximo 3 péptidos bioactivos en cada una de ellas. En cambio, en el diseño de experimentos realizado a partir de pepsina (B) se logró observar actividad antioxidante de manera bastante intensa en todas las muestras.

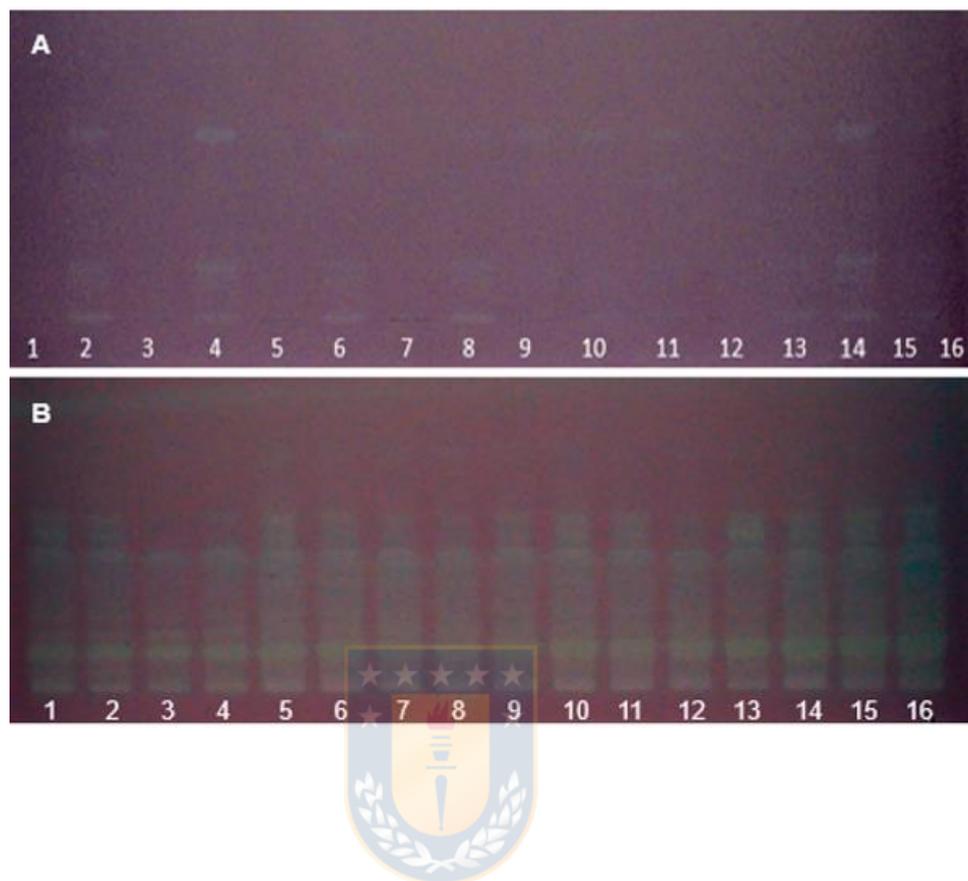


Figura 5-17. Cromatogramas HPTLC muestran zonas bioactivas para ensayo DPPH. (A) corresponde a las muestras del diseño realizadas con tripsina 0.01 mg/mL, en donde (1) corresponde a muestra 1 del diseño (t1) y así correlativamente; y (B) muestras del diseño realizadas con pepsina 1.5 mg/mL, en donde (1) corresponde a muestra 1 del diseño (p1) y así correlativamente. Ensayos fotodocumentados con luz blanca.

#### 5.2.4. Actividad antimicrobiana de los péptidos por bioautografía *Bacillus subtilis*

Los péptidos digeridos con ambas enzimas se probaron también para este ensayo y los resultados indicaron que los péptidos digeridos con pepsina y tripsina presentaron actividad antibacteriana al observarse decoloración sobre la placa HPTLC. En el caso de las digestiones realizadas con tripsina, se analizaron solo los péptidos más concentrados del diseño de experimentos, más las digestiones realizadas con tripsina modificada y alquilación. Para los péptidos más concentrados del diseño, se observa una banda con  $R_f=0.31$  para cada una de las muestras como se observa en la Figura 5-18, sin embargo, en 5.18a se observan 2 péptidos bioactivos para el experimento 4 del diseño (t4). La Figura 5-18b corresponde al experimento 11 del diseño (t11), en donde b 4, 5, 6 y 7 están digeridas con tripsina modificada más reducción y alquilación con 12  $\mu\text{L}$  de DTT y 24  $\mu\text{L}$  de IAM, observándose zonas decoloradas más intensas que para el resto de las muestras. Para los experimentos b8 y 9 solo los volúmenes de reactivos para reducción y alquilación fueron ajustados de acuerdo al volumen del vaso de microondas (144  $\mu\text{L}$  de DTT y 288  $\mu\text{L}$  de IAM), observándose un péptido bioactivo más que está levemente retenido cerca de la línea base de sembrado. La bioautografía se repitió para las muestras anteriormente mencionadas (Figura 5-19), en donde la Figura 5-19d corresponde a muestras digeridas con tripsina modificada más alquilación, observándose levemente otra

zona de inhibición con un  $R_f=0.7$ , no detectada en el ensayo anterior, sin embargo, es una banda muy tenue que requiere repetir ensayos o modificación del proceso para obtener una respuesta más convincente. Se debió incrementar el volumen de sembrado para cada experimento en todas las placas a 20  $\mu\text{L}$ , puesto que con el volumen inicial de sembrado (12  $\mu\text{L}$ ) no se lograron distinguir zonas con inhibición. Finalmente, la dificultad principal fue el hecho de que las inhibiciones observadas fueron muy tenues, desapareciendo al transcurrir los minutos, por lo que utilizar un concentrador de muestras sería una solución probable para que la inhibición resultante sea intensa y permita requerir menor volumen de sembrado en HPTLC.



