



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación de la actividad inhibidora de dipeptidil
peptidasa IV de fracciones peptídicas de semillas de
*Lupinus mutabilis***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

José Manuel DE LA CRUZ GUEVARA

ASESORES

Dra. Karim Lizeth JIMÉNEZ ALIAGA

Mg. Adrián Arturo INTIQUILLA QUISPE (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

De la Cruz, J. (2023). *Evaluación de la actividad inhibidora de dipeptidil peptidasa IV de fracciones peptídicas de semillas de Lupinus mutabilis*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	José Manuel de la Cruz Guevara
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75270202
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40957382
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8234-8358
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Adrián Arturo Intiquilla Quispe
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71428803
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0034-9475
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Gladys Angélica Moscoso Mujica

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	23982336
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Pamela Elizabeth Canales Mormontoy
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46020676
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	No aplica
Tipo de documento	No Aplica
Número de documento de identidad	No aplica
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.4.3. Alimentos funcionales y nutraceuticos
Grupo de investigación	GI BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Programa PROCIENCIA del CONCYTEC, Contrato N° PE501078969-2022 Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado-UNMSM (RR N° 07572-R-23 proyecto A23040031i)
Ubicación geográfica de la investigación	En la sede de la UNMSM en Lima – Facultad de Farmacia y Bioquímica Edificio: Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Jr. Puno N° 1002 Latitud: -12.055370218206457 Longitud: -77.02349983677848
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Biología relacionada con la salud

	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01
--	---



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Evaluación de la actividad inhibidora de dipeptidil peptidasa IV de fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis*"

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

JOSÉ MANUEL DE LA CRUZ GUEVARA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

19 (DIECINUEVE) APROBADO CON MAXIMOS HONORES

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 15 de noviembre de 2023.

Dra. Amparo Irls Zavaleta Pesantes
Presidente

Dra. Gladys Angélica Moscoso Mujica
Miembro

Mg. Pamela Elizabeth Canales Mormontoy
Miembro



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **Karim Lizeth Jiménez Aliaga** en mi condición de asesora acreditada con la Resolución Decanal N°000918-2021-D-FFB/UNMSM de la tesis cuyo título es **“Evaluación de la actividad inhibitoria de la dipeptidil peptidasa IV de fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis*”**, presentado por el bachiller José Manuel de la Cruz Guevara para optar el título profesional de Químico Farmacéutico CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 15% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor _____

DNI: 40957382

Nombres y apellidos del asesor:

Karim Lizeth Jiménez Aliaga



Firmado digitalmente por JIMENEZ ALIAGA Karim Lizeth FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 01.02.2024 13:47:13 -05:00



DEDICATORIA

En primer lugar, va dedicado a Dios por brindarme las herramientas necesarias para concluir este trabajo.

A mis amados padres Fraxila y Julio, por siempre ser mi soporte durante toda mi vida,

A mi hermana Karla, por su apoyo incondicional y sincero desde mi niñez a seguir mis sueños

Al elenco de danzas Hampy Kamayuq por ser motivación constante para culminar esta etapa.

José Manuel De La Cruz Guevara

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, la Dra. Karim Jiménez y al Mg. Arturo Intiquilla por la paciencia y su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos Edwar Arizabal Casa, Roberto Valdivia Justo, Eduardo Estrada López y Dania Chapoñan Riojas por sus consejos y soporte en todo momento que lo necesité.

A mis profesores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por sus enseñanzas brindadas durante mi tiempo universitario,

José Manuel De La Cruz Guevara

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, fue financiado por Programa PROCIENCIA del CONCYTEC, Contrato N° PE501078969-2022 y parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado-UNMSM (RR N° 07572-R-23 proyecto A23040031i).

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	OBJETIVOS	3
	I.1.1 Objetivo general	3
	I.1.2 Objetivos específicos	3
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
II.1.	MARCO TEÓRICO	4
	A. Péptidos bioactivos	4
	B. Medicamentos peptídicos	6
	C. Enfermedades crónicas no transmisibles	9
	D. Diabetes Mellitus.....	9
	E. Fármacos Antidiabéticos	12
	F. Incretinas	15
	G. Leguminosas.....	16
	H. Tarwi	17
	I. Proteínas de tarwi	18
II.2.	ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	18
II.3.	BASES TEÓRICAS	18
	A. <i>Potencial antidiabético de péptidos inhibidores de la DPP-IV</i>	27
	B. <i>Potencial terapéutico de péptidos bioactivos del género Lupinus sobre la diabetes</i>	30
III.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	33
III.1.	HIPÓTESIS	33
III.2.	VARIABLES	33
	A. Variable independiente.....	33
	B. Variable dependiente	33
III.3.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	34
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
	IV.1. Obtención de la harina de <i>Lupinus mutabilis</i>	35
	IV.2. Obtención del concentrado proteico (CP) de tarwi	36
	IV.3. Hidrólisis enzimática del CP de tarwi.....	36
	IV.4. Obtención de fracciones peptídicas por ultrafiltración	37
	IV.5. Electroforesis en SDS-PAGE.....	37
	IV.6. Inhibición de la Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV)	38
	IV.7. Análisis estadístico.....	39
V.	RESULTADOS	40
	V.1. Obtención del concentrado proteico	40
	V.2. Hidrólisis enzimática del CP.....	41
	V.3. Grado de hidrólisis y digestibilidad de las proteínas.....	42
	V.4. Inhibición de la dipeptidil peptidasa IV.....	43

VI. DISCUSIÓN.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	54
VIII. RECOMENDACIONES	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
X. ANEXOS	68
a. FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO.....	688

LISTA DE ABREVIATURAS

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DPP-IV: Enzima dipeptidil peptidasa IV

CP: Concentrado proteico

GH: Grado de hidrólisis

IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50%

GLP-1: Péptido tipo glucagón tipo 1

GIP: Polipeptido insulínico dependiente de glucosa

HPPA: Hidrolizado de tarwi tras la actividad secuencial de pepsina, pancreatina y alcalasa.

UF: Fracción peptídica

WHO: Organización mundial de la salud

E:S: Relación enzima sustrato

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4

OGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa oral

Hb1AC: Hemoglobina glicosilada

NODAT: Diabetes de novo post-transplante

OPA: Ortoftaldehido

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

BSA: Albúmina de suero bovino

DPIV: Digestibilidad proteica *in vitro*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos peptídicos aprobados desde el 2000 con las dianas y usos.	7
Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de diabetes y prediabetes	10
Tabla 3. Otros tipos específicos de diabetes	11
Tabla 4. Medicamentos para reducir la glucosa, resumen de características	13
Tabla 5. Composición química de la semilla del Tarwi	17
Tabla 6. Contenido de proteína en varias especies de Tarwi	188
Tabla 7. Inhibidores de la DPP-IV comercializados	27
Tabla 8. Péptidos inhibidores de la DPP-IV descubiertos entre el 2016 y 2018 .	288
Tabla 9. Resumen de hidrolizados proteicos del género <i>Lupinus</i> con efecto antidiabético.....	32
Tabla 10. Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> del CP de tarwi y el GH determinado a lo largo de la hidrólisis secuencial con diferentes enzimas proteolíticas	42
Tabla 11. Actividad inhibitoria de la DPP-IV (IC ₅₀) en el tarwi	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta convencional, bioinformática y combinada para identificar péptidos bioactivos.....	5
Figura 2. Top 10 de medicamentos peptídicos más vendidos el 2019.....	6
Figura 3. Actividad del GLP-1 en tejidos periféricos.....	155
Figura 4. Actividad del GIP en tejidos periféricos.....	166
Figura 5. Porcentajes de proteína de leguminosas	177
Figura 6. Representación esquemática de los diferentes efectos antioxidante (A), inmunomodulador (B) e hipoglicémico (C) ejercidos por los hidrolizados proteicos de <i>Lupinus</i> (LPHs).	311
Figura 7. Perfil electroforético de las proteínas presentes en el CP de <i>Lupinus mutabilis</i>	400
Figura 8. Perfil electroforético de la hidrólisis secuencial del CP de <i>Lupinus mutabilis</i>	411
Figura 9. Evolución de la concentración de proteína durante la hidrólisis secuencial del CP de <i>Lupinus mutabilis</i>	433

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye un problema de salud pública a nivel mundial que genera un elevado gasto público y muerte de millones de personas anualmente. Una de las dianas terapéuticas más prometedoras es la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), responsable de degradar las incretinas, hormonas intestinales secretadas tras la ingesta de comida que estimulan la secreción de insulina. Se han reportado péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la enzima DPP-IV que podrían ser útiles en el tratamiento de la DM2. Las semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) contienen hasta el 50% de proteínas y constituyen una fuente potencial de péptidos inhibidores de DPP-IV. El objetivo principal fue evaluar la actividad inhibidora sobre la enzima DPP-IV de fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) para lo cual las semillas de tarwi fueron deslupinizadas y deslipidizadas con etanol, el concentrado proteico (CP) se preparó por precipitación isoeléctrica y se hidrolizó con las enzimas pepsina 0,7 FIP (Federación Internacional de Farmacia)- U/mg (HP), pancreatina 350 FIP- U/g (HPP) y alcalasa 2,4 U/g proteína (HPPA138), durante 30, 60 y 138 min, respectivamente, se determinó el Grado de Hidrólisis (GH) por el método del ortoftaldialdehído. El HPPA se ultrafiltró utilizando membranas de 3 y 10 kDa, en cada caso se determinó la inhibición de la DPP-IV usando como control la sitagliptina.

Se logró obtener un CP conteniendo 80.17% de proteínas, el perfil electroforético mostró bandas entre 30 a 60 kDa de peso molecular, las cuales fueron un excelente sustrato para las enzimas pepsina, pancreatina y alcalasa, con ésta última al tiempo de exposición de 138 min se obtuvo el mayor GH ($46.12 \pm 2.77\%$). El HPPA138 fue fraccionado en UF1, UF2 y UF3 de tamaños, > a 10, 3-10 kDa y < a 3 kDa; siendo la UF3 la que presentó mayor capacidad de inhibir la enzima DPP-IV con un IC_{50} de 0.06 ± 0.00 mg/mL, por lo que podría servir como ingrediente de alimentos funcionales para prevenir o tratar la DM2.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 2, *Lupinus mutabilis*, hidrolizados proteicos, inhibición de dipeptidil peptidasa IV

ABSTRACT

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM), is one of the biggest health issues worldwide because of the enormous amount of public spending and millions of deaths every year. One of the most promising therapeutic targets is inhibiting Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), which degrades incretins, intestinal hormones released after food intake, and stimulate insulin secretion. In that way, bioactive peptides have a promising potential against DPP-IV, which is an important benefit to the DM2 management. Tarwi's seeds contained almost 50% of proteins so that it could be an important source of DPP-IV inhibitors. The main aim looked for DPP-IV inhibiting activity using peptidic fractions of *Lupinus mutabilis*, in that way tarwi's seeds were debittered and defatted with ethanol. The proteinic concentrate (CP) was obtained by isoelectric precipitation, then digested by using commercial enzymes including pepsin (0.7 FIP-U/mg), pancreatin (350 FIP-U/g) and alcalase (2,4 U/g) to improve peptide's biodisponibility for 30, 60 and 138 min, respectively. Hydrolysis degree was estimated by the ortho-phthalaldehyde method. HPPA was filtered through 3 and 10 kDa membranes and the DPP-IV inhibition was measured (Sitagliptin was the positive control).

Proteic profile from Tarwi's PC showed molecular weights between 30 and 60 kDa and the protein yield obtained was 80.17%. Proteins were strongly digested by pepsin, pancreatin and alcalase, so that 138 mins of alcalase have the biggest hydrolysis degree ($46.12 \pm 2.77\%$). HPPA138 was fractionated into UF1, UF2 and UF3 sizes, > 10 , 3-10 kDa and < 3 kDa, respectively. The UF3 fraction was the most active inhibitor against DPP-IV (IC_{50} of 0.06 ± 0.00 mg/mL), so that it could be included in functional food in order to prevent or manage T2DM.

Key words: Type 2 Diabetes mellitus, *Lupinus mutabilis*, peptidic fractions, dipeptidyl peptidase IV, HPPA138, UF3

I. INTRODUCCIÓN

La reducción del impacto de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), tales como el cáncer, diabetes, afecciones cardíacas y respiratorias crónicas, es una prioridad global por ser la principal causa de muerte en el mundo representando el 74% de los decesos cada año. Entre las ECNT la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es uno de los problemas de salud de mayor crecimiento este siglo representado más del 90% del total de casos de diabetes, causando millones de muertes cada año y cuya prevalencia en el mundo sigue mostrando una tendencia al aumento de casos en las próximas décadas. La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) confirmaron la existencia de alrededor de 537 millones de pacientes diabéticos en el año 2021 y se espera que para el 2030 esta cifra se incremente a 643 millones (1-3). A nivel regional, en Latinoamérica 1 de cada 11 adultos tiene diabetes y se prevé un incremento de 16 millones de pacientes hasta el año 2045 generando un elevado gasto en salud de billones de dólares (4). El Perú no es ajeno a este problema, donde diversos estudios epidemiológicos realizados recientemente indican que el número de pacientes diabéticos mayores de quince años aumentó del 3.3% al 5.1% en el quinquenio 2017-2022 y que probablemente seguirá incrementándose por los malos hábitos alimenticios y el estilo de vida sedentario del peruano de ciudad (5).

Los datos estadísticos han alertado a los sistemas de salud en el mundo que vienen trabajando en el enfoque preventivo para reducir la aparición de nuevos casos y el enfoque de control para reducir las complicaciones derivadas de la enfermedad como neuropatías, nefropatías, retinopatías, retraso en la cicatrización, entre otras (6,7). El enfoque preventivo está basado en políticas de gobierno que buscan reducir el acceso a los factores de riesgo como el tabaco y alcohol o también a través de la promoción de la actividad física o una dieta saludable, ésta última teniendo en consideración que la evidencia ha asociado menor riesgo de DM2 al consumo de granos, legumbres, nueces, frutas y vegetales. Por otro lado, el enfoque de control

de la enfermedad busca un cambio crítico en el estilo de vida del paciente sumado al tratamiento farmacológico, entre ellos los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) o gliptinas por su efecto secretagogo de insulina y favorecer la homeostasis de glucosa (4,8).

En síntesis, la DM2 es una enfermedad que viene afectando a millones de personas de diferentes estratos sociales y el abordaje actual de prevención no ha tenido un impacto significativo en los indicadores, sumado a que los medicamentos antidiabéticos usados en el control de la enfermedad han reportado algunos efectos adversos graves, hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas mas seguras pero con actividad similar (6,9).

El manejo de la DM2 tiene diferentes frentes que buscan reducir el riesgo de complicaciones a través de un control glucémico adecuado y de otros factores de riesgo cardiovasculares. Es por ello que una profunda investigación de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad derivaron en fármacos novedosos con efecto incretina, como los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) que extienden el tiempo de vida media de la GIP y la GLP-1, los cuales favorecen la liberación de insulina, reducen la secreción de glucagón, retrasa el vaciado gástrico e incluso reducen el apetito; sin embargo también se les ha asociado a algunos efectos adversos graves (6,7,10,11).