En relación a las muestras digeridas con pepsina, se probaron todas las realizadas a partir del diseño (Figura 5-20), resultando en inhibiciones bastante intensas para cada una de ellas, las cuales presentan una decoloración destacada con un  $R_f=0.53$ , sin embargo, para todas las muestras sembradas (3 muestras por cada placa), se observaron péptidos con inhibición en prácticamente toda la placa.

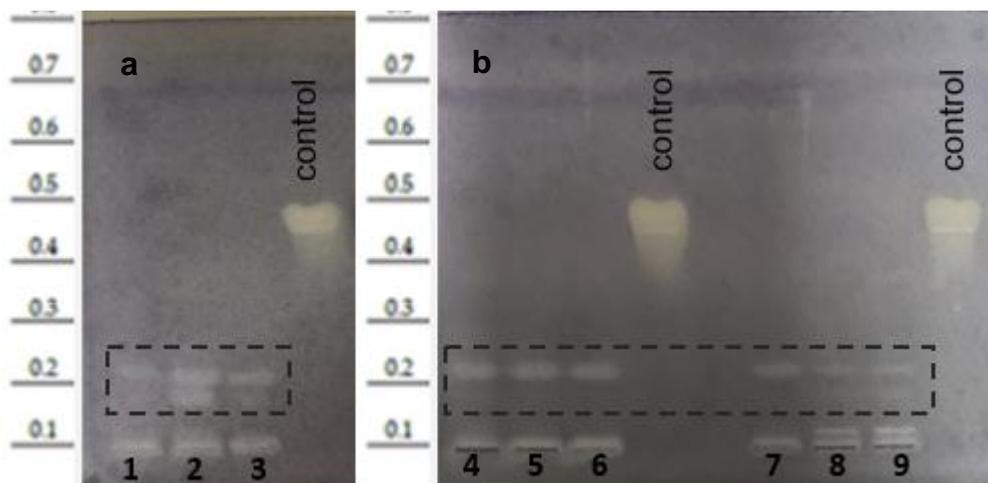


Figura 5-18. HPTLC-Bioautografía para *Bacillus subtilis* de muestras del diseño digeridas con tripsina. En a1 se encuentra la muestra 2 del diseño (t2), a2= muestra 4 (t4), a3= muestra 11 (t11), b4,5, 6 y 7= muestra 11 (t11) digeridas con tripsina modificada más reducción y alquilación (12  $\mu$ L DTT+24  $\mu$ L IAM) y b8 y b9= muestra 11 (t11) se ajustó volúmenes de reactivo para reducción y alquilación (144  $\mu$ L DTT + 288  $\mu$ L IAM). Volumen de sembrado de control positivo oxitetraciclina 4  $\mu$ L y péptidos digeridos 20  $\mu$ L.

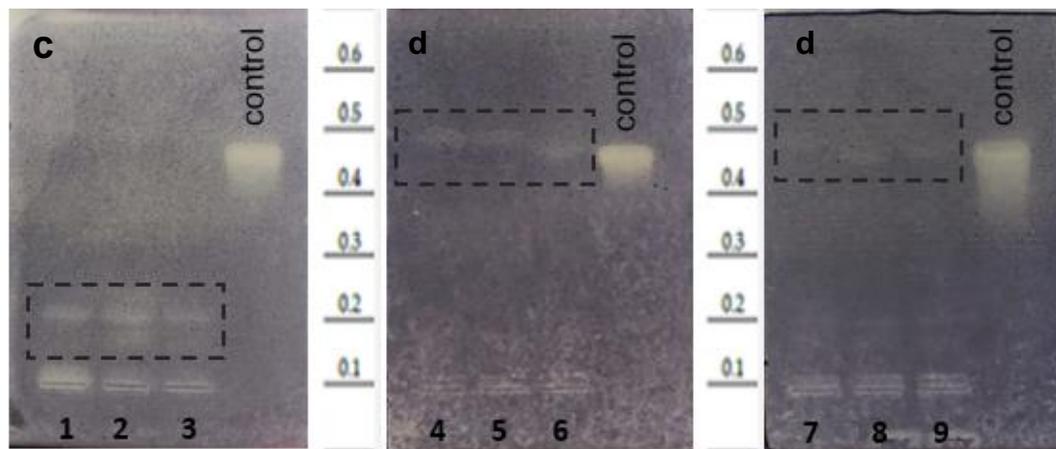


Figura 5-19. HPTLC-Bioautografía para *Bacillus subtilis* de muestras del diseño digeridas con tripsina. En (c) 1,2 y 3 se observan las muestras t2, t4 y t11 del diseño con tripsina respectivamente y (d) corresponde a muestra t11 digeridas con tripsina modificada más reducción y alquilación logrando observar tenues zonas de inhibición en la parte superior de la placa, en la cual (d) 4 ,5 y 7 corresponden a muestras digeridas con 12  $\mu\text{L}$  DTT y 24  $\mu\text{L}$  IAM y (d) 6,8 y 9 muestras digeridas con 144  $\mu\text{L}$  DTT y 288  $\mu\text{L}$  IAM. Volumen de sembrado de control positivo oxitetraciclina 4  $\mu\text{L}$  y péptidos digeridos 22  $\mu\text{L}$ .

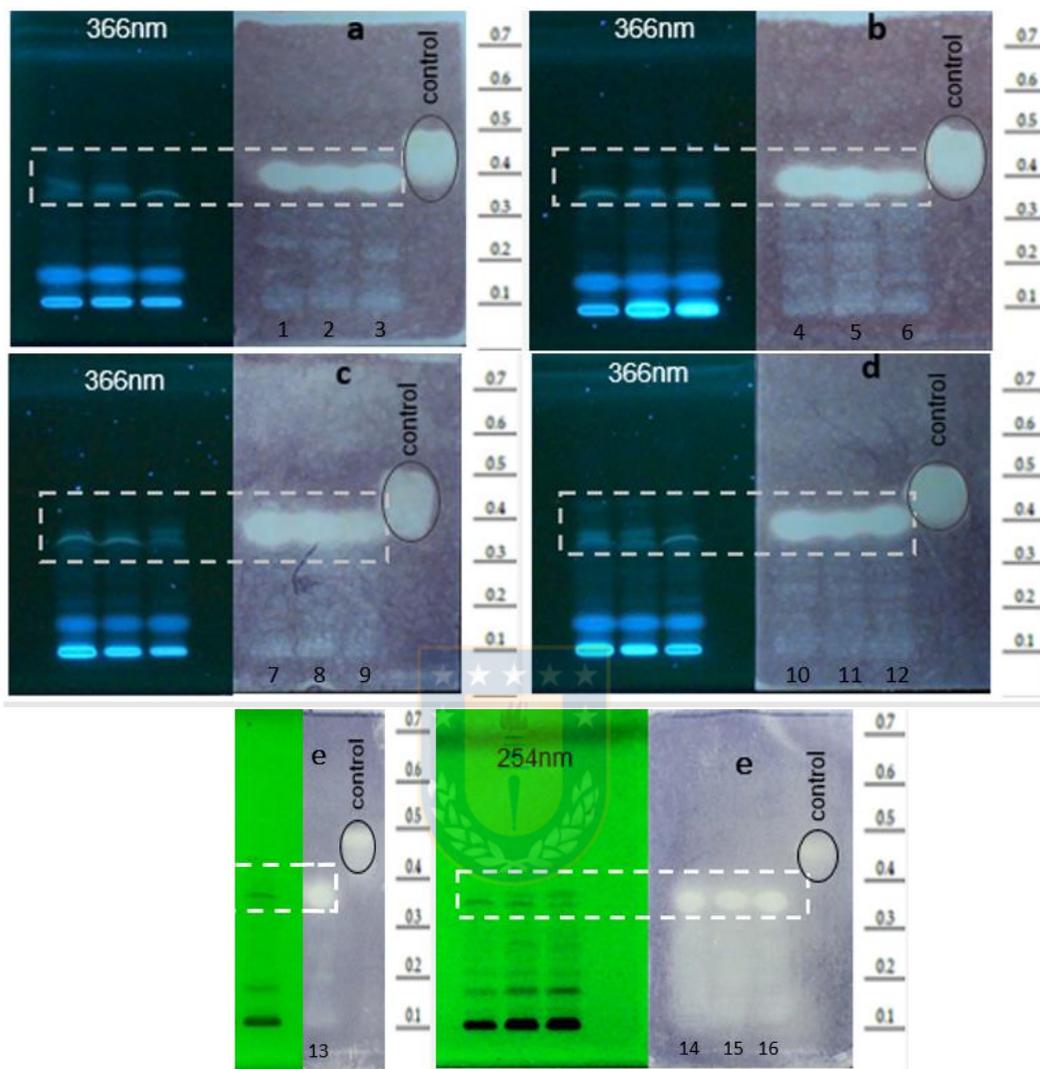


Figura 5-20. HPTLC-Bioautografía para *Bacillus subtilis* de muestras del diseño digeridas con pepsina. Placas a, b, c, d y e corresponden a péptidos digeridos con pepsina del diseño de experimentos (p1 al p16). Se observan zonas bioactivas en cada experimento. Volumen de sembrado del control positivo oxitetraciclina 4  $\mu\text{L}$  y péptidos digeridos 12  $\mu\text{L}$ .

### 5.3. Cuantificación de los péptidos bioactivos

La segunda variable dependiente o variable crítica de nuestro diseño de experimentos fue la obtención de las áreas o intensidades de los péptidos bioactivos obtenidos tanto para los ensayos realizados con tripsina como con pepsina, para lo cual se procede de la misma forma descrita en el punto 5.1.4, cuyas áreas o intensidades dadas por el software se determinaron solo para las bandas que presentaron bioactividad.

Para evaluar el diseño de experimentos realizado con tripsina se consideraron los ensayos realizados con todas las muestras, estos fueron el ensayo de capacidad antioxidante DPPH y bioensayo de  $\alpha$ -glucosidasa, sin embargo, éste último no presentó ningún péptido bioactivo, por lo tanto, las intensidades relativas para evaluar la bioactividad de los péptidos obtenidos con tripsina se realizó solo con el bioensayo de capacidad antioxidante DPPH (Tabla 5-8).

Así mismo, para evaluar el diseño de experimentos realizado con pepsina también se consideraron los ensayos realizados con todas las muestras, estos fueron el ensayo de capacidad antioxidante DPPH, bioensayo de  $\alpha$ -glucosidasa y bioautografía de actividad antimicrobiana, obteniéndose en los tres ensayos péptidos bioactivos. Las intensidades relativas se obtuvieron para evaluar la

bioactividad de los péptidos obtenidos con pepsina, cuyos valores se trataron en Microsoft Excel para obtener intensidades relativas porcentuales (Tabla 5-9).

Tabla 5-8. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad de péptidos bioactivos (ensayo DPPH) para la digestión de  $\alpha$ -caseína utilizando tripsina.