En este sentido, los péptidos bioactivos en particular han atraído un creciente interés en la prevención, manejo y control de la diabetes por su bajo peso molecular, alta actividad, fácil absorción, y poco o ningún efecto secundario debido a una rápida eliminación de la sangre, siendo ya empleados dentro de los medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU como la Exenatida que fue aislada de *Heloderma suspectum* (7,11-15). Estos péptidos son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora los cuales se liberan tras un proceso de hidrólisis química o enzimática evidenciando actividades biológicas promisorias, entre ellas la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (9,16).

Partiendo de la premisa anterior, las leguminosas o fabáceas son una fuente interesante de proteínas de bajo costo que podrían servir como fuente para la obtención de hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas conteniendo péptidos bioactivos (16-29). Alineados a este enfoque nuestro grupo de investigación viene elaborando diversos estudios que buscan elucidar el potencial beneficio biológico derivado de los péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas de las leguminosas, entre ellas el tarwi y el pajuro (18,30,31).

En consecuencia, el presente estudio buscó determinar el potencial inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV de las fracciones peptídicas de *Lupinus mutabilis*, que podrían servir como complemento dentro del tratamiento, control y prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

I.1. OBJETIVOS

I.1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad inhibidora sobre la enzima DPP-IV de fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi).

I.1.2 Objetivos específicos

- Obtener proteínas solubles de las semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi).
- Hidrolizar el concentrado proteico con enzimas de diferente origen.
- Fraccionar el hidrolizado proteico mediante ultrafiltración.
- Evaluar el efecto de las fracciones peptídicas sobre la actividad enzimática de DPP-IV.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. MARCO TEÓRICO

A. Péptidos bioactivos

Son fragmentos de proteínas de un tamaño entre 2 a 20 aminoácidos que poseen un amplio rango de efectos biológicos beneficiosos, como la actividad antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomodulador, entre otras (12-14).

Actualmente las fuentes principales para obtener péptidos bioactivos son las plantas y animales pero también se tiene la síntesis de péptidos en fase sólida que se usa generalmente a escala industrial. La Figura 1 muestra el flujo de preparación, purificación, identificación y evaluación de la bioactividad de los péptidos siguiendo la ruta convencional, bioinformática o una combinación de ambas (14).

Por otro lado, a pesar de los beneficios de estas moléculas aún se tienen retos que limitan en cierta manera su uso o aprovechamiento óptimo como el sabor amargo al ingerirlas, estabilidad en el tracto gastrointestinal y la absorción de estas a nivel intestinal (12,14).

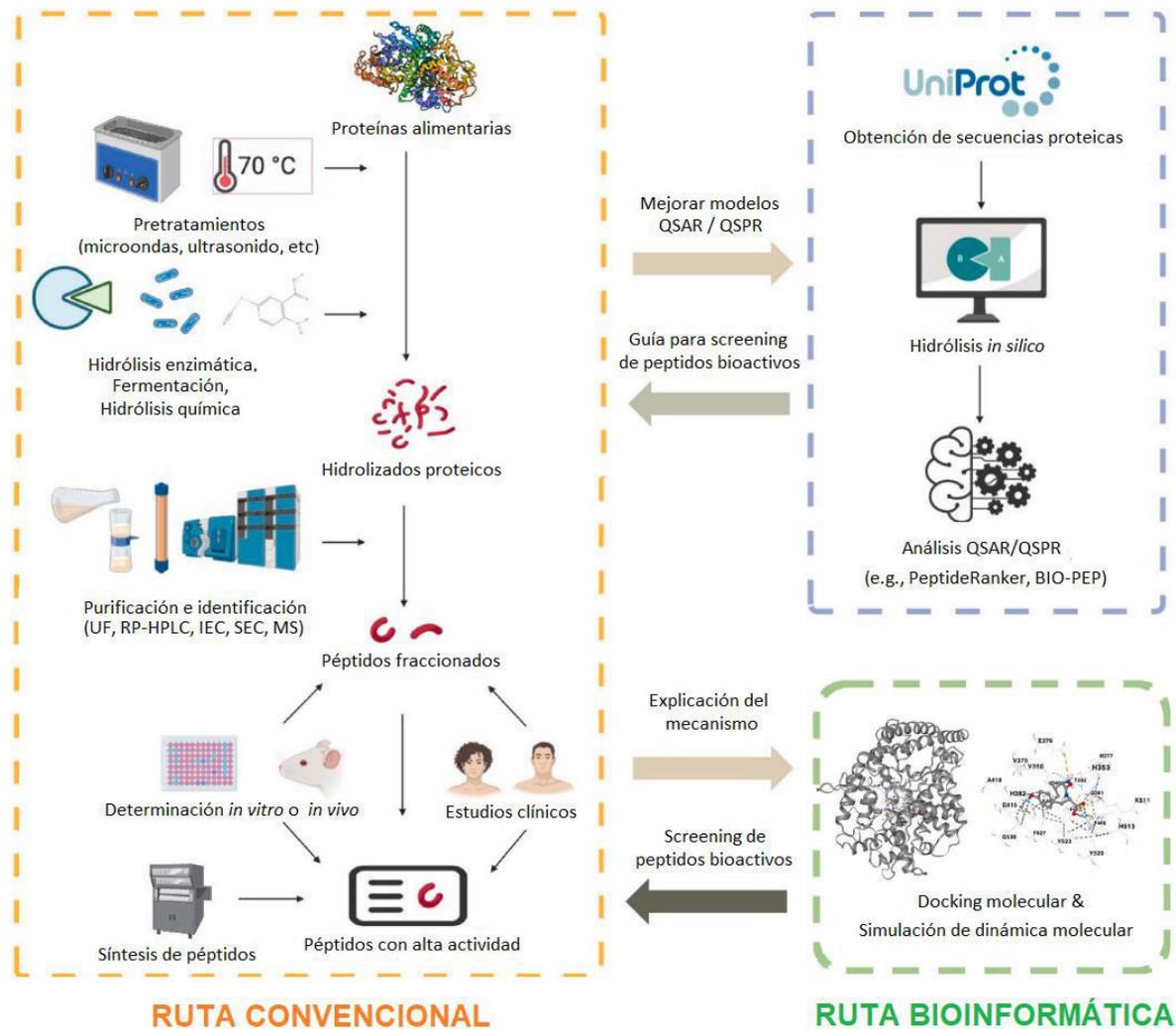


Figura 1. Ruta convencional, bioinformática y combinada para identificar péptidos bioactivos.

Figura traducida de "Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities" de Du Z y Li Y (14).

B. Medicamentos peptídicos

Son un tipo de medicamentos compuestos por una serie bien definida de aminoácidos con pesos moleculares entre 500-5000 Da que ocupan un porcentaje significativo del mercado farmacéutico con ventas a nivel mundial que superaron los 70 billones de dolares el 2019. En la Figura 2 se muestra los 10 medicamentos peptídicos no insulínicos más vendidos el 2019, donde el top 3 son péptidos con actividad antidiabética análogos de la GLP-1: Trulicity (dulaglutida), Victoza (liraglutida) y Rybelsus (semaglutida) (13,14).

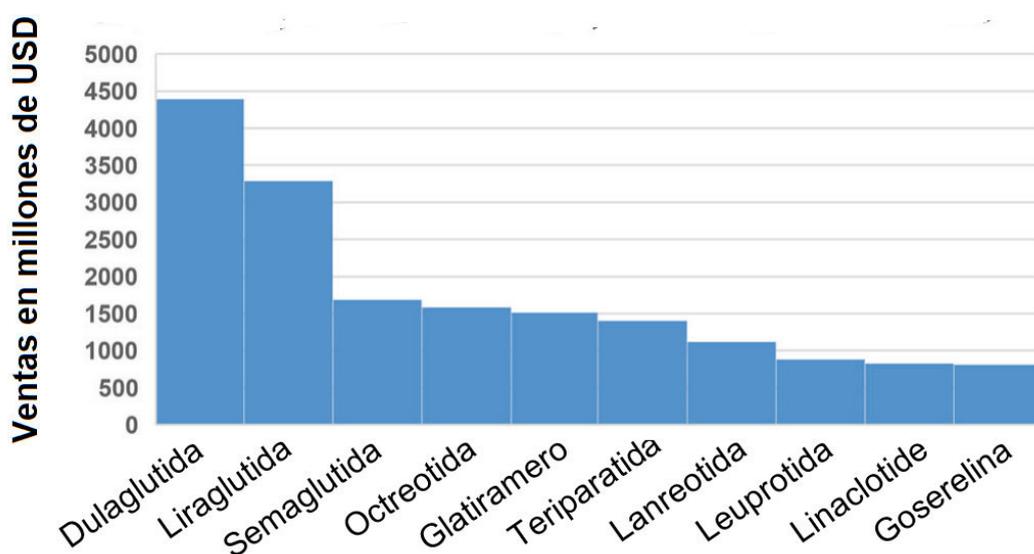


Figura 2. Top 10 de medicamentos peptídicos más vendidos el 2019.

Figura traducida de "Therapeutic peptides: current applications and future directions" de Wang et al (13).

El primer péptido comercializado fue la insulina, descubierta en 1921, y hasta el 2022 se vienen aprobando mas de 80 péptidos a nivel mundial. Los avances recientes en biología estructural, biología recombinante, tecnologías analíticas y sintéticas han optimizado el desarrollo de medicamentos péptidicos, por ejemplo, para el caso de diabetes entre el año 2000 y 2022 se aprobaron 33 medicamentos péptidicos no insulínicos (Tabla 1) (13).

Tabla 1. Medicamentos peptídicos aprobados desde el 2000 con las dianas y usos.

Tabla traducida de “Therapeutic peptides: current applications and future directions” de Wang et al (13).

Nombre de la Diana	Nombre del Péptido	Año de aprobación	Usos aprobados
Receptor de GLP-1	Exenatida	2005	Indicado para diabetes tipo 2
	Liraglutida	2009	
	Lixisenatida	2013	
	Albiglutida	2014	
	Dulaglutida	2014	
	Semaglutida	2017	
Receptor de GLP-2	Teduglutida	2012	Tratamiento de síndrome de intestino corto y mala absorción
Receptor de GC-C	Linaclotida	2012	Tratamiento de síndrome de colon irritable con constipación y constipación crónica idiopática
Receptor de calcitonina	Pramlinitida	2005	Tratamiento de diabetes mellitos tipo 1 y tipo 2
Receptor de GnRH	Abarelix	2003	Tratamiento de cáncer de próstata avanzado
	Degarelix	2008	
Unión al sitio activo del proteosoma 20S	Carfilzomib	2012	Tratamiento de mieloma múltiple
Proteína NOD2	Mifamurtida	2009	Tratamiento de osteosarcoma de alto grado, resectable y no-metastásico
Receptor VIP1	Aviptadil	2000	Tratamiento de disfunción eréctil
Receptor OT	Atosiban	2000	Indicado para retrasar el inminente nacimiento pre-término
	Carbetocina	2001	Usado en hemorragia post-parto
Receptor TRH	Taltirelina	2000	Degeneración espinocerebelar
Receptor MC	Bremelanotida	2019	Indicado en desorden de deseo sexual hipoactivo

Tabla 1. (continuación)

Nombre de la Diana	Nombre del Péptido	Año de aprobación	Usos aprobados
Receptor PTH1	Teriparatida	2002	Tratamiento de osteoporosis
	Abaloparatida	2017	
Guanilato ciclasa C	Plecanatida	2017	Tratamiento de constipación crónica idiopático
NPR-A	Nesiritida	2001	Tratamiento de fallo cardiaco agudo descompensado
Receptor AT ₁	Angiotensina II	2017	Indicado para sepsis o shock séptico
Receptor beta 2	Icatibant	2008	Aprobado para uso en ataques agudos de angioedema hereditario
gp41	Enfuvirtida	2003	Usado en terapia de combinación para tratamiento de VIH-1
Receptor GHRH	Tesamorelina	2010	Reducción de VIH lipodistrófico
Canales de calcio tipo N	Ziconotida	2004	Manejo de dolor crónico severo
Receptor de trombopoyetina	Romiplostim	2008	Tratamiento de púrpura trombocitopénica inmune crónico
Receptor de eritropoyetina humana	Peginesatida	2012	Tratamiento de la anemia asociada con enfermedad renal crónica
Surfactante pulmonar	Lucinactant	2012	Prevención de síndrome de distrés respiratorio
CaSR	Etelcalcetida	2016	Indicado en hiperparatiroidismo secundario
Receptor MC1	Afamelanotida	2014	Prevención de fototoxicidad
Receptor de Somatostatina	Pasireotida	2012	Tratamiento de enfermedad de Cushing
	Lutecio Lu 177 dotatato	2018	Tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreaticos receptor-positivo
	Galio Ga 68 edotreotida	2019	Indicado en el diagnostico de tumores neuroendocrinos receptor-positivo de somatostatina
Receptor de 4-melanocortina	Setmelanotida	2020	Indicado para el manejo de peso crónico de obesidad

C. Enfermedades crónicas no transmisibles

Las ECNT son afecciones persistentes y de largo plazo que actualmente representan un gran reto a nivel mundial. Estas comprenden enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas, entre otras que anualmente son causa de aproximadamente el 74% del total de muertes en el mundo (equivalente a 41 millones de decesos) (32).

La aparición de estas enfermedades se ha asociado a una combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales, es por ello que la WHO ha establecido objetivos globales que buscan reducir el impacto de factores de riesgo como el uso de tabaco, dietas poco saludables, sedentarismo y uso indiscriminado del alcohol, que conllevan al sobrepeso u obesidad, elevación de la presión arterial y elevación de colesterol que finalmente desencadenan el desarrollo de ECNT afectando al paciente, sus familias y a los sistemas de salud (1-3).

D. Diabetes Mellitus

Es una ECNT afectando a más de 500 millones de personas en el mundo que se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre porque el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no la puede aprovechar adecuadamente en los tejidos. Su abordaje requiere cuidado continuo de manera multifactorial, ya que la hiperglicemia a largo plazo aumenta el riesgo de complicaciones como enfermedades cardiovasculares, daño nervioso (neuropatía), daño renal (nefropatía), amputación de los miembros inferiores y enfermedades visuales (como retinopatías) implicando pérdida de visión o ceguera en estos pacientes (4,8).

Diagnóstico de diabetes

Los criterios para el diagnóstico de la diabetes y prediabetes se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de diabetes y prediabetes adaptado de la American Diabetes Association (ADA) (8).

DIABETES	PREDIABETES
GLUCOSA EN AYUNAS	
≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL)	5.6 a 6.9 mmol/L (100 a 125 mg/dL)
GLUCOSA PLÁSMATICAS TRAS 2 H EN EL OGTT	
≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL)	7.8 a 11 mmol/L (140 a 199 mg/dL)
HbA1C*	
≥ 48 mmol/mol (equivalente al 6.5%)	39 a 47 mmol/mol (5.7 a 6.4%)
GLUCOSA PLASMÁTICA ALEATORIA**	
≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL)	

* La prueba de HbA1C (hemoglobina glicosilada) debe realizarse en un laboratorio que está certificado por la NGSP y estandarizado a las pruebas de control de diabetes y complicaciones.

** En pacientes con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica

Diabetes tipo 1

Es una enfermedad autoinmune que representa entre el 5 al 10% del total de casos de diabetes, donde el propio organismo causa la destrucción de las células β del páncreas, lo que ocasiona baja o no producción de insulina por lo que requieren inyecciones diarias de esta hormona para mantener el control glucémico. La causa de la enfermedad está relacionada a una predisposición genética y un gatillador ambiental (como una infección viral); sin embargo, la tasa de destrucción de células β es variable, siendo rápida en algunas personas (principalmente, pero no exclusivo de infantes y niños) y lenta en otras (particularmente, pero no exclusivo en adultos) (4,8).

Diabetes tipo 2

Es el tipo de diabetes que se presenta con mayor frecuencia representando entre el 90 a 95% de los casos, pero sus síntomas son menos notorios o asintomáticos, en donde el organismo tiene una relativa deficiencia de insulina y resistencia a la insulina periférica, lo cual a largo plazo genera

aumento de la producción de la hormona y con ello daño en las células pancreáticas. La causa específica de la enfermedad no es conocida aún, sin embargo, hay factores de riesgo como la edad, obesidad y falta de actividad física; también es más común en personas con hipertensión, dislipidemias y en algunos grupos étnicos como los afroamericanos, nativos americanos, latinos y asiático-americanos, así también se le asocia con una fuerte predisposición genética o historial familiar en primer grado, pero no se conoce por completo el fundamento de ello (4,8).

Otros tipos de diabetes

Actualmente se tiene en consideración otros tipos específicos de diabetes con casusas diferentes a lo descrito para tipo 1 y tipo 2, estas se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Otros tipos específicos de diabetes.

Tabla traducida del "IDF Diabetes Atlas" de la International Diabetes Federation (4) y complementada con "Standards in Diabetes Care 2023" de la American Diabetes Association (8).

DIABÉTÉS MONOGÉNICA
Son defectos monogénicos que causan disfunción de células β del páncreas, tal como diabetes neonatal y MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)
DIABETES GESTACIONAL
Diabetes ocurrida en cualquier etapa de la gestación y desaparece tras el parto, pero que es muy probable que en próximos embarazos se vuelva a presentar.
DIABETES RELACIONADA A FIBROSIS QUÍSTICA
Aparece frecuentemente como una comorbilidad en personas con fibrosis quística
DIABETES MELLITUS POSTTRANSPLANTE
Denominada también NODAT por sus siglas en inglés, se desarrolla en personas que recibieron un trasplante

Tabla 3. (continuación)

DIABETES OCASIONADA POR OTRAS CONDICIONES
<p>La diabetes también puede ser derivada de otras condiciones tales como:</p> <ul style="list-style-type: none">• Enfermedades en el páncreas (pancreatitis, traumas, infección, cáncer de páncreas y pancreatectomía).• Desórdenes endocrinos que causan exceso de hormonas que antagonizan con la insulina (e.g. Síndrome de Cushing).• Debido a químicos o drogas que alteran la secreción de insulina o su actividad.• Infección viral que causa destrucción de células β.• Diabetes causada por otras desordenes inmunes diferentes a los del tipo 1• Otros síndromes genéticos (e.g. Síndrome Prader-Willi, Síndrome de Down, etc.).

E. Fármacos Antidiabéticos

El manejo de la diabetes sigue un esquema terapéutico a través de medicamentos con diferentes dianas terapéuticas que permiten el control de la glicemia el cual se adapta a diferentes guías de práctica clínica y es brindado por un médico basado en el estado actual de la enfermedad y sus ensayos bioquímicos. La tabla 4 muestra el tratamiento antidiabético actual.

Tabla 4. Medicamentos para reducir la glucosa, resumen de características.

Traducida de “Standards in Diabetes Care 2023” de la American Diabetes Association (8), complementada con “Nuevos fármacos en diabetes mellitus” de Aylwin (10) y “Diabetes, Type 2” de Samson y Garber (33).

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCIÓN	EFICACIA	RH	CP	HF	AVANCE DE LA ERD	ADM	COSTO
Biguanidas	Inhiben la producción de glucosa hepática y promueve la captación de glucosa en el músculo esquelético.	Alta	No	Neutral	Neutral	Neutral	Oral	Bajo
Inhibidores de la SGLT2	Aumentan la excreción renal de la glucosa en forma independiente de la insulina inhibiendo su reabsorción	Intermedia a alta	No	Pérdida (Intermedio)	Beneficio: Canagliflozina Dapagliflozina Empagliflozina Ertugliflozina	Beneficio: Canagliflozina Dapagliflozina Empagliflozina	Oral	Alto
Agonistas del receptor de GLP-1	Mimetizan la acción de la GLP-1 endógena, aumentando la secreción de insulina dependiente de glucosa y reducen la secreción de glucagón. Retrasan el vaciado gástrico y aumenta la saciedad.	Alta a muy alta	No	Pérdida (Alta a muy alta)	Neutral	Beneficio para marcadores renales en CVOT consecuencia de resultados de albuminuria: Dulaglutide Liraglutide Semaglutide (SC)	SC; oral (Semaglutida)	Alto
Agonistas del receptor de GLP-1 y GIP	Mimetizan la acción de las incretinas endógenas	Muy alta	No	Pérdida (Muy alta)	En investigación	En investigación	SC	Alto
Inhibidores de la DPP-IV	Aumentan los niveles y potencian la acción de las incretinas endógenas, aumentando la secreción de insulina y reduciendo la secreción de glucagón.	Intermedia	No	Neutral	Neutral (Riesgo potencial Saxagliptina)	Neutral	Oral	Alto

RH: Riesgo de hipoglucemia; **CP:** Cambios en el peso; **HF:** Falla cardíaca; **ERD:** Enfermedad renal diabética; **ADM:** Vía de administración; **SGLT-2:** Cotransportador de glucosa-sodio 2; **DPP-IV:** Dipeptidil peptidasa IV; **SC:** Subcutáneo

Tabla 4. (continuación)

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCIÓN	EFICACIA	RH	CP	HF	AVANCE DE LA ERD	ADM	COSTO
Tiazolidinedionas	Activa el receptor nuclear del peroxisoma proliferador activado por receptor gamma (PPAR) que incrementa la adiponectina y mejora la resistencia a la insulina	Alta	No	Aumento	Mayor riesgo	Neutral	Oral	Bajo
Sulfonilúreas	Despolariza la membrana de la célula beta lo que incrementa la secreción de insulina	Alta	Si	Aumento	Neutral	Neutral	Oral	Bajo
Insulina Humana	Activa los receptores de insulina y las rutas relacionadas	Alta a muy alta	Si	Aumento	Neutral	Neutral	SC; inhalado	Bajo (SC)
Análogos de insulina							SC	Alto

RH: Riesgo de hipoglucemia; **CP:** Cambios en el peso; **HF:** Falla cardíaca; **ERD:** Enfermedad renal diabética; **ADM:** Vía de administración; **SGLT-2:** Cotransportador de glucosa-sodio 2; **DPP-IV:** Dipeptidil peptidasa IV; **SC:** Subcutáneo

F. Incretinas

Son péptidos que se liberan en el intestino después de la ingesta de alimentos que poseen un efecto secretagogo de insulina dependiente de glucosa que se conoce como “Efecto incretina”. Las principales incretinas son el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) que es producida por las células L enteroendocrinas del íleon distal y colon; así como el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) el cual es producido por las células K enteroendocrinas del duodeno y yeyuno (4,6,9,11).

El GLP-1 y GIP tienen una vida media muy corta (menor a 2 min) pues son rápidamente inactivadas por la DPP-IV en el extremo N-terminal, pero que, a pesar de ello, cumplen con una gran diversidad de actividades que se describen en la Figura 3 y Figura 4 en diferentes tejidos con potencial beneficioso en la diabetes tipo 2 (34).



Figura 3. Actividad del GLP-1 en tejidos periféricos.

La acción sobre el hígado, tejido adiposo y músculo es a través de mecanismos indirectos.

Traducido de “Biology of Incretins: GLP-1 and GIP” de Baggio y Drucker (34).

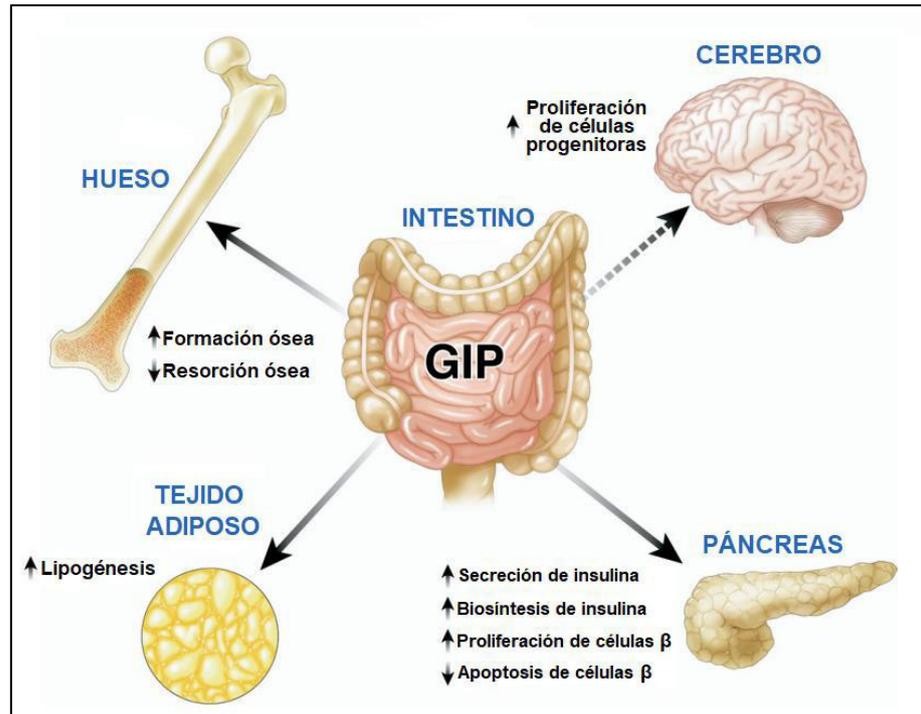


Figura 4. Actividad del GIP en tejidos periféricos.

Traducido de "Biology of Incretins: GLP-1 and GIP" de Baggio y Drucker (34).

G. Leguminosas

Las legumbres corresponden a una familia de elevada calidad nutritiva y de bajo costo lo que facilita su acceso; su importancia nutricional se debe a que sus carbohidratos no elevan el nivel de glucosa en sangre ya que solo se digiere una pequeña fracción de estos, también su porcentaje de grasa es bajo y aportan micronutrientes. Es importante también resaltar su contenido proteico ya que su porcentaje es superior a otras especies (como los cereales), donde a pesar de que su calidad nutricional es inferior a las proteínas de origen animal por su limitación en aminoácidos esenciales azufrados aportan beneficios en la salud y prevención de ECNT (35,36).

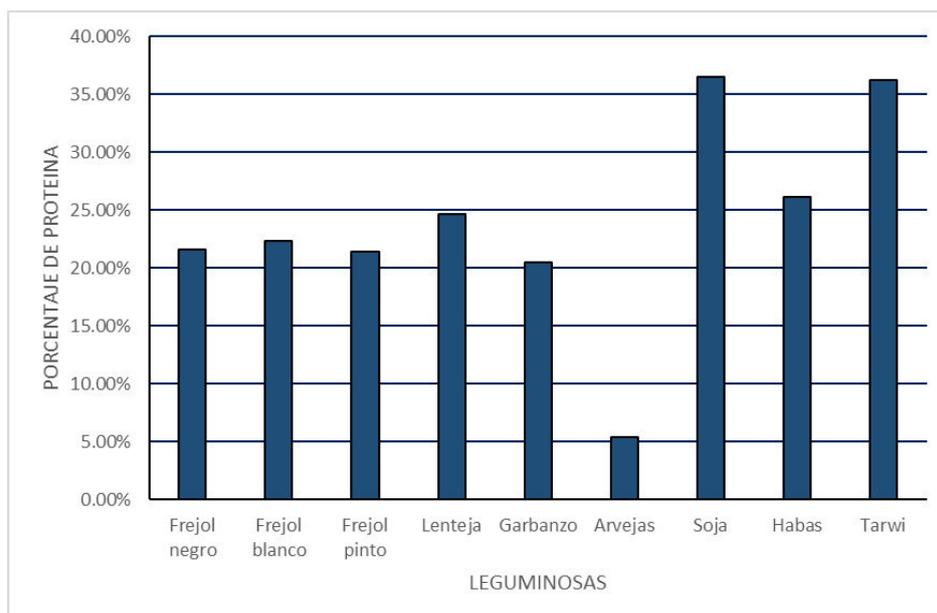


Figura 5. Porcentajes de proteína de leguminosas

H. Tarwi

El tarwi “*Lupinus mutabilis Sweet*” también llamado “chocho” forma parte de la familia de las leguminosas, la cual se siembra y obtiene de la zona andina de Perú, Ecuador y Bolivia. Posee características nutricionales muy convenientes, tal como el elevado contenido de proteína, grasa y fibra superior a otras especies usadas industrialmente, aunque su principal limitación son los alcaloides presentes que le brindan un sabor amargo (Tabla 5) (31,37).

Tabla 5. Composición química de la semilla del Tarwi.

Tabla tomada de “*Lupinus mutabilis (Tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial*” de Zavaleta et al (31).

COMPOSICIÓN QUÍMICA	DESAMARGADO	AMARGADO
Humedad (%)	73.63	9.90
Proteína (%)	51.07	41.20
Cenizas (%)	2.38	3.98
Grasa (%)	20.44	17.54
Fibra (%)	7.35	6.24
Calorías (g)	5839.00	-
Carbohidratos (%) ELN*	18.75	30.88
Materia seca (%)	26.37	90.10
Alcaloides (%)	0.08	3.11

* ELN: Extracto libre de nitrógeno

I. Proteínas de tarwi

Es una de las características más resaltantes de la semilla pues sus valores son cercanos al 50% (Tabla 6) y además de un contenido adecuado de aminoácidos esenciales, aunque es necesario complementar su consumo con cereales debido a su bajo contenido de metionina (31).

Tabla 6. Contenido de proteína en varias especies de Tarwi.

Tabla tomada de "Lupinus mutabilis (Tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial" de Zavaleta et al (31).

ESPECIE	PROTEÍNA (%)
<i>L. mutabilis</i>	39.0 – 52.0
<i>L. angostifolius</i>	33.2 – 35.5
<i>L. hispanicus</i>	43.9 – 46.9
<i>L. albus</i>	39.2 – 43.3

II.2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Actualmente, el consumo y aprovechamiento de los compuesto de origen vegetal tiene especial interés debido a sus ventajas sobre aquellos que se obtienen a partir de animales, entre ellas las legumbres se han relacionado con beneficios en diferentes enfermedades, tal como lo describe Mamoudou *et al* (38), los cuales estudiaron la composición de soya, frejol, maní, frejol castilla y frejol mambara, y su relación con la prevención de enfermedades como la hipertensión, obesidad, accidentes cerebrovasculares (ACV) y diabetes tipo 2 en 9 distritos de Camerún. Sus resultados evidenciaron una elevada correlación entre el consumo de frejol Mambara de la variante roja y la prevención de diabetes tipo 2 e hipertensión con un R^2 de 0.9804 y 0.9651, respectivamente. Para el caso de la prevención de ACVs y obesidad la mayor correlación se evidenció con el consumo de soya con un R^2 de 0.9656. Los mecanismos que asocian los autores a las legumbres consumidas radican en la presencia de polifenoles, fibra dietaria y péptidos bioactivos, por lo cual recomiendan una mayor atención a estos cultivos, sobretodo en aquellos subutilizados para la formulación de alimentos funcionales.