N° exp	Factores			Respuesta
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Relación E/P	Intensidad de bandas (%) Ensayo DPPH
1	37	3	1/20	0
2	37	3	1/200	100.0
3	37	30	1/20	0
4	37	30	1/200	112.1
5	65	3	1/20	0
6	65	3	1/200	45.5
7	65	30	1/20	0
8	65	30	1/200	49.0
9	51	3	1/110	24.0
10	51	30	1/110	24.6
11	37	17	1/110	16.9
12	51	17	1/20	0
13	51	17	1/110	0
14	51	17	1/200	119.5
15	65	17	1/110	0
16	51	17	1/110	0

Tabla 5-9. Diseño central compuesto con su correspondiente ronda de experimentos, variables designadas y respuesta en intensidad de péptidos bioactivos (bioensayo  $\alpha$ -glucosidasa, ensayo DPPH y bioautografía *Bacillus subtilis*) para la digestión de  $\alpha$ -caseína utilizando pepsina.

N° exp	Factores			Respuesta		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Relación E/P	Intensidad de péptidos bioactivos (%)		
				Bioensayo $\alpha$ -glucosidasa	Ensayo DPPH	Bioautografía <i>B.subtilis</i>
1	30	3	1/13	100.0	100.0	100.0
2	30	20	1/13	97.7	99.2	106.9
3	55	3	1/13	57.5	111.0	103.3
4	55	20	1/13	72.1	127.6	139.1
5	30	3	1/40	168.3	132.4	150.4
6	30	20	1/40	123.2	141.2	136.9
7	55	3	1/40	116.6	143.8	145.4
8	55	20	1/40	100.1	123.9	139.1
9	43	3	1/27	93.7	131.3	114.0
10	43	20	1/27	107.6	127.5	131.0
11	30	12	1/27	90.9	118.7	123.5
12	55	12	1/27	106.7	117.5	111.2
13	43	12	1/13	94.6	140.9	139.4
14	43	12	1/40	183.3	133.7	102.8
15	43	12	1/27	124.0	126.9	88.3
16	43	12	1/27	127.8	129.9	82.0

#### 5.4. Optimización de las condiciones de DAM en la obtención de péptidos bioactivos

Un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 fue realizado para la digestión con las enzimas, y así determinar cuáles de los factores afecta significativamente la variable intensidad de los péptidos bioactivos obtenidos. En la Figura 5-21, para la digestión con tripsina se puede observar que factores modifican de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) la respuesta en intensidad de los picos cromatográficos a partir del ensayo de capacidad antioxidante DPPH. De acuerdo con los resultados observados, el factor temperatura ( $p = 0.04$ ), la proporción de E/P ( $p = 0.0002$ ), la interacción entre las variables temperatura y proporción E/P ( $p = 0.04$ ) y la proporción E/P (coeficiente cuadrático) ( $p = 0.01$ ), afectaron significativamente la respuesta. Las condiciones óptimas entregadas por el modelo para la obtención de péptidos bioactivos digeridos con tripsina mediante el ensayo de capacidad antioxidante consideran tiempo de digestión 30 minutos, temperatura de digestión 37°C y relación E/P de 1/200, cuyo gráfico de superficie de respuesta se muestra en la Figura 5-23.

Por otro lado, los factores que afectan la variable intensidad de los péptidos obtenidos a partir de la digestión con pepsina, se puede observar en la Figura 5-22. A partir de los péptidos obtenidos mediante bioensayo de  $\alpha$ -glucosidasa

(Figura 5-22a), se puede observar que la intensidad de los péptidos se ve afectada significativamente por la proporción E/P ( $p= 0.004$ ), mientras que los otros factores e interacciones no fueron estadísticamente significativos. El óptimo de respuesta entregado por el modelo arrojó condiciones óptimas de tiempo de digestión 5 minutos, temperatura de digestión 35°C y relación E/P de 1/40, cuyo gráfico de superficie de respuesta se muestra en la Figura 5-24a.

Otro bioensayo fue evaluado para obtener la mejor condición de obtención de péptidos bioactivos a partir de la variable intensidad, pero esta vez mediante el ensayo de capacidad antioxidante DPPH, en donde para la Figura 5-22b se puede observar que la intensidad de los péptidos se ve afectada significativamente por la proporción E/P ( $p=0.04$ ), mientras que los demás factores e interacciones no fueron estadísticamente significativos. El óptimo de respuesta entregado por el modelo arrojó condiciones óptimas de tiempo de digestión 3 minutos, temperatura 42°C y relación E/P de 1/40, cuyo gráfico de superficie de respuesta se muestra en la Figura 5-24b.

Finalmente, el último ensayo evaluado fue la bioautografía *Bacillus subtilis*, en donde la Figura 5-22c muestra que la variable intensidad de los péptidos obtenidos no fueron afectados significativamente. El óptimo de respuesta entregado por el modelo consideran un tiempo de digestión 3 minutos, temperatura 30°C y relación E/P de 1/40, cuyo gráfico de superficie de respuesta

se muestra en la Figura 5-24c. Para este caso el gráfico indica que los rangos estudiados no lograron cumplir satisfactoriamente la variable respuesta estudiada.

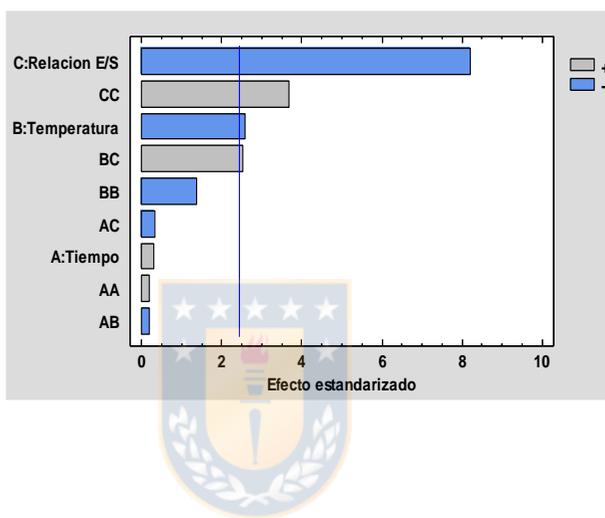


Figura 5-21. Gráfico de Pareto estandarizado que muestra los factores más influyentes para la intensidad de los péptidos bioactivos obtenidos mediante digestión con tripsina a partir del ensayo de capacidad antioxidante DPPH.

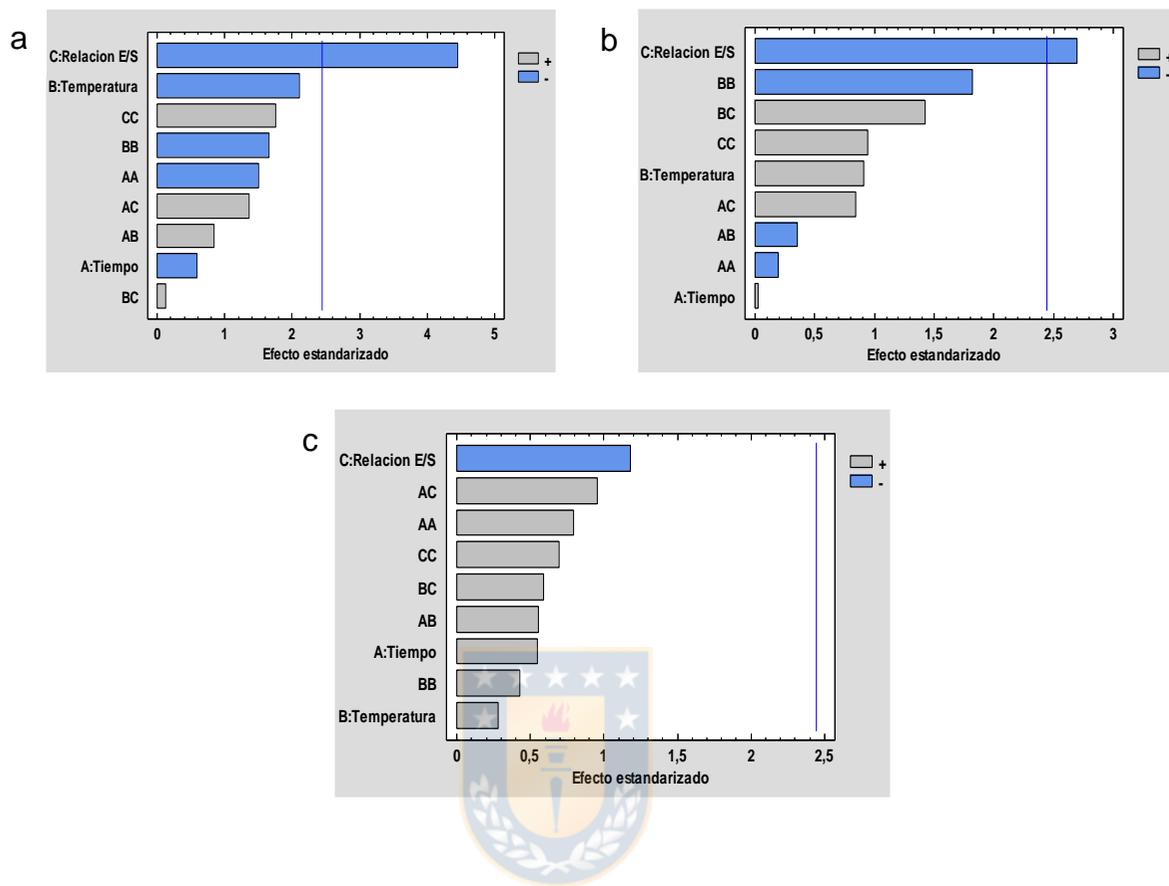


Figura 5-22. Gráficos de Pareto estandarizados que muestran los factores más influyentes para la intensidad de los péptidos bioactivos obtenidos mediante digestión con pepsina. (a) bioensayo  $\alpha$ -glucosidasa, (b) ensayo de capacidad antioxidante DPPH y (c) bioautografía *Bacillus subtilis*.

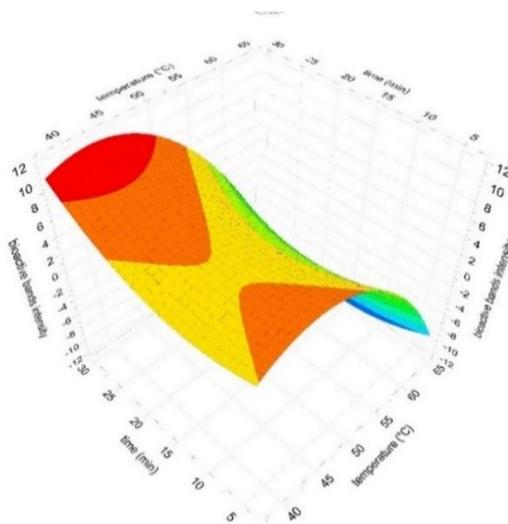


Figura 5-23. Gráfico de superficie de respuesta para los péptidos bioactivos digeridos con tripsina, obtenidos a partir de ensayo de capacidad antioxidante DPPH.