Por otro lado, la inclusión de maní en la dieta de varones con enfermedades metabólicas incrementó la presencia de *Faecalibacterium prausnitzii* ($\beta=0.85$, $P_{FDR}=0.05$) que retrasa la debilidad del envejecimiento; también, en el caso de las mujeres el consumo de mani redujo la presencia de la familia *Peptococcaceae* ($\beta=-0.69$, $P_{FDR}=0.05$) que se le relaciona con ansiedad prenatal y estrés en estudios pre-clínicos, como los resultados de la investigación realizada por Wang *et al* (39) en 2 cohortes en China con un total de 2303 participantes.

El beneficio del consumo de legumbres y la diabetes mellitus tipo 2 se describe en un metanálisis de 27 cohortes (807 785 individuos) con diferentes ubicaciones geográficas realizado por Pearce *et al* (40), en el cual se evidenció una asociación (aunque débil) entre el consumo de legumbres (arveja, frejol, garbanzo y lenteja), soya y nueces con menor incidencia de diabetes tipo 2 con un ratio de tasa de incidencia (IRR) de 1.02 (IC95% de 1.01 a 1.04) para consumos mayores a 20 g por día que se incrementaba a un IRR de 1.17 (IC95% de 1.04 a 1.32) para consumos que superaban los 140 g por día.

En el mismo sentido, Tang *et al* (17) investigaron en 15 cohortes en diferentes zonas tales como EEUU, Asia, Europa y Australia el consumo de la soya y destacaron un impacto positivo al incluir diariamente 124 g de tofu, 10 g de proteína de soya o 10 mg de isoflavonas de soya en su dieta reduciendo el riesgo de incidencia de diabetes tipo 2 en un 32% (RR:0.68; IC95%:0.50 a 0.93), 9% (RR:0.91; IC95%: 0.84 a 0.99) y 4% (RR:0.96; IC95%: 0.92 a 0.99), respectivamente.

De igual manera Asledottir *et al* (19) realizaron un trabajo en hidrolizados proteicos de haba y arveja utilizando jugos gástricos y duodenales humanos por 120 min a 37°C en una relación E:S de 1:1. Las secuencias de aminoácidos encontradas se comparó con la base de datos BIOPEP identificando 133 y 182 secuencias inhibidoras de la DPP-IV dentro de las

secuencias obtenidas para haba y arveja, respectivamente. Los autores usaron la herramienta PeptideRanker para identificar los péptidos potencialmente bioactivos, obteniendo las secuencias DKPWWPK y NEPWWPK en arveja, así como los péptidos GAGPPPPPPGA, QGPPPPPPISL, ATPPPPPPPMSL, PPPPPPGAKPG y QQGPPPPPPISL con mayor potencial. Adicionalmente los ensayos inmunomoduladores *in vitro* en estos péptidos mostraron un efecto beneficioso; por lo que, los investigadores concluyeron en la importancia de promover los beneficios de las legumbres, sobretodo en la dieta occidental que no se aprovecha adecuadamente.

También, Acevedo y Gonzalez de Mejía (20) estudiaron en diabetes el potencial bioactivo de 5 variantes de garbanzo (Nash, Billy bean, Sierra, Myles y comercial). Los hidrolizados obtenidos con pepsina y pancreatina fueron evaluados frente a la base de datos BIOPEP encontrando 19 péptidos diferentes con actividad inhibitoria de la DPP-IV. Adicionalmente, para favorecer la liberación de péptidos bioactivos optimizaron la hidrólisis usando bromelina, encontrando la mayor actividad inhibitoria de la DPP-IV *in vitro* ($94 \pm 0.81\%$) al hidrolizar por 60 min la variante Sierra precocida por 15 min a una relación E:S de 1:10. Los péptidos identificados fueron sometidos a pruebas de docking que mostraron una energía de afinidad entre -4.2 y -8.8 kcal/mol, similar a lo evidenciado para el patrón vidagliptina (-6.2 kcal/mol). Seguidamente para verificar la actividad se realizaron pruebas *in vitro* de inhibición de enzimas relacionadas al control y tratamiento de diabetes encontrando la máxima inhibición de la DPP-IV con los hidrolizados de la variante Billy bean con un IC_{50} de 0.17 mg/mL, esta misma variante también obtuvo la mayor actividad inhibiendo la α -amilasa y α -glucosidasa.

Otra leguminosa conocida como frejol Bambara fue investigada por Mune Mune, Minka y Henle (21) quienes hidrolizaron el aislado proteico utilizando alcalasa, tripsina y termolisina por 24 h, generando grados de hidrólisis de 38, 22 y 27.5%, respectivamente. Los hidrolizados obtenidos con alcalasa tuvieron mejor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina

(ECA) con un IC₅₀ de 52.812 µg/mL, mientras que los hidrolizados utilizando alcalasa y termolisina presentaron la máxima actividad inhibitoria de la DPP-IV ambas con un IC₅₀ de 1.733 mg/mL; los hidrolizados con tripsina presentaron mejor actividad secuestrante de DPPH con valores de 5.522 ± 0.166 µg eq. de trolox/mg y quelante de hierro con un valor de 1.016 ± 0.030 mg eq. de trolox/mg. La evaluación *in silico* de los hidrolizados de termolisina encontró 9 péptidos con actividad inhibitoria de la DPP-IV de los cuales IP, LN, VE e IP tenían también actividad inhibitoria de la ECA.

Entre las leguminosas, el género *Lupinus* posee alrededor de 600 especies; son reconocidas por poseer un alto contenido de proteínas similares a la soya y se ha reportado un alto valor biológico, también se destaca como fuente de péptidos bioactivos obtenidos mediante diferentes procesos biotecnológicos; Cruz-Chamorro *et al* (22) realizaron una revisión en este género evidenciando que los hidrolizados proteicos poseen diferentes efectos biológicos como la actividad antioxidante, antitrombótica, antihipertensivo, hipoglucemiante, hipolipemiante, efecto preventivo de osteoporosis, reducción de la formación de placas de ateroma, protector de la función renal, entre otras. A partir de los hidrolizados mencionados se identificaron 116 secuencias peptídicas con actividad inhibitoria de la DPP-IV. Por ende, los hidrolizados proteicos del género *Lupinus* poseen potencial antidiabético y podrían servir como ingredientes en la formulación de nutraceuticos para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 2.

Mazumder *et al* (41) evidenciaron que el extracto metanólico obtenido de la harina sin procesar del cultivar Jenabillup de *Lupinus angustifolius* (JEN), presentó mejor actividad al compararla con otros 8 cultivares australianos en estudios *in vitro* inhibiendo la α-amilasa y a la α-glucosidasa con un IC₅₀ de 4330.19 ± 85.15 µg/mL y 5164.46 ± 177.62 µg/mL, respectivamente; mejoraba también la captación de glucosa *in vitro* en un 30.24%. El estudio *in vivo* mostró que JEN sin procesar a una dosis de 500 mg/kg por 21 días reducía el índice glicémico, la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), proteínas glicosiladas, elevaba la hemoglobina sérica, tenía efecto hipolipidémico,

cardioprotector, hepatoprotector y nefroprotector, similar al efecto del patrón metformina. Adicionalmente la evaluación *in silico* demostró que 5 compuestos presentes en JEN tenían mejor afinidad por las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa que la acarbosa. Los autores señalaron que estos cultivares deben de considerarse como alternativas de bajo costo y biofuncionales para el tratamiento de diabetes y complicaciones asociadas relacionadas a daño en los órganos.

Guzman *et al* (23) estudiaron el efecto beneficioso de las β -conglutinas de *Lupinus albus* en ratas Wistar, encontrando que en ratas sanas mejoraban la tolerancia a la glucosa oral y el impacto glicémico de la digestión/absorción de almidón. La evaluación de animales inducidos a diabetes con estreptozotocina evidenció que una dosis aguda de β -conglutina de 120 mg/kg o 240 mg/kg reducían el área bajo la curva glicémica al compararlas con el control; similar efecto se observó en el consumo a largo plazo (7 días) evitando picos de glicemia y reduciendo también en un 21.8% los niveles de colesterol sérico. Los autores mapearon los posibles mecanismos a través de los micro array identificando 821 genes que redujeron su expresión y 1603 sobreexpresados tras el tratamiento los cuales estaban relacionados con el estrés oxidativo, inflamación, actividad estrogénica, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes.

Tapadia *et al* (24) evaluaron el potencial antidiabético de la fracción menor a 3000 Da de γ -conglutina de *Lupinus angustifolius* hidrolizados con pepsina y pancreatina generando 32 péptidos entre 704.4 y 3117.7 Da de peso molecular. El hidrolizado no presentaba efecto insulínico directo pero sí efecto insulinomimético *in vitro* aumentando en células HSSM 1.4 veces la captación de glucosa y 2 veces la síntesis de glucógeno los cuales estarían relacionados a la actividad de la conglutina en la cascada enzimática mTOR/AKT/GSK3 β ; también, se detectó que aumentaban la síntesis proteica 1.55 veces probablemente relacionada a la ruta mTOR/70S6K/S6. Otro ensayo *in vitro* realizado por los investigadores fue la inhibición de la enzima alfa glucosidasa encontrando que el hidrolizado no tenía efecto

significativo sobre esta, pero si sobre la DPP-IV inhibiendola en más del 50% de su actividad a una concentración de 1000 µg/mL al compararlo con el control.

Garmidolova *et al* (42) estudiaron los hidrolizados con papaína de *Lupinus angostifolius L.*, encontrando que la actividad antioxidante de estos con el método ABTS se encontraba entre 5.25 y 6.45 mMTE/100 g de proteína; estos hidrolizados también inhibieron la acetilcolinesterasa con valores de IC₅₀ entre 155.56 y 199.63 mg/g de proteína; por otro lado todos los hidrolizados tuvieron un efecto antimicrobiano sobre la *Escherichia coli* ATCC8739, pero, solo el hidrolizado obtenido con una relación E:S de 1% y por un tiempo de hidrólisis de 30 min fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25093 con un halo de 0.7 cm.

En el norte de nuestro país se produce la leguminosa *Lupinus mutabilis*, conocida también como “tarwi” o “chocho”, la cual tiene una calidad nutricional excepcional y también ha mostrado diferentes efectos beneficiosos como la reducción significativa de la tasa de adhesión de *E. coli*, *E.coli ESBL*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* multidrogoresistente, *P. aeruginosa* y *S. saprophyticus* a las células epiteliales T24 de vejiga al ser tratadas con el extracto hidroetánolico a una dosis de 1000 µg/mL; además reduce la formación de biofilm que favorece la actividad de los antibióticos. En este estudio no se evidenció actividad antimicrobiana directa del extracto pero si a través de otros mecanismos pues reducía la expresión del mRNA UPK1A que es una proteína clave en el inicio de infecciones del tracto urinario sirviendo para la adhesión bacteriana; y el extracto incrementó la expresión de mRNA de RNasa7 el cual es un péptido antimicrobiano de bacterias Gram positivo y Gram negativo, incluso en aquellas multidrogoresistentes (43).

Zambrana *et al* (44) estudiaron el efecto *in vivo* de *Lupinus mutabilis* en ratas Goto-Kakizaki (ratas con diabetes tipo 2). El extracto hidroetanólico de tarwi mejoró la tolerancia oral a la glucosa dosis-dependiente y elevaban los

niveles séricos de insulina hasta 2.08 veces a los 60 min. Al evaluar el efecto *in vitro* del extracto sobre la liberación de insulina se evidenció que aumentaban considerablemente la concentración de esta hormona de manera independiente a la glucosa y los autores plantearon la activación del canal de calcio tipo L, por los sistemas PKA / PKC y exocitosis de insulina ligada a la proteína G, aunque también parcialmente el cierre de los canales de ATP-K en las células beta del páncreas como los mecanismos bioquímicos de la actividad. Los autores también evaluaron el impacto del uso del extracto de *Lupinus mutabilis* a largo plazo por 20 días, observando que la glucosa post-prandial fue reducida, la HbA1c se redujo de 8.4 ± 0.8 a 5.9 ± 0.3 % y la insulina sérica se elevó 2.4 veces respecto al valor inicial.

El contenido proteico de tarwi es elevado, encontrándose entre 39 a 52%, las cuales tienen un balance óptimo de aminoácidos esenciales, y se le conoce como la soya andina. El consumo de la semilla y la hidrólisis de estas proteínas también ha mostrado un efecto beneficioso en el manejo de la diabetes mellitus, tal como se evidencia en una investigación realizada sobre hidrolizados de la fracción γ -conglutina y del aislado proteico completo de chocho, donde se demostró que el hidrolizado de conglutina presentó el 100% de inhibición de la DPP-IV similar a la sitagliptina a una concentración de 5 mg/mL y 0.2 mM, respectivamente. La evaluación *in vitro* de la captación de glucosa de adipocitos usando un cultivo celular dual de Caco-2/3T3L1 mostró que los hidrolizados incrementaron el transporte intracelular de glucosa con consumos entre 5 y 15 mM de glucosa/mg de proteína, este efecto fue relacionado al incremento de la translocación del transportador GLUT-4; por otro lado, los hidrolizados de tarwi demostraron un efecto inhibitorio de la gluconeogénesis en células hepáticas usando el cultivo celular dual Caco2/HepG2 con efectos similares al patrón metformina reduciendo alrededor del 50% la producción de glucosa (27).

Se ha descrito que el consumo regular de leguminosas ricas en proteínas como *Lupinus mutabilis*, disminuye las concentraciones de glucosa e insulina en animales y humanos. Baldeon *et al* (45), reportaron los resultados de un

estudio clínico realizado para evaluar la eficacia de *L. mutabilis* cocido en las concentraciones de glucosa e insulina sanguíneas en voluntarios con DM2, reportando que el consumo de tarwi cocido disminuyó sus concentraciones.

Fornasini *et al* (46) realizaron un estudio similar para analizar el efecto de *Lupinus mutabilis* sobre los niveles de glucosa e insulina en la sangre de sujetos normales y con disglucemia. Los autores evidenciaron que el consumo de tarwi disminuyó significativamente los niveles de glucosa e insulina, en sujetos con disglucemia (glucosa en ayunas > 100 mg/dL). En el grupo que consumió soya en las mismas condiciones no observaron ningún efecto; estos datos evidencian que el consumo de tarwi podría ser una alternativa factible y de bajo costo para el tratamiento de la diabetes.

Otro estudio cuasi-experimental de diseño cruzado de 51 pacientes entre 35 y 88 años con diabetes mellitus en un seguimiento por 28 semanas realizado por Fornasini *et al* (47), en el cual las primeras 14 semanas mantuvieron solo su tratamiento antidiabético y las otras 14 semanas adicional a su medicación recibieron un snack a base de *Lupinus mutabilis* mostraron la reducción del índice de masa corporal de 30.3 ± 4.5 a 29.9 ± 4.4 kg/m²; también impactó positivamente en el nivel de colesterol HDL que aumentó de 43.9 ± 11.3 a 46.3 ± 11.3 mg/dL y los niveles de A1C en pacientes que iniciaron el estudio con un porcentaje menor o igual a 8% redujeron su porcentaje entre 0.2 y 0.4%. Adicionalmente, a los indicadores descritos el consumo de snacks de tarwi atenuo los incrementos de glucosa desde el inicio de la intervención y hubo un incremento de la insulina sérica obteniendo valores de 13.3 ± 9.5 y 18.3 ± 17.6 mg/dL al inicio del estudio y al finalizar la intervención, respectivamente.

De acuerdo con lo descrito, es evidente el creciente el interés por determinar mecanismos beneficiosos en la prevención y tratamiento de la diabetes, pero los estudios realizados en *Lupinus mutabilis* son reducidos en comparación con el resto de leguminosas, por esta razón el presente estudio busca brindar oportunidades a este cultivo subutilizado identificando el potencial inhibitorio de la DPP-IV por las fracciones peptídicas de tarwi.

II.3. BASES TEÓRICAS

A. Potencial antidiabético de péptidos inhibidores de la DPP-IV

La DPP-IV es la serín proteasa que reduce drásticamente el tiempo de acción de las incretinas por lo que su inhibición permite un control de los niveles de glucosa. En este sentido, las gliptinas son un grupo de medicamentos que buscan inhibir la DPP-IV (Tabla 7) que presentan ventajas sobre los hipoglucemiantes tradicionales; sin embargo, algunos efectos adversos graves y su costo elevado han incrementado el interés de la búsqueda de péptidos inhibidores con la misma actividad por ser altamente efectivos, más seguros, baratos y fáciles de obtener (6,7,11,16).

Tabla 7. Inhibidores de la DPP-IV comercializados.

Traducido de "A comprehensive review and perspective on natural sources as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for management of diabetes" de Shaikh et al (6).

Nº	INHIBIDOR DE LA DPP-IV	NOMBRE DE MARCA	AÑO DE APROBACIÓN
1	Sitagliptina	Januvia	2006
2	Vlidadagliptina	Galvus	2007
3	Saxagliptina	Onglyza	2009
4	Alogliptina	Nesina y Vipidia	2010
5	Linagliptina	Tradjenta, Trajenta	2011
6	Anagliptina	Suiny	2012
7	Gemigliptina	Zemiglo	2012
8	Tenegliptina	Tenelia	2012
9	Evogliptina	Suganon	2015
10	Omarigliptina	Marizev	2015
11	Trelagliptina	Zafatek	2015
12	Gosogliptina	Satyor	2016

Algunos péptidos con actividad inhibitoria de la DPP-IV demostrada se muestran en la Tabla 8, siendo el péptido IPI (Ile-Pro-Ile) obtenida de κ - caseína quien tiene la mayor actividad con un IC_{50} de 5 μ M.

Tabla 8. Péptidos inhibidores de la DPP-IV descubiertos entre el 2016 y 2018.

Traducido de "Discovery of food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: A review" de Liu, Cheng y Wu (7).

FUENTE	SECUENCIA	IC ₅₀ (μ M)
Análogos de Ile-Pro-Ile (IPI)	APA	43.3
	APF	65.8
	APR	119.7
	IPA	28.3
	KPA	74.5
	FPF	247
	FPI	45.2
	FPW	54.9
Análogos de Ile-Pro-Ile (IPI)	IPF	47.3
	IPW	175.3
	WPF	159.8
	WPT	133
	WPW	120.1
Glicinina de soya	IAVPTGA	106
β -conglutina de semilla de Lupino	LTFPGSAED	228
Dioscorin de camote	RRDY	930
	IHF	3770
	KRIHF	4110
	RL	1200
	GPA	2870
	MGSF	2120
	DPF	1540
β -caseína de proteína de leche	LPVPQ	43.8
	VPGEIVE	224.5
	YFPGP	749.2
	LPQNIPPLT	205.2
	IPPLTQT	465.1
	TPVVVPP	1408.9

Tabla 8. (continuación)

FUENTE	SECUENCIA	IC ₅₀ (μ M)
β -caseína de proteína de leche	YPVEPF	124.7
	LPLPLL	371.5
	QPHQPLPPT	1754.8
	QPLPPT	1013.8
	IPPL	428.9
	LPP	563.3
	VP	380.3
	RP	657.2
	FP	682.5
	HP	902.8
Lactoferrina	IPM	69.5
	IPSK	406.8
Pez barbel	WSG	209.9
	FSD	275.1
Carpa plateada	LPIIDI	105.4
	APGPAGP	229.1
Krill antártico	KVEPLP	1071.9*
	PAL	2943.1*
Almeja manila	FAGDDAPR	168.7
	LAPSTM	140.8
	FAGDDAPRA	393.3
	FLMESH	>500
Gelatina de salmón	GGPAGPAV	8139.1
	GPVA	264.7
	PP	4343.5
	GF	1547.1
β -lactoglobulina	NLGIILR	86.3
	TQMVDEEIMELFR	68.8
Gluten de trigo	QPQ	79.8
	QPG	70.9
	QPF	71.7
	LPQ	56.7
	SPQ	78.9

Tabla 8. (continuación)

FUENTE	SECUENCIA	IC ₅₀ (μ M)
Leche de camello	ILDKEGIDY	347.8
	ILDKVGIQY	321.5
	ILELA	721.1
	LLQLEAIR	177.8
	LPVP	87.0
	MPVQA	93.3
	MPVQA	214.1
	YPVEPF	138.0
Soya fermentada	KL	159.8*
	LR	2083.6*
Sintética	YPL	364.6
	YPG	174.0
Salmón Atlántico	GPAV	245.6
	FF	546.8
	VC	5413.4
Globulina	LQAFEPLR	103.5

* El valor de IC₅₀ (μ M) fue convertido a partir de mg/mL

B. Potencial terapéutico de péptidos bioactivos del género *Lupinus* sobre la diabetes

Entre las leguminosas el género *Lupinus* ha demostrado un elevado potencial bioactivo de sus hidrolizados proteicos evidenciando actividades como la antioxidante, antihipertensiva, inmunomodulador, etc.; con diversos mecanismos bioquímicos asociados (Figura 6).

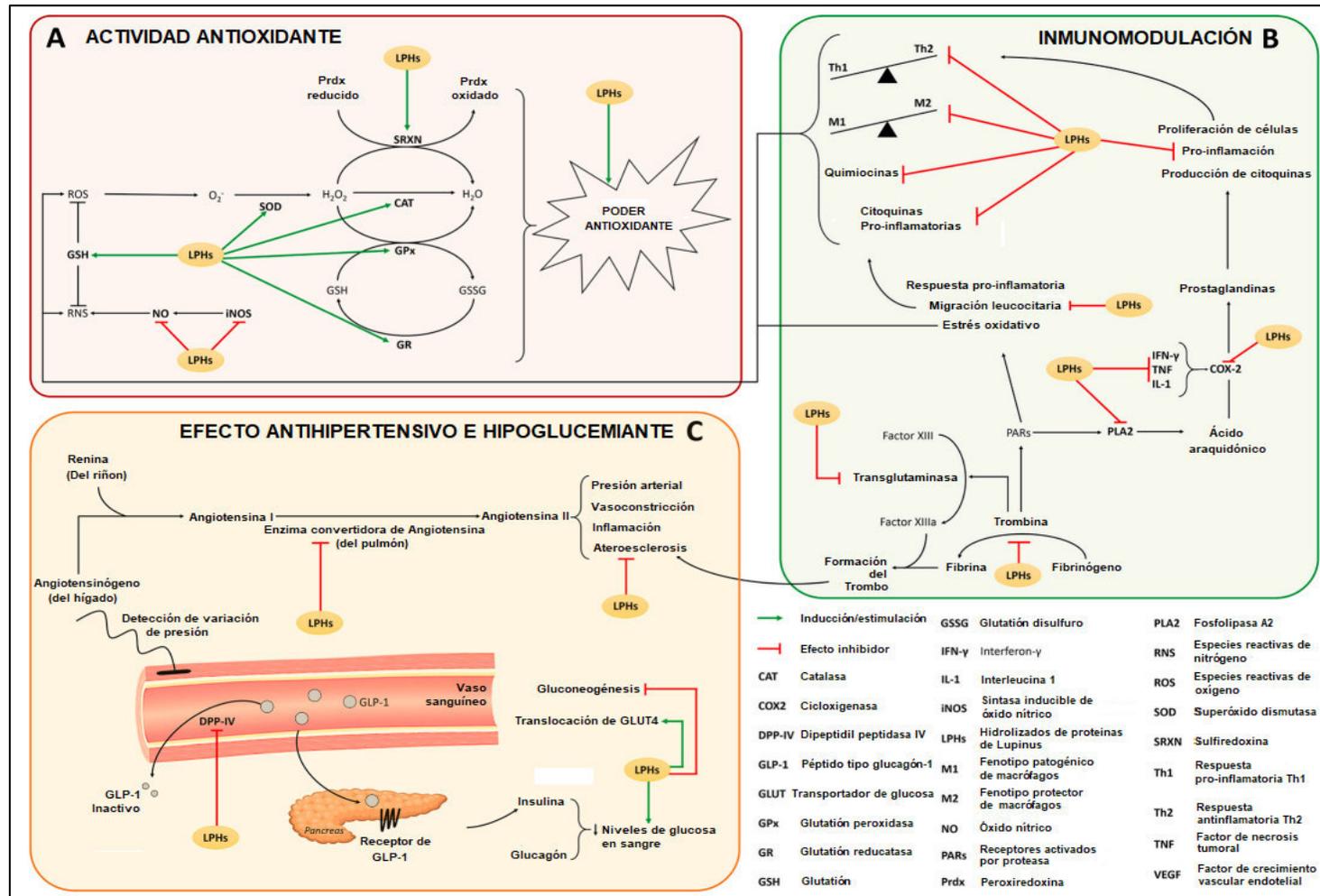


Figura 6. Representación esquemática de los diferentes efectos antioxidante (A), inmunomodulador (B) e hipoglucémico (C) ejercidos por los hidrolizados proteicos de Lupinus (LPHs).

Traducido de "Pleiotropic biological effects of Lupinus spp. protein hydrolysates" de Cruz-Chamorro et al (22).

La Tabla 9 describe el efecto beneficioso de los hidrolizados del género *Lupinus* en ensayos *in vitro* e *in vivo*, evidenciando el potencial uso de sus péptidos dentro del manejo de diabetes.

Tabla 9. Resumen de hidrolizados proteicos del género *Lupinus* con efecto antidiabético.

FUENTE	HIDROLIZADO CON	EFFECTO ANTIDIABÉTICO
<i>Lupinus albus</i>	Pepsina	Inhibe la DPP-IV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (22)
	Alcalasa, tripsina y flavourzima	Inhibe la DPP-IV (22)
	Alcalasa y flavourzima	Reducen los niveles plasmáticos y renales de glucosa en ratas Wistar hipercolesterolémicas (22)
γ -conglutina de <i>Lupinus angostifolius</i>	Pepsina y pancreatina	Inhibe la DPP-IV, aumenta la captación de glucosa y aumenta la síntesis de glucógeno (24)
<i>Lupinus mutabilis</i>	Alcalasa neutrasa y flavourzima	Inhibe la DPP-IV (48)
γ -conglutina de <i>Lupinus mutabilis</i>	Pepsina y pancreatina	Inhiben la DPP-IV, aumenta la translocación de GLUT-4 y reduce la gluconeogénesis (27)

Tomando en consideración el limitado alcance actual sobre el control glicémico del género *Lupinus* y en particular del tarwi se desarrolla la presente investigación sobre la evaluación del efecto inhibitor de la DPP-IV de las fracciones peptídicas de *Lupinus mutabilis*.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. HIPÓTESIS

Las fracciones peptídicas de *Lupinus mutabilis* tienen efecto inhibitorio de la enzima dipeptidil peptidasa IV.

III.2. VARIABLES

A. Variable independiente

Fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis*.

B. Variable dependiente

Actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV.

III.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE(S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
Fraciones peptídicas de <i>Lupinus mutabilis</i>	Independiente	Se obtienen producto de la hidrólisis enzimática del concentrado proteico utilizando diferentes enzimas. Se hidrolizan las proteínas de alto peso molecular liberando péptidos que podrían ejercer diferentes actividades biológicas.	Las fracciones peptídicas obtenidas luego de la ultrafiltración del hidrolizado proteico de semillas de <i>L. mutabilis</i> utilizando membranas de 3 y 10 kDa	Contenido proteico en el concentrado proteico	Contenido proteico	mg prot/mL
				Hidrólisis enzimática	Contenido proteico Grado de hidrólisis	mg prot/mL % de hidrólisis
				Fraciones peptídicas	Contenido proteico Perfil electroforético	mg prot/mL Bandas de proteínas
Actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV de las fracciones peptídicas de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i>	Dependiente	La inhibición de la enzima DPP-IV busca prolongar el efecto de las incretinas péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) y polipéptido inhibidor de glucosa (GIP) que tienen un efecto insulínico favoreciendo el control glicémico.	El efecto antidiabético será evaluado en base al % de inhibición de la enzima DPP-IV	% de inhibición de DPP-IV de cada una de las fracciones peptídicas	Inhibición de la enzima DPP-IV	IC ₅₀ % inhibición

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Obtención de la harina de *Lupinus mutabilis*

Se seleccionaron semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) en buen estado de la cosecha local de agosto del 2022 en la ciudad de Huamachuco (7°48'43"S 78°02'55"O), provincia Sánchez Carrión en el departamento de La Libertad.

Para continuar el proceso es necesario someter las semillas a un tratamiento previo de deslupinizado y deslipidizado con el objetivo de optimizar la extracción de proteínas solubles, donde el primer tratamiento separa los alcaloides de la semilla (principalmente la lupinina) y el segundo tratamiento separa los lípidos contenidos en las semillas.

Deslupinización

Se inició hidratando con agua destilada las semillas seleccionadas en una proporción 1/6 (p/v) por 16 h, a continuación fueron llevadas a ebullición por 1 h con un recambio de agua a la mitad del proceso. Luego, las semillas se lavaron a temperatura ambiente a una proporción 1/5 (p/v) por 3 días cambiando el agua de lavado cada 6 h para finalmente ser secadas a 42°C hasta obtener un peso invariable (30).

Deslipidización

Las semillas previamente deslupinizadas se colocaron en una prensadora manual para iniciar la extracción de los lípidos, a continuación se redujo el tamaño de partícula utilizando un molino manual. La harina obtenida fue desgrasada con etanol absoluto en una relación harina/solvente de 1/4 (p/v) con agitación durante 3 h, luego se centrifugó por 10 min a 5000 g a una temperatura de 20°C. Este proceso fue repetido 5 veces más en el precipitado, al finalizar el último ciclo el residuo fue sometido a filtración y secado a 42 °C en una estufa hasta obtener un peso invariable. Para finalizar la harina fue cernida a través de un tamiz de malla #60 (30).

IV.2. Obtención del concentrado proteico (CP) de tarwi

El método utilizado para la obtención del concentrado proteico fue el reportado por Serrano (18) con modificaciones. Se preparó una suspensión harina/agua destilada en una proporción 1/25 (p/v) y se dejó hidratar por 30 min. Luego, se adicionó NaOH 1N para ajustar el pH a un valor de 10. La homogeneización fue realizada en una licuadora por 3 min, donde al reducir el tamaño de partícula se favoreció la obtención de proteínas al aumentar la superficie de área de contacto con el solvente. A continuación la suspensión se filtró a través de tamices de malla #80 y malla #100 para separar la fibra.