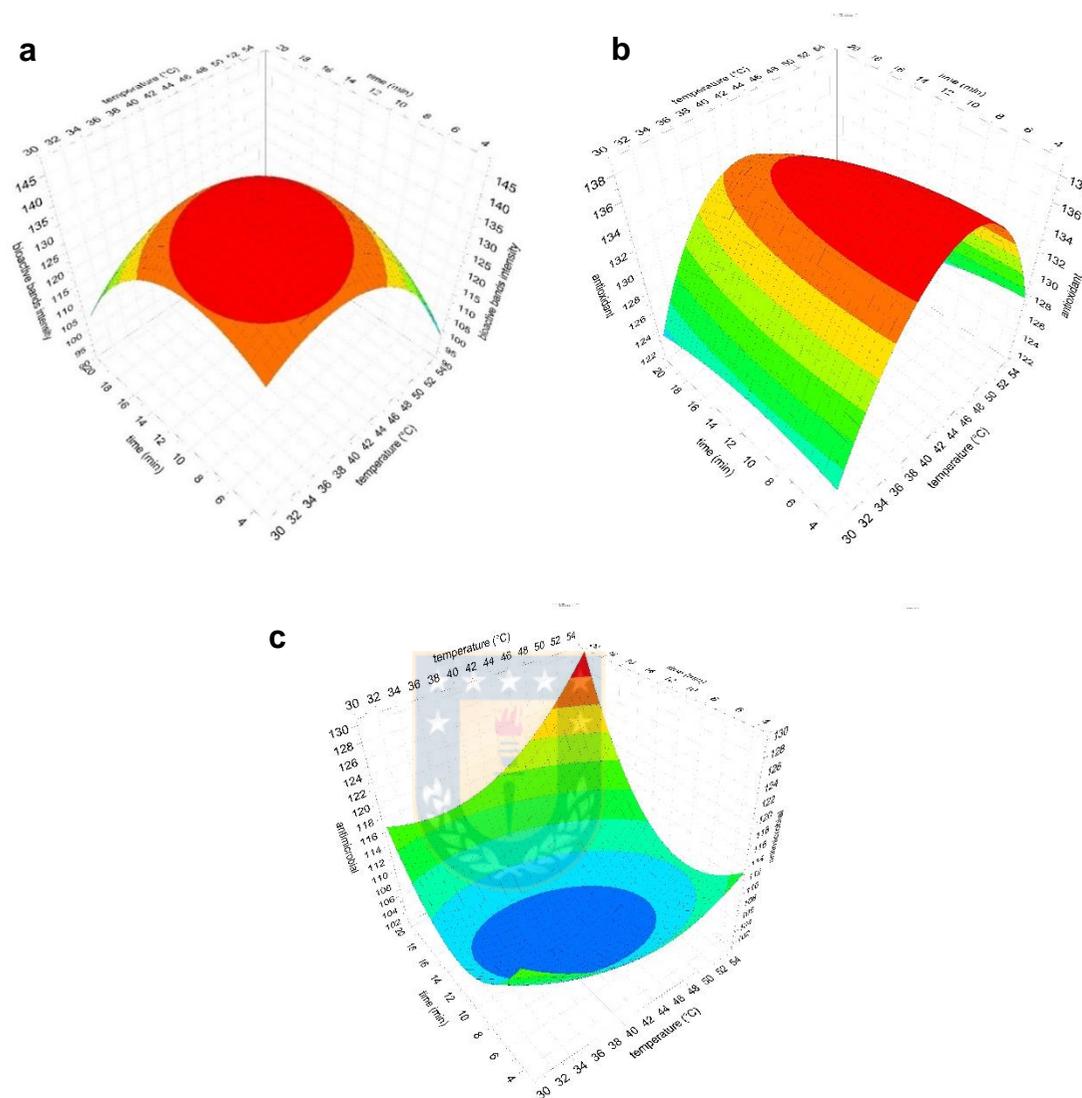


Figura 5-24. Gráficos de superficie de respuesta para los péptidos bioactivos digeridos con pepsina. (a) bioensayo  $\alpha$ -glucosidasa, (b) ensayo de capacidad antioxidante DPPH y (c) bioautografía *Bacillus subtilis*.

Un estudio describe la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva y antidiabética a partir de una proteína de *Crylodes sigillatus*, utilizando DAM por 10 minutos (Hall y Liceaga 2020). A diferencia de lo reportado por (Srinivas y Prakash 2010) quienes evaluaron actividad inhibitoria de la ECA, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de péptidos obtenidos a partir de  $\alpha$ -caseína, sin embargo, los digeridos se obtuvieron a partir de digestión convencional, utilizando 2 horas como mínimo en el proceso de digestión. Hasta donde sabemos, no se han reportado estudios anteriores en donde se obtengan péptidos con actividad inhibidora de la AChE,  $\alpha$ -glucosidasa y actividad antimicrobiana a partir de digestión enzimática asistida por microondas.



## 6. CONCLUSIONES

En la actualidad la incidencia de las enfermedades crónicas no transmisibles y las enfermedades infecciosas ha ido en un creciente aumento sobre la población general, por lo que estudiar las propiedades de alimentos funcionales como la leche es de gran importancia para prevenir estas enfermedades o complementar los tratamientos ya existentes. Los péptidos bioactivos resultan ser buenos candidatos a los inhibidores sintéticos que pueden asociarse a efectos secundarios indeseables y limitaciones, por lo que establecer métodos adecuados para generar estos compuestos es una gran alternativa.

Dentro de los objetivos contemplados en el estudio, se logró generar péptidos con bioactividad a partir de la  $\alpha$ -caseína mediante hidrólisis enzimática asistida por microondas, evaluando los parámetros que influyen en la hidrólisis y estableciendo los rangos óptimos para cada uno de ellos, permitiendo con esto obtener resultados de forma exitosa, en donde el tiempo de digestión, la temperatura de digestión y la relación E/P fueron los factores fundamentales a evaluar para realizar este procedimiento. A través de herramientas quimiométricas mediante un diseño central compuesto se optimizó la digestión de  $\alpha$ -caseína al evaluar la mejor condición de digestión por microondas que genera la mayor cantidad de péptidos.