El residuo que no atravesó la malla fue lavado con agua destilada en proporción 1/3 (p/v) acumulando el total de solución filtrada la cual fue dejada en reposo a temperatura ambiente por 1 h con el objetivo que el almidón se decantara. El sobrenadante que contenía la proteína se vertió sobre un vaso de precipitados limpio donde se adicionó HCl 1N hasta llevar la solución al punto isoeléctrico (pH 4.5), la solución fue centrifugada a 4°C por 1317 g en 12 min. El precipitado que contenía las proteínas fue liofilizado a -47°C y 0.004 mbares y el CP fue almacenado a -20°C hasta que fue usado.

IV.3. Hidrólisis enzimática del CP de tarwi

Hidrólisis Pepsina-Pancreatina-Alcalasa (HPPA)

Se hidrolizó enzimáticamente el CP de tarwi simulando un sistema *in vitro* de digestibilidad utilizando secuencialmente pepsina (0.7 FIP-U/mg a pH 2 por 30 min) y pancreatina (0.35 FIP-U/mg a pH 7.8 por 60 min) en una proporción enzima/sustrato de 1/50 (v/v).

Para determinar la cantidad de proteína no digerida por las enzimas se utilizó el método de Bradford. Finalizado el tratamiento con pepsina y pancreatina se utilizó la enzima alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis* con actividad específica de 2.4 UA/g) a pH 8.5 por 15, 30, 60 y 138 min en una proporción enzima/sustrato de 1.87 (%p/p). La reacción de hidrólisis se detuvo llevando la mezcla a 100°C por 10 min. El hidrolizado de pepsina,

pancreatina y alcalasa (HPPA) fue centrifugado a 10 000 g por 10 min y conservado a -20°C hasta que fue usado (30).

La formula para calcular el porcentaje de digestibilidad de la proteína *in vitro* fue:

$$\%DPIV = \frac{[] \text{ Proteína Inicial} - [] \text{ Proteína No Digerida}}{[] \text{ Proteína Inicial}}$$

Grado de hidrólisis (GH)

Se utilizó el método reportado por Nielsen *et al* (2001) con algunas modificaciones determinando la cantidad de grupos aminos libres que reaccionan con el OPA. Para valorar la cantidad de grupos aminos totales (h_{total}) del CP se realizó por hidrólisis ácida usando HCl 6N con 0.1% de fenol a 15 psi y 121°C por 60 min en un equipo Reacti-Term. Los valores obtenidos se plotearon una curva de calibración de L-Serina de concentraciones entre 0 y 0.1 mg/mL y se expresaron como % del GH (49).

IV.4. Obtención de fracciones peptídicas por ultrafiltración

Para este proceso se vertió 15 mL del HPPA a una concentración no mayor de 1 mg/mL en una membrana filtrante de corte de 10 kDa, luego, se centrifugó a 20°C por 60 min a 5 000 g. El permeado obtenido fue adicionado sobre una membrana filtrante de 3 kDa y se sometió al mismo proceso de centrifugado. Finalizado el proceso se obtuvieron 3 fracciones: UF1 (peso molecular mayor a 10 kDa, UF2 (peso molecular entre 3 y 10 kDa) y UF3 (peso molecular menor a 3 kDa), las cuales fueron liofilizadas para análisis posteriores.

IV.5. Electroforesis en SDS-PAGE

Se utilizó la electroforesis en SDS-PAGE para visualizar la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular. El CP, HPPA, UF1, UF2 y UF3 se resuspendieron en solución Tris-HCl 100 mM de pH 8.8. Se utilizarón 10 µg de proteína en condiciones reductoras (β-mercaptoetanol) y como marcador de peso molecular se emplearon 2 µL de Thermo Pierce #26616.

Las proteínas se separaron en una cámara de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de grosor por 45 min a 200 V. Las proteínas separadas se tincionaron en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol al 45% y ácido acético glacial al 45% en agitación suave por 60 min, al finalizar se decoloró el gel sumergiendolo en una solución de ácido acético glacial al 10% y metanol al 10% en agitación por 12 h. Las proteínas fueron fotodocumentadas y analizadas en el software ImageJ (50).

IV.6. Inhibición de la Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV)

Para evaluar el efecto inhibitorio del CP, HPPA, UF1, UF2 y UF3 obtenidos sobre la DPP-IV, responsable de la degradación de incretinas (hormonas que favorecen la secreción de insulina al nivel del páncreas) se utilizó el método reportado por Caron *et al* (51) el cual se basa en la escisión del sustrato análogo de la DPP-IV (Gli-Pro-AMC) para producir el producto fluorescente 7-amino-4-metil cumarina ($\lambda_{ex} = 360$ / $\lambda_{em} = 460$ nm), proporcional a la actividad enzimática presente. La efectividad de los inhibidores de prueba se comparó con el inhibidor DPP-IV (sitagliptina).

Se determinó la concentración de CP, HPPA, UF1, UF2 y UF3 en mg/mL para producir una inhibición del 50% de la DPP-IV (IC_{50}) a partir de la ecuación de la recta ($Y = mx + b$) de acuerdo a:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

Donde:

“**b**”: es el término independiente de la ecuación de la recta (ordenada al origen)

“**m**”: la pendiente de la recta (tangente del ángulo formado por la recta y el eje de las abscisas)

IV.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresarán como la media \pm error estándar. Se realizará análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Newman-Keuls de comparación múltiple. Se considerarán significativos valores de $p < 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizará el programa informático SigmaPlot 11.0.

V. RESULTADOS

V.1. Obtención del concentrado proteico

Las semillas de *Lupinus mutabilis* recolectadas tras el proceso de deslupinización, deslipidización y obtención del concentrado proteico generaron bandas de mayor intensidad de tamaños aproximados de 30, 35, 40, 45, 50 y 60 kDa en el perfil electroforético (Figura 7).

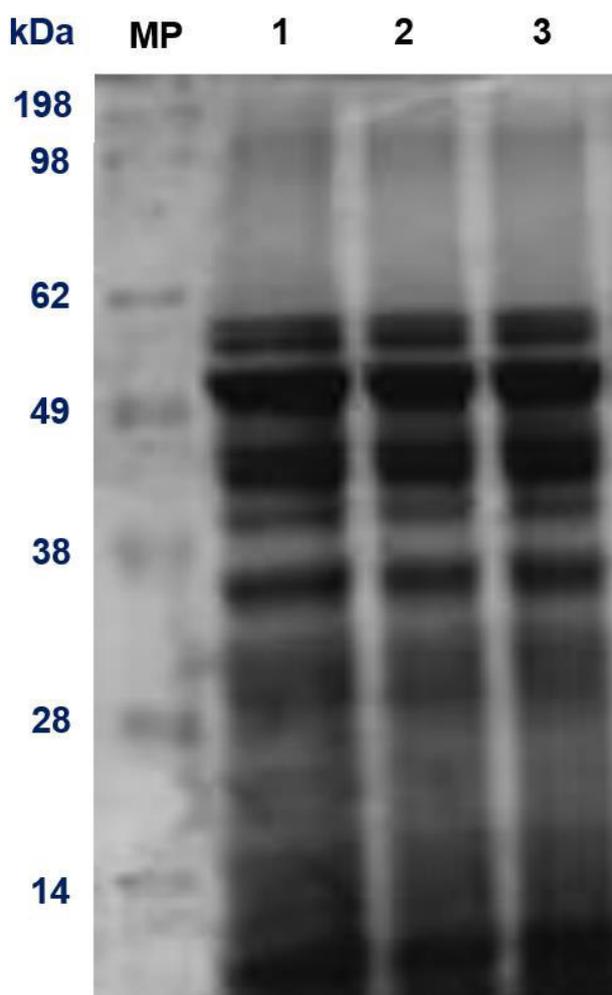


Figura 7. Perfil electroforético de las proteínas presentes en el CP de *Lupinus mutabilis*.

MP: Marcador de peso molecular en kDa y **1-2-3:** Perfiles de 3 extracciones independientes.

V.2. Hidrólisis enzimática del CP

Al finalizar cada etapa del proceso de hidrólisis secuencial del CP de tarwi con las enzimas pepsina (HP), pancreatina (HPP) y alcalasa (HPPA) se obtuvieron los hidrolizados respectivos. El perfil electroforético de éstas se muestra en la Figura 8 donde se evidencia una reducción progresiva del peso molecular de las proteínas a medida que la hidrólisis transcurre hasta no evidenciarse bandas definidas al finalizar el proceso.

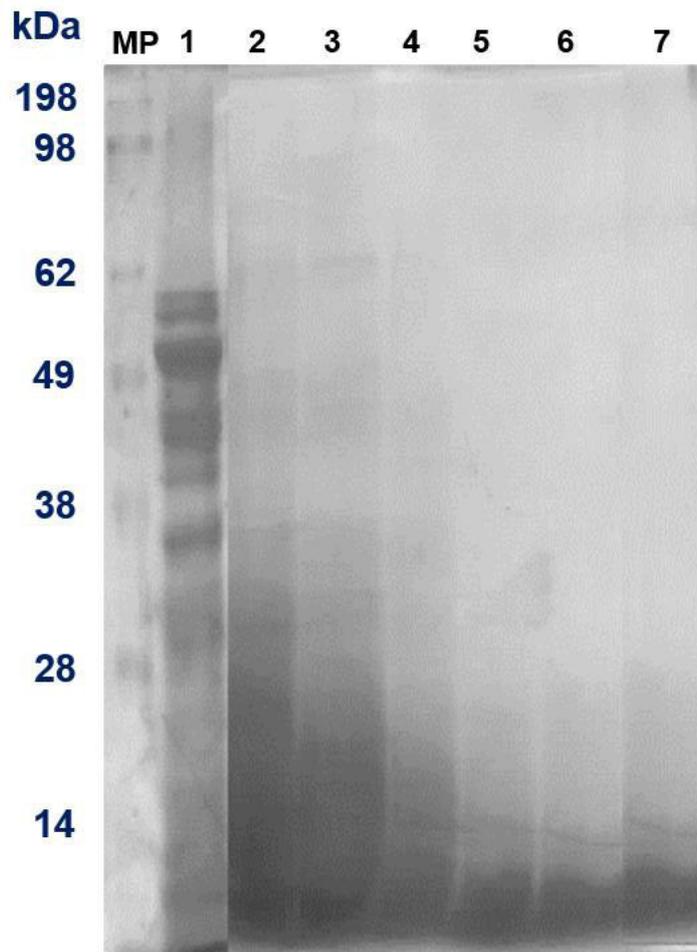


Figura 8. Perfil electroforético de la hidrólisis secuencial del CP de *Lupinus mutabilis*.

MP: Marcador de peso molecular en kDa, **1:** Concentrado proteico (CP), **2:** Hidrolizado proteico obtenido con Pepsina (HP), **3:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina y pancreatina (HPP), **4:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (15 min) (HPPA15), **5:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (30 min) (HPPA30), **6:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (60 min) (HPPA 60) y **7:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (138 min) (HPPA138).

V.3. Grado de hidrólisis y digestibilidad de las proteínas

Los resultados del porcentaje de grado de hidrólisis y digestibilidad de las muestras obtenidas al finalizar cada etapa del proceso de hidrólisis secuencial del CP de tarwi se muestran en la Tabla 10 donde se observa un incremento del grado de hidrólisis de un $3.88 \pm 0.47\%$ en el concentrado proteico hasta un valor máximo de $46.12 \pm 2.77\%$ al finalizar los 138 min de hidrólisis con alcalasa, por otro lado los valores de digestibilidad proteica *in vitro* superan el 90% después del tratamiento con pancreatina con un valor máximo de $99.66 \pm 0.15\%$ al finalizar la hidrólisis con alcalasa. La evolución de la concentración de proteínas se muestra en la Figura 9 donde se observa una marcada reducción de las proteínas tras el tratamiento enzimático disminuyendo la concentración de proteínas inicial (32.5 mg/mL) en más del 99% hasta el valor mínimo de 0.15 mg/mL tras el tratamiento con pepsina, pancreatina y alcalasa.

Tabla 10. Digestibilidad proteica *in vitro* del CP de tarwi y el GH determinado a lo largo de la hidrólisis secuencial con diferentes enzimas proteolíticas

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (mg/mL)	DPIV (%)	GRADO DE HIDRÓLISIS (%)
CP	32.5	-	3.88 ± 0.47
HP	20.67	34.43 ± 2.79	10.00 ± 2.07
HPP	2.84	90.69 ± 0.81	17.99 ± 4.01
HPPA15	0.26	99.33 ± 0.19	35.56 ± 1.26
HPPA30	0.26	99.36 ± 0.25	38.46 ± 2.07
HPPA60	0.34	99.29 ± 0.49	40.81 ± 0.16
HPPA138	0.15	99.66 ± 0.15	46.12 ± 2.77

DPIV: Digestibilidad proteica *in vitro*, **CP:** Concentrado proteico de *Lupinus mutabilis*, **HP:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, **HPP:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina y pancreatina, **HPPA15:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (15 min), **HPPA30:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (30 min), **HPPA60:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (60 min) y **HPPA138:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (138 min).

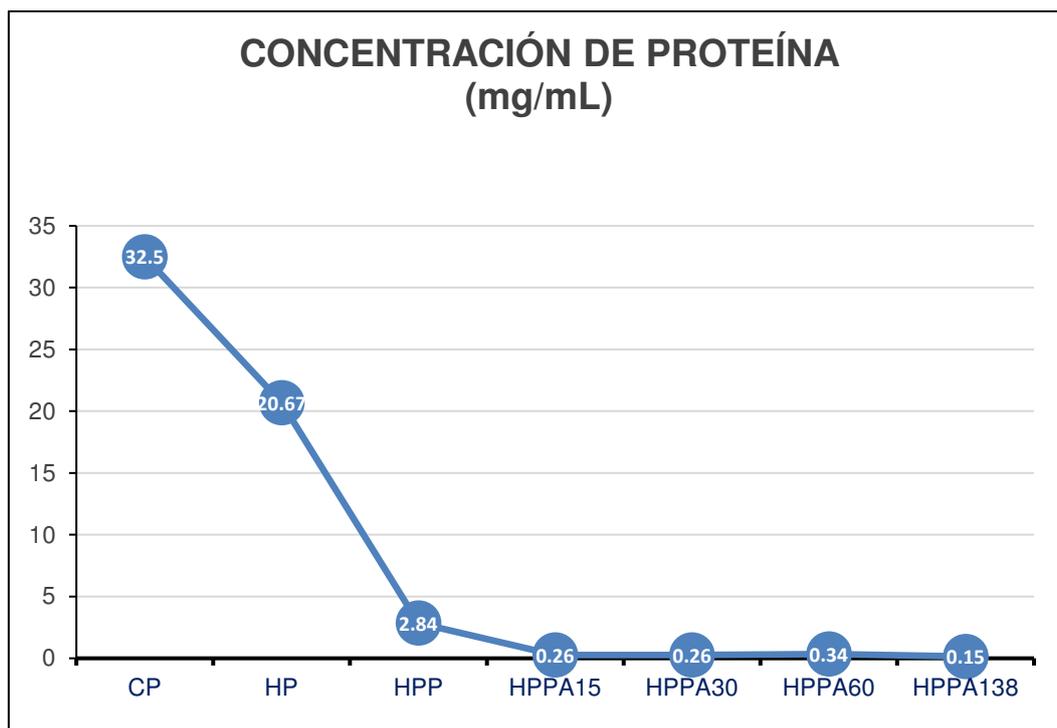


Figura 9. Evolución de la concentración de proteína durante la hidrólisis secuencial del CP de *Lupinus mutabilis*.