Respecto a los péptidos con bioactividad, a partir de los bioensayos en HPTLC se determinó que para ambos diseños de experimentos se obtuvieron péptidos bioactivos. Para el bioensayo de inhibición de AChE, las muestras digeridas con tripsina presentaron péptidos bioactivos (solo evaluados en tres muestras del diseño) y las muestras digeridas con pepsina no presentaron inhibición. En cuanto al bioensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, las muestras digeridas con tripsina no presentaron péptidos con bioactividad, en cambio, las muestras digeridas con pepsina resultaron con péptidos bioactivos en cada una de las muestras del diseño, obteniéndose 2 péptidos con el mismo  $R_f$  en cada una de ellas. Para el ensayo de capacidad antioxidante DPPH, en ambos diseños de experimentos se encontraron péptidos bioactivos, sin embargo, para las muestras digeridas con tripsina se detectaron solo en algunas muestras del diseño (las más concentradas) obteniéndose 2 a 3 péptidos, en cambio, para los digeridos con pepsina, todos los péptidos resultantes presentaron inhibición. Finalmente, para el ensayo antimicrobiano con *Bacillus subtilis*, las muestras digeridas con tripsina resultaron en la obtención de 2 a 3 péptidos con bioactividad (evaluadas solo muestras más concentradas) y las muestras digeridas con pepsina resultaron en péptidos bioactivos en prácticamente toda la placa de cada ensayo, obteniéndose una decoloración muy prominente en la zona superior de la placa. Esta zona además se establece como una zona estratégica, puesto que en el bioensayo de inhibición realizado para  $\alpha$ -glucosidasa resultaron en los mismos péptidos, por lo que los péptidos bioactivos

generados en esa zona a partir de pepsina presentaron más de una actividad biológica. Lo anteriormente descrito indica que la técnica simultánea de HPTLC/bioensayo resultó efectiva para la detección de péptidos bioactivos. En este contexto, los péptidos inhibidores de la AChE,  $\alpha$ -glucosidasa, péptidos antioxidantes y antimicrobianos detectados en este estudio pueden ser adecuados para su aplicación en productos alimenticios. Sin embargo, después de su detección *in vitro*, los efectos beneficiosos preliminares sobre las enfermedades diana deben considerarse cuidadosamente antes de poder formularse como agentes terapéuticos, mediante investigaciones y estudios *in vivo* que permitan aclarar los modos de acción y seguridad de estos péptidos.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennett, J., Stevens, G., Mathers, C., Bonita, R., Rehm, J., Kruk, M., Riley, L., Dain, K., Kengne, A., Chalkidou, K., Beagley, J., Kishore, S., Chen, W., Saxena, S., Bettcher, D., Grove, J., Beaglehole, R., Ezzati, M., N. C. D. Countdown Collaborators (2018). "NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4." Lancet **392**(10152): 1072-1088.

Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., Fiocco, D. (2013). "Lactobacillus plantarum passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis." Microbiological Research **168**(6): 351-359.

Chen, Z., Li, Y., Lin, S., Wei, M., Du, F., Ruan, G. (2014). "Development of continuous microwave-assisted protein digestion with immobilized enzyme." Biochemical and Biophysical Research Communications **445**(2): 491-496.

Choma, I. y Grzelak, E. (2011). "Bioautography detection in thin-layer chromatography." Journal of Chromatography A **1218**(19): 2684-2691.

Dejaegher, B. (2011). "Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **56**(2): 141-158.

Elizabeth, N., Jones, O., Kim, Y., San Martin, F., Liceaga, A. (2017). "Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products." Fisheries Science **83**(2): 317-331.

Farrell, H., Jimenez, R., Bleck, G., Brown, E., Butler, J., Creamer, L., Hicks, C., Hollar, C., Ng-Kwai, K., Swaisgood, H. (2004). "Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision." Journal of Dairy Science **87**(6): 1641-1674.

Finehout, E., Cantor, J., Lee, K. (2005). "Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin." Proteomics **5**(9): 2319-2321.

Galarce, O., Pavon, J., Henriquez, K., Aranda, M. (2019). "Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in *Annona cherimola* Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry." Phytochemical Analysis **30**(6): 679-686.

Galarce, O., Pavon, J., Henriquez, K., Aranda, M. (2019). "An improved method for a fast screening of alpha-glucosidase inhibitors in cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) applying effect-directed analysis via high-performance thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1608**.

Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. (2004). "Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides." International Journal of Dairy Technology **57**(2-3): 173-188.

Hall, F. y Liceaga, A. (2020). "Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Grylloides sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding." Journal of Functional Foods **64**.

Hartmann, R. y Meisel, H. (2007). "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications." Current Opinion in Biotechnology **18**(2): 163-169.

Hustoft, H., Reubsaet, L., Greibrokk, T., Lundanes, E., Malerod, H. (2011). "Critical assessment of accelerating trypsination methods." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **56**(5): 1069-1078.

Izquierdo, F., Penas, E., Baeza, M., Gomez, R. (2008). "Effects of combined microwave and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins." International Dairy Journal **18**(9): 918-922.

Jamshidi, M. y Morlock, G. (2015). "Bioprofiling of unknown antibiotics in herbal extracts: Development of a streamlined direct bioautography using *Bacillus subtilis* linked to mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1420**: 110-118.

Jesus, F., Alvarez, C., Nolasco, H., Pena, E., Martinez, R., Camarillo., Conway, K., Pohlenz, C. (2017). "Partial characterization of digestive proteases of fat snook (*Centropomus paralellus*)." Hidrobiologica **27**(3): 419-427.

Korhonen, H. (2009). "Milk-derived bioactive peptides: From science to applications." Journal of Functional Foods **1**(2): 177-187.

- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2003). "Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods." Current Pharmaceutical Design **9**(16): 1297-1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality." International Dairy Journal **16**(9): 945-960.
- Kumar, A., Singh, A., Ekavali. (2015). "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." Pharmacological Reports **67**(2): 195-203.
- Lill, J., Ingle, E., Liu, P., Pham, V., Sandoval, W. (2007). "Microwave-assisted proteomics." Mass Spectrometry Reviews **26**(5): 657-671.
- Lopez, C. y Denicola, A (2013). "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays." Analytica Chimica Acta **763**: 1-10.
- Marston, A. (2011). "Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry." Journal of Chromatography A **1218**(19): 2676-2683.
- Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002). "A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants." Phytochemical Analysis **13**(1): 51-54.
- Mattarozzi, M., Milioli, M., Bignardi, C., Elviri, L., Corradini, C., Careri, M. (2014). "Investigation of different sample pre-treatment routes for liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of caseins and ovalbumin in fortified red wine." Food Control **38**: 82-87.
- McCann, K., Shiell, B., Michalski, W., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M. (2006). "Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine alpha(s1)-casein." International Dairy Journal **16**(4): 316-323.
- Mehta, A., Zitzmann, N., Rudd, P., Block, T., Dwek, R. (1998). "alpha-glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents." Febs Letters **430**(1-2): 17-22.
- Meisel, H. (2004). "Multifunctional peptides encrypted in milk proteins." Biofactors **21**(1-4): 55-61.
- Meisel, H. y FitzGerald, R. (2003). "Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects." Current Pharmaceutical Design **9**(16): 1289-1295.

MERCOSUR (2015). "Reporte de Vigilancia e Intervenciones sobre enfermedades no transmisibles en países del MERCOSUR y país asociado-CHILE, Segunda Edición, año 2015. p.5."

Miquel, E., Gomez, J., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., Recio, I. (2006). "Identification of casein phosphopeptides after simulated gastrointestinal digestion by tandem mass spectrometry." European Food Research and Technology **222**(1-2): 48-53.

Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P., Pattnaik, R., Mohapatra, S., Saini, M. (2016). "Milk Derived Antimicrobial Bioactive Peptides: A Review." International Journal of Food Properties **19**(4): 837-846.

Mohanty, D., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. (2016). "Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review." Saudi Journal of Biological Sciences **23**(5): 577-583.

Moller, N., Scholz, K., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). "Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects." European Journal of Nutrition **47**(4): 171-182.

Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S., Yadav, H. (2011). "Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update." Food & Function **2**(1): 18-27.

Patil, P., Mandal, S., Tomar, S., Anand, S. (2015). "Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes." European Journal of Nutrition **54**(6): 863-880.

Pavon, J., Henriquez, K., Aranda, M. (2019). "Mass Spectrometry Determination of Fining-Related Allergen Proteins in Chilean Wines." Food Analytical Methods **12**(4): 827-837.

Petermann, F., et al. (2020). "Desde una mirada global al contexto chileno: ¿Qué factores han repercutido en el desarrollo de obesidad en Chile? (Parte 1). Rev. chil. nutr. vol.47 no.2 Santiago abr. 2020."

Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R., O'Brien, N. (2009). "Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status." International Dairy Journal **19**(11): 643-654.

Pramanik, B., Mirza, U., Ing, Y., Liu, Y., Bartner, P., Weber, P., Bose, M. (2002). "Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: A new approach to protein digestion in minutes." Protein Science **11**(11): 2676-2687.

Reddy, P., Hsu, W., Hu, J., Ho, Y. (2010). "Digestion Completeness of Microwave-Assisted and Conventional Trypsin-Catalyzed Reactions." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **21**(3): 421-424.

Rhee, I., van de Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. (2001). "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining." Journal of Chromatography A **915**(1-2): 217-223.

Ristivojevic, P., Ristivojevic, P., Trifkovic, J., Andric, F., Milojkovic, D. (2020). "Recent trends in image evaluation of HPTLC chromatograms." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.

Rolinski, M., Fox, C., Maidment, I., McShane, R. (2012). "Cholinesterase inhibitors for dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease dementia and cognitive impairment in Parkinson's disease." Cochrane Database of Systematic Reviews(3).

RSA (2019). "Reglamento Sanitario de los Alimentos, DTO. N° 977/96 actualizado a enero 2019. p. 118."

Sah, B., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O. (2018). "Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **58**(5): 726-740.

Sassi, F. (2010). "Obesity and the Economics of Prevention - Fit not Fat, OECD 2010 p.60."

Shimizu, M. y Son, O. (2007). "Food-derived peptides and intestinal functions." Current Pharmaceutical Design **13**(9): 885-895.

Simoes, C., Hmicha, B., Marston, A., Hostettmann, K. (2009). "A TLC bioautographic method for the detection of alpha- and beta-glucosidase inhibitors in plant extracts." Phytochemical Analysis **20**(6): 511-515.

Srinivas, S. y Prakash, V. (2010). "Bioactive Peptides from Bovine Milk alpha-Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties." International Journal of Peptide Research and Therapeutics **16**(1): 7-15.

Sun, J., He, H., Xie, B. (2004). "Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(21): 6646-6652.

Urista, C., Fernandez, R., Rodriguez, F., Cuenca, A., Jurado, A. (2011). "Review: Production and functionality of active peptides from milk." Food Science and Technology International **17**(4): 293-317.

WHO (2017). "Organización Mundial de la Salud, Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2017 (Ginebra, 2017) p.50."

Zhang, L., Parente, J., Harris, S., Woods, D., Hancock, R., Fallal, T. J. (2005). "Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(7): 2921-2927.