CP: Concentrado proteico de *Lupinus mutabilis*, **HP:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, **HPP:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina y pancreatina, **HPPA:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (15 min), **HPPA30:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (30 min), **HPPA60:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (60 min) y **HPPA138:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa (138 min).

V.4. Inhibición de la dipeptidil peptidasa IV

El IC₅₀ de inhibición de la DPP-IV en las fracciones peptídicas, hidrolizado pepsina-pancreatina-alcalasa y concentrado proteico se muestran en la Tabla 11. El concentrado proteico no presentó actividad inhibitoria de la DPP-IV, mientras que el mejor efecto inhibitorio de la DPP-IV se observó en la fracción peptídica menor a 3 kDa (UF3) con un IC₅₀ de 0.06 ± 0.00 mg péptido/mL

Tabla 11. Actividad inhibitoria de la DPP-IV (IC₅₀) en el tarwi.

MUESTRA	INHIBICIÓN DE LA DPP-IV (IC ₅₀) mg péptido/mL
CP	No detectada
HPPA	0.41 ± 0.03
UF1	0.18 ± 0.02*
UF2	0.14 ± 0.02*
UF3	0.06 ± 0.00*

CP: Concentrado proteico, **HPPA:** Hidrolizado proteico obtenido con pepsina, pancreatina y alcalasa, **UF1:** Fracción peptídica mayor a 10 kDa, **UF2:** Fracción peptídica entre 3 y 10 kDa y **UF3:** Fracción peptídica menor a 3 kDa.

* p<0.05 frente a HPPA (Test Student-Newman-Keuls)

VI. DISCUSIÓN

La DM2 es una enfermedad que se caracteriza por la desregulación de los niveles de glucosa que se ha convertido en uno de los problemas de salud de mayor crecimiento del siglo, superando el 2021 los 500 millones de pacientes y generando gastos de cientos de billones de dolares a nivel mundial (4,6). El impacto generado por ésta enfermedad crónica no transmisible ha motivado la búsqueda de compuestos terapéuticos alternativos de origen natural para ser usados dentro del esquema de tratamiento complementario y de prevención de complicaciones en diversos estudios (18-24,38-41,51-56).

Entre las fuentes de origen vegetal las leguminosas y en particular las proteínas del género *Lupinus* vienen siendo ampliamente estudiadas por su gran calidad proteica, contenido en fibra y minerales. También, los péptidos obtenidos a partir de estas semillas han mostrado actividades que podrían ser beneficiosas para el manejo de la diabetes (9,16,25,26,48).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad inhibidora de enzima DPP-IV de fracciones peptídicas de semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi). El proceso de obtención del concentrado proteico inició con la etapa del deslupinizado donde se extraen los alcaloides quinolizidínicos presentes en la semilla, principalmente lupanina, D-lupanina, esparteína, 3-hidroxilupanina y 13-hidroxilupanina, los cuales son tóxicos y le brindan un sabor amargo al consumirlos (31,47). A continuación, el proceso continuó con el deslipidizado asegurando de este modo el incremento del porcentaje de proteínas del residuo y también la reducción de compuestos no polares que se unen a los residuos aminoacídicos que dificultan la extracción posterior de las proteínas (57). Teniendo en consideración que el contenido de lípidos de la semilla desamargada es de alrededor de 20.44%, se incrementa la importancia de esta etapa previa a la obtención del concentrado proteico (31). Estudios previos realizados con el tarwi reportaron el uso de etanol, éter de petróleo y n-hexano para esta etapa, donde éstos

dos últimos solventes fueron usados con mayor frecuencia, sin embargo, se optó por el uso del etanol por ser más económico y amigable con el ambiente, considerando también lo reportado por Intiquilla (30) donde no se encontraron diferencias en los perfiles proteicos obtenidos de semillas desengrasadas con un solvente más apolar como n-heptano (27,48,52,58-61).

La harina deslupinizada y deslipidizada fue utilizada para la obtención del concentrado proteico usando la solubilización alcalina y posterior precipitación en el punto isoeléctrico con lo que se obtuvo un porcentaje de proteínas de 80.17%, similar al valor de 76.74% y 78.04% reportado por Intiquilla (30) y Aguilar-Acosta (62). Por otro lado, en algunas investigaciones con *Lupinus mutabilis* obtuvieron menores rendimientos al obtenido con el presente estudio como lo reportado por Acuña y Caiza (63) que obtuvieron un valor de porcentaje de proteínas del 72.2%, así como Curti *et al* (52) que obtuvieron un porcentaje de 69.36%, las diferencias se encontrarían en el método de obtención del concentrado proteico utilizado, ya que en la primera referencia no se realizó el proceso de deslipidizado ni deslupinizado lo que pudo afectar en el rendimiento final, mientras que en el caso de la segunda referencia se realizó el proceso de extracción a pH neutro en lugar de un valor alcalino, donde se presenta mayor solubilidad de las proteínas.

Otros estudios realizados con tarwi donde se realizó un tamizado previo al deslipidizado generaron porcentajes de proteínas de 75.9% y 89.2% para el concentrado proteico, esto sería debido al aumento de la superficie de contacto con el solvente que extrae los lípidos favoreciendo así el aumento de proteínas del residuo, cabe mencionar que en el segundo caso se obtuvo un porcentaje elevado a pesar de que solo se usó agua para la extracción, sin embargo, el material base fue semillas sin cáscara lo cual afectaría el peso sobre el cual se calcula el porcentaje de proteínas (48,59).

Otras leguminosas también han mostrado elevados porcentajes en sus extracciones de proteínas, por ejemplo Ruiz-Lopez *et al* (64) mencionan en su revisión que se han reportado aislados proteicos de *Lupinus campestris* (93.2%), *Lupinus exaltatus* (95%) y *Lupinus elegans* (95%), así también Embaby, Swailam y Rayan (65) obtuvieron un rendimiento de 91.8% en el aislado proteico de *Acacia tortilis* (Forssk.) todos estos con valores que superan el 90% de rendimiento a pesar de que el contenido proteico en el análisis proximal de las semillas de las especies mencionadas se encuentran entre 32 a 45% lo cual es muy similar a lo reportado para el tarwi (40-50%) (48,66). La diferencia en el rendimiento de extracción, podría deberse a las condiciones de deslipidización, las características de las proteínas de cada especie, condiciones agronómicas del cultivo, al proceso de deslupinizado del tarwi, entre otras (61).

En estudios previos en *Lupinus mutabilis* reportan que el perfil proteico del CP comprenden proteínas de tamaños entre 10 y 58.92 kDa, donde el contenido principal son albúminas y globulinas (conglutinas α , β , γ y δ), mientras que las prolaminas y glutelinas también están presentes pero en muy baja cantidad, este rango de tamaños de proteínas también fue previamente observado por Intiquilla (30) y estos resultados concuerdan con los valores de peso molecular obtenidos en el perfil electroforético mostrado en la figura 7 con bandas de mayor intensidad en tamaños de 30, 35, 40, 45, 50 y 60 kDa (47). El mayor porcentaje de proteínas presentado en la figura 7 se encuentra a 50 kDa muy similar a lo encontrado por Gzubinski, Grygier y Siger (61), donde el 56.40% del total de proteínas extraídas correspondían a un peso molecular de 48.28 kDa.

El concentrado proteico obtenido de las semillas de tarwi fue sometido a un tratamiento de hidrólisis enzimática secuencial con el objeto de generar péptidos más fácilmente absorbibles que las proteínas intactas; usando primero la pepsina y pancreatina (mezcla enzimática de tripsina, quimiotripsina, elastasa, exopeptidasa A y exopeptidasa B) con el objetivo de mimetizar el medio gastrointestinal (29,48). Luego, se utilizó la enzima

alcalasa considerando el amplio uso de esta serín endopeptidasa en diversos estudios de obtención de hidrolizados con actividad biológica antidiabética y su gran afinidad por los residuos de ácido glutámico como sitio de corte, siendo este aminoácido reportado en mayor porcentaje (24.08%) en el concentrado proteico de *Lupinus mutabilis* obtenido por un método similar al del presente estudio (67).

En la figura 8 se evidencia que las bandas de proteínas de mayor peso molecular fueron disminuyendo su definición y nitidez a medida que la hidrólisis iba transcurriendo hasta no observarse bandas definidas al culminar el proceso. Este efecto se puede confirmar en la tabla 10 que muestra un incremento del grado de hidrólisis y por el contrario en la concentración de proteínas que se redujo en un 99.54% del valor original.

Así también la hidrólisis del concentrado proteico de tarwi se relaciona con el aumento del valor de la digestibilidad proteica in vitro (DPIV), donde se encontraron valores por encima del 90% tras la hidrólisis con pepsina y pancreatina, lo que evidencia la óptima disponibilidad de sus proteínas comparables con las de origen animal. Estudios previos de DPIV con diferente metodología obtuvieron valores similares para *Lupinus angustifolius* (87.6% y 86.3%), *Lupinus cosentinii* (89%), *Lupinus hispanicus* (88.5%), *Lupinus Luteus* (88.5%), *Lupinus Micranthus* (87.5%), que evidencia el potencial de las semillas de esta familia de leguminosas (68,69).

Por otro lado, un estudio realizado en arveja por Rieder *et al* (70) utilizando pepsina y pancreatina para el ensayo de DPIV reportaron un valor de 88% para un concentrado proteico que fue sometido a calentamiento durante la extracción (similar al tratamiento térmico del presente estudio durante el deslupinizado) y solo 69% cuando no fue sometido a este proceso. Esta diferencia sería ocasionada porque las leguminosas presentan inhibidores de la tripsina que son inactivados con calor y también debido a que la temperatura desnatura parcialmente las proteínas lo que favorece el corte enzimático (69).

En relación al grado de hidrólisis (GH) en la tabla 10, tras el tratamiento con pepsina se evidencia un valor de $10 \pm 2.07\%$, el cual es inferior al valor de $31.12 \pm 2.4\%$ de GH reportado por Kamran, Phillips, Harman y Reddy (28) para el hidrolizado de *Lupinus angostifolius* quienes usaron la misma enzima; probablemente debido al mayor tiempo de acción de la enzima (30 min adicionales) comparados con este estudio y que el porcentaje de proteínas del CP de *L. angostifolius* usado para la hidrólisis era del 95% superior al 80.17% usado en tarwi.

Se observó también que el GH tras la actividad de la pepsina y pancreatina en el CP de tarwi fue de 17.99% que es un valor similar al reportado por Tapadia *et al* (29) para *L. angostifolius* (aproximadamente 20%), en este estudio el concentrado proteico fue sometido a tratamiento con pepsina por 240 min y pancreatina por 240 min adicionales; donde se observa que tiempos más prolongados usando estas enzimas no tienen mayor impacto en el grado de hidrólisis de leguminosas.

Es importante mencionar que se han reportado diferencias notorias entre los grados de hidrólisis obtenidos entre legumbres, por ejemplo para *Lupinus angostifolius* y *Lupinus albus* donde a pesar de que en ambos casos se usó la enzima alcalasa bajo condiciones similares de temperatura y pH por un tiempo de 2 h se obtuvieron GH de 40.54% y 25%, respectivamente. Estas diferencias probablemente se generan por las características de la obtención del concentrado proteico, diferencias del perfil proteico entre especies (por ende de la afinidad con las enzimas) y condiciones agronómicas del cultivo que pueden afectar la expresión de ciertas proteínas (61,71,72).

El valor máximo de GH del presente estudio fue de 46.12% tras 138 min de actividad de la alcalasa, similar al valor de 45.33% reportado por Intiquilla (30) con el mismo esquema enzimático pero con el tiempo de acción de la alcalasa de 120 min; sin embargo se obtuvieron valores inferiores al 56.33% de GH reportado por Chirinos *et al* (48) en tarwi usando el esquema alcalasa

(60 min) y flavourzima (180 min) pero superiores al esquema alcalasa (60 min) y flavourzima (60 min) con un valor de GH de 40.16% del mismo estudio. Estos resultados resaltan la buena sinergia entre ambas enzimas debido a la afinidad de la flavourzima por los aminoácidos hidrofóbicos que libera la alcalasa tras realizar el corte enzimático.

Otro estudio realizado en tarwi utilizando la enzima Papaína por 10 min reportó un valor de GH de 9.12% y al someterlo secuencialmente a un tratamiento con flavourzima por 40 min el GH se elevó hasta 51.13%, valor superior al encontrado en el presente estudio (63). Por otro lado, para *Lupinus angostifolius* hidrolizado solo con flavourzima por 1 h generó un GH de $65.92 \pm 4.61\%$ también superior al valor obtenido para tarwi lo que confirma la gran afinidad de la flavourzima con las proteínas de tarwi y legumbres de la familia Lupinus, superando incluso a la enzima alcalasa que reconoce una gran cantidad de aminoácidos y es de amplio uso en investigación y al nivel industrial; pero, es importante mencionar que el porcentaje obtenido en nuestro estudio sugiere la presencia de péptidos de potencial bioactivo (63,67).

En las últimas décadas se ha evidenciado el potencial daño generado por la diabetes no controlada como neuropatías, nefropatías, daño visual, dificultad de cicatrización, pie diabético y enfermedades periodontales, por lo que diversos estudios se enfocan en el control y tratamiento de la diabetes. Una de las dianas terapéuticas abordadas con gran expectativa son los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que en la industria farmacéutica se les conoce como las gliptinas; sin embargo han mostrado efectos adversos preocupantes que incluyen insuficiencia hepática y falla cardíaca entre los más graves, lo que abre la posibilidad de usar fuentes naturales por ser de menor riesgo de efectos adversos, de bajo costo y con mayor accesibilidad para el ciudadano común (9,11).

Una serie de investigaciones demuestran que los metabolitos obtenidos de vegetales como alcaloides, flavonoides, terpenoides, fenoles, glicósidos y

péptidos (con especial interés en estos últimos) tienen efecto inhibitorio sobre la DPP-IV con impacto potencial beneficioso en la homeostasis de la glucosa (6,15,27). En este sentido la evaluación de la posible actividad hipoglicemiante de las fracciones peptídicas de tarwi fue usando el ensayo de inhibición de la DPP-IV, no encontrando actividad en el concentrado proteico; pero que tras la hidrólisis con pepsina, pancreatina y alcalasa (HPPA) presentó un IC_{50} de 0.41 ± 0.03 mg/mL que denota una actividad inhibitoria promisorio del tarwi, considerando otro estudio que utilizó las mismas enzimas en la leguminosa *Vigna unguiculata* obteniendo un valor menor de 0.58 mg/mL de IC_{50} (73). Otros estudios realizados en hidrolizados con pepsina y pancreatina de cereales y leguminosas tales como la cebada, trigo sarraceno, avena, quinua y frejol variante Navy mostraron valores de IC_{50} de 3.91 mg/mL, 1.98 mg/mL, 0.99 mg/mL, 0.23 ± 0.01 mg/mL y 0.093 mg/mL donde solamente el hidrolizado de frejol variante Navy y la quinua, presentaron inhibición superior a nuestra investigación debido probablemente al proceso hidrolítico pues en estos 2 estudios la muestra se sometió a 4 h de actividad enzimática favoreciendo así la liberación de péptidos bioactivos (6,9,15,67,74).

En adición estudios realizados en tarwi como el de Chirinos *et al* (48) reporta un IC_{50} de 3.21 ± 0.04 mg/mL al hidrolizar las proteínas con la enzima alcalasa por 120 min muy inferior al de nuestra investigación, por lo que la hidrólisis generada con las enzimas pepsina y pancreatina tendrían un impacto muy positivo sobre la actividad inhibitoria de la DPP-IV; sin embargo es importante acotar que un exceso de hidrólisis puede tener un efecto contraproducente en la actividad biológica tal como lo muestra este mismo estudio al usar alcalasa y flavourzima por 4 h con un GH superior al obtenido con nuestro HPPA, pero, que reporta un IC_{50} de 2.13 ± 0.02 mg/mL que es 4 veces menor al encontrado para nuestro hidrolizado de tarwi. En este sentido Rivero-Pino *et al* (16) también encontraron valores mucho menores al de nuestro estudio para 7 fuentes vegetales hidrolizadas por 7 h con las enzimas alcalasa, tripsina y flavourzima detectando valores de IC_{50} entre 2.68 ± 0.18 mg/mL y 5.41 ± 0.39 mg/mL.

Por otro lado, el uso de otras enzimas diferentes a las empleadas en nuestro estudio han evidenciado menor efectividad al generar péptidos con actividad inhibitoria de la DPP-IV, con valores de IC_{50} hasta más de 3 veces el encontrado para el HPPA como lo reportado en arroz (umamizima G), salvado de arroz (biopraxe SP), quinua (papaína) y maní mambara (termolisina) con IC_{50} de 1.45 ± 0.13 mg/mL, 2.3 ± 0.1 mg/mL, 0.88 ± 0.05 mg/mL y 1.733 mg/mL, respectivamente (6,11,15).

Es importante mencionar que las metodologías de mayor uso para optimizar el efecto bioactivo son el fraccionamiento cromatográfico o la ultrafiltración, para el HPPA usamos ésta última evidenciando un incremento muy notable en la actividad inhibitoria de la DPP-IV en la fracción con péptidos menores a 3 kDa (UF3) con un IC_{50} de 0.06 ± 0.00 mg/mL, este incremento derivado del fraccionamiento también ha sido reportado previamente por Bollati *et al* (25) que encontraron que la fracción menor a 3 kDa de los hidrolizados de soya y arveja tuvieron un IC_{50} de 0.82 ± 0.01 mg/mL y 1.00 ± 0.01 mg/mL así también por Patil *et al* (15) donde la fracción menor a 5kDa del hidrolizado de quinua presentó el mayor potencial inhibitorio de la DPP-IV con un IC_{50} de 0.31 ± 0.01 mg/mL y ambos estudios son consistentes con lo mencionado en una revisión realizada con Liu *et al* (7) donde el 80% de todos los péptidos que tenían actividad inhibitoria con IC_{50} menor a 1000 μ M pesaban menos de 0.5 kDa. Esto se debería a que la DPP-IV de acuerdo a la literatura posee entre 2 a 3 “bolsillos” (S1, S2 y S3) de interacción que presenta cierta afinidad por cierta característica de la cadena aminoacídica de los péptidos inhibidores; entre ellos sería el carácter hidrofóbico del aminoácido N-terminal que serviría para unirse al “Bolsillo” S1, tamaño de cadena entre 2 a 8 aminoácidos, con presencia de prolina, alanina, glicina o hidroxiprolina como P1 por su afinidad del sitio activo de corte de la DPP-IV (Ser, Asn e His) acompañado por Leu, Val, Phe, Ala o Gly, también es frecuente en péptidos inhibidores de la DPP-IV un aminoácido P2 de carácter hidrofóbico, básico o neutral con cadenas voluminosas como triptófano o tirosina, así como que P3 no debe ser prolina o hidroxiprolina; sin embargo esto no es

determinante ya que en algunos casos la mayor actividad inhibitoria de la DPP-IV no la presentó la fracción peptídica con menor peso molecular, tal como lo evidenciado en hidrolizados de arveja, soya, lupino, lenteja, quinua y papa donde la fracción entre 0.8 y 3 kDa presentó la mayor actividad con resultados de IC₅₀ entre 1.16 ± 0.04 y 2.09 ± 0.04 mg/mL; así también en el caso de hidrolizado de soya donde la fracción entre 5 a 10 kDa presentó la mayor actividad presentó un IC₅₀ de 0.91 ± 0.01 mg/mL muy superior al valor de 2.21 ± 0.15 mg/mL obtenido con la fracción menor a 5 kDa, esto sugiere que algunos péptidos de mayor tamaño de cadena podrían participar también en la inhibición de la DPP-IV evitando su formación dimérica activa, actuando sobre un sitio de unión secundario o impidiendo la unión de su sustrato al sitio activo (7,9,16,26,55). Todas las fracciones peptídicas del tarwi (UF1, UF2 y UF3) sugieren una potente actividad inhibitoria de la DPP-IV, donde la UF3 tiene una actividad superior a los valores reportados en otras fuentes vegetales, solamente inferior a la actividad reportada en péptidos purificados como lo reportado para KTYGL, IPI, IPA con IC₅₀ de 0.03 ± 0.01 mg/mL, 5 μ M 28.3 μ M, respectivamente (7,15).

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian un gran potencial de los hidrolizados de tarwi; sin embargo es necesario elucidar los péptidos de mayor actividad en la UF3 del hidrolizado, su biodisponibilidad, impacto *in vivo* y otros estudios relacionados. de este modo determinar su posible utilización dentro del manejo de la diabetes.

VII. CONCLUSIONES

- Se extrajeron las proteínas de *Lupinus mutabilis* (tarwi) a través de la solubilización de éstas en medio básico y posterior precipitación en medio ácido obteniendo un contenido proteico de 80.17%, que además correspondían con proteínas de pesos moleculares aproximados de 30, 35, 40, 45, 50 y 60 kDa de acuerdo con el perfil electroforético.
- La hidrólisis del concentrado proteico de tarwi, se realizó secuencialmente con pepsina, pancreatina y alcalasa obteniéndose por cada etapa el porcentaje de grado de hidrólisis de 10.00 ± 2.07 , 17.99 ± 4.01 y $46.12 \pm 2.77\%$, respectivamente.
- El hidrolizado final obtenido se sometió a ultrafiltración obteniendo tres fracciones peptídicas UF1 (peso molecular mayor a 10kDa), UF2 (peso molecular entre 3 y 10 kDa) y UF3 (peso molecular menor a 3kDa).
- Todas las fracciones peptídicas obtenidas UF1, UF2 y UF3 presentaron actividad inhibitoria sobre la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) con valores de IC_{50} de 0.18 ± 0.02 , 0.14 ± 0.02 y 0.06 ± 0.00 , respectivamente.
- La fracción UF3 con péptidos de menor tamaño fue la responsable de una potente actividad inhibitoria de la DPP-IV, por lo que podría ser empleado dentro del esquema terapéutico o complementario en la diabetes mellitus.

VIII. RECOMENDACIONES

- Purificar la UF3 que le atribuyen la potente actividad inhibitoria de la DPP-IV.
- Secuenciar los péptidos purificados que posean la mejor actividad inhibitoria de la DPP-IV y realizar estudios *in vivo* para validar el efecto.
- Favorecer la administración del péptido secuenciado por técnicas de nanoencapsulación, nanoemulsiones u otra similar.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Noncommunicable diseases progress monitor 2022. Geneva: WHO; 2022.
2. World Health Organization. Noncommunicable disease facility-based monitoring guidance: framework, indicators and application. Geneva: WHO; 2022.
3. World Health Organization. Toolkit for developing a multisectoral action plan for noncommunicable diseases. Overview. Geneva: WHO; 2022.
4. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021. [Citado el 07 de julio del 2023]. Disponible en: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>
5. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú: Enfermedades No transmisibles y Transmisibles (2022) [Internet]. Lima: INEI, 2023. [Citado el 07 de julio del 2023]. Disponible en: https://proyectos.inei.gob.pe/endes/2022/SALUD/ENFERMEDADES_ENDES_2022.pdf
6. Shaikh S, Lee EJ, Ahmad K, Ahmad SS, Lim JH, Choi I. A Comprehensive Review and Perspective on Natural Sources as Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for Management of Diabetes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14(591): 1-18. DOI: 10.3390/ph14060591.
7. Liu R, Cheng J, Wu H. Discovery of Food-derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A review. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(463): 1-22. DOI: 10.3390/ijms20030463.

8. American Diabetes Association. Standards of Care in Diabetes—2023 Volumen 46 Supplement 1 [Internet].USA: ADA; 2023. [Citado el 09 de julio del 2023]. Disponible en: https://diabetesjournals.org/care/issue/46/Supplement_1
9. Rahmi A, Arcot J. In Vitro Assessment Methods for Antidiabetic Peptides from Legumes: A Review. *Foods*. 2023; 12(631): 1-52. DOI: 10.3390/foods12030631.
10. Aylwin C. Nuevos fármacos en diabetes mellitus. *Rev Med Clin Condes*. 2016; 27(2): 235-256. DOI: 10.1016/j.rmclc.2016.04.013
11. Turdu G, Gao H, Jiang Y, Kabas M. Plant dipeptidyl peptidase-IV inhibitors as antidiabetic agents: a brief review. *Future Med Chem*. 2018;10(10):1229-1239. DOI: 10.4155/fmc-2017-0235.
12. Fan H, Liu H, Zhang Y, Zhang S, Liu T, Wang D. Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. *Journal of Future Foods*. 2022; 2(2): 143–159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.003>
13. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, *et al*. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7(48): 1-26. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
14. Du Z, Li Y. Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. *J Agric Food Res*. 2022; 9: 100353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100353>
15. Patil S, Goswami A, Kalia K, Kate A. Plant-Derived Bioactive Peptides: A treatment to Cure Diabetes. *Int J Pept Res Ther*. 2020; 26: 955-968. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09899-z>

16. Rivero-Pino F, Espejo-Carpio J, Guadix E. Identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chem.* 2021; 354:129473. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>
17. Tang J, Wan Y, Zhao M, Zhong H, Zheng JS, Feng F. Legume and soy intake and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2020;111(3): 677-688. DOI: [10.1093/ajcn/nqz338](https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz338)
18. Serrano K. Multifuncionalidad de hidrolizados proteicos a partir de semillas de *Erythrina edulis* de diferentes regiones del Perú. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/19464/Serrano_cl.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
19. Asledottir T, Vegarud GE, Picariello G, Mamone G, Lea TE, Roseth A, *et al.* Bioactive peptides identified in pea and faba bean after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. *J Funct Foods.* 2023; 102: 105445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105445>
20. Acevedo Martinez KA, Gonzalez de Mejía E. Comparison of five chickpea varieties, optimization of hydrolysates production and evaluation of biomarkers for type 2 diabetes. *Food Res Int.* 2021; 147: 110572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110572>
21. Mune Mune MA, Minka SR, Henle T. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chem.* 2018; 250: 162-169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.001>.

22. Cruz-Chamorro I, Santos Sanchez G, Álvarez-López AI, Pedroche J, Lardone PJ, Arnoldi A, *et al.* Pleiotropic biological effects of *Lupinus* spp. protein hydrolysates. *Trends Food Sci Technol.* 2023; 133: 244–266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.011>
23. Guzman T, Martínez-Ayala A, García-López P, Soto-Luna I, Gurrola-Díaz C. Effect of the acute and chronic administration of *Lupinus albus* β -conglutin on glycaemia, circulating cholesterol, and genes potentially involved. *Biomed Pharmacother.* 2021; 133: 110969. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110969](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110969)
24. Tapadia M, Johnson S, Utikar R, Newsholme P, Carlessi R. Antidiabetic effects and mechanisms of action of γ -conglutin from lupin seeds. *J Funct Foods.* 2021; 87: 104786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104786>
25. Bollati C, Xu R, Boschini G, Bartolomei M, Rivardo F, Li J, *et al.* Integrated Evaluation of the Multifunctional DPP-IV and ACE Inhibitory Effect of Soybean and Pea Protein Hydrolysates. *Nutrients.* 2022; 14 (2379): 1-14. DOI: [10.3390/nu14122379](https://doi.org/10.3390/nu14122379).
26. Lammi C, Zanoni C, Arnoldi A, Vistoli G. Peptides Derived from Soy and Lupin Protein as Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitors: In Vitro Biochemical Screening and In Silico Molecular Modeling Study. *J Agric Food Chem.* 2016; 64(51): 9601–9606. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04041>
27. Muñoz EB, Luna-Vital DA, Fornasini M, Baldeón ME, Gonzales de Mejia E. Gamma-conglutin peptides from Andean lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced glucosa uptake and reduced gluconeogenesis *in vitro*. *J Funct Foods.* 2018; 45: 339-347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.021>
28. Kamran F, Phillips M, Harman DG, Reddy N. Antioxidant activities of lupin (*Lupinus angostifolius*) protein hydrolysate and their potential for nutraceutical and functional foods. *Food Chem Adv.* 2023; 2: 100297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100297>.

29. Tapadia M, Carlessi R, Johnson S, Utikar R, Newsholme P. Lupin seed hydrolysate promotes G-protein-coupled receptor, intracellular Ca²⁺ and enhanced glycolytic metabolism-mediated insulin secretion from BRIN-BD11 pancreatic beta cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 480: 83-96. DOI: 10.1016/j.mce.2018.10.015
30. Intiquilla A. Potencial neuroprotector de péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de las proteínas soluble aisladas de las semillas de *Lupinus mutabilis* (tarwi). [Tesis de posgrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4598/Intiquilla_qa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
31. Zavaleta A. *Lupinus mutabilis* (Tarwi). Leguminosa andina con gran potencial industrial. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
32. Braga D, Oliveira D, Rosario R, Novais P, Machado J. An Architecture Proposal for Noncommunicable Diseases Prevention. *Procedia Comput Sci.* 2023; 220: 820-825. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2023.03.109>.
33. Huhtaniemi I, Martini L. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. 2nd edition. Academic Press; 2018: p.116-121 (Samson S, Garber A. Diabetes, Type 2; vol 1).
34. Baggio L, Drucker D. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007; 132(6): 2131–2157. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.054
35. Guerrero L, Durán-Agüero S. Consumo de legumbres y su relación con enfermedades crónicas no transmisibles. *Rev Chil Nutr.* 2020; 47(5): 865-869. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182020000500865>

36. Delgado-Andrade C, Olías R, Jiménez-López J, Clemente A. Aspectos de las legumbres nutricionales y beneficiosos para la salud humana. *Arbor*. 2016;192(779):a313. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3003>
37. Carvajal-Larenas FE, Linnemann AR, Nout MJ, Koziol M, Van Boekel MA. *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016; 56(9):1454–1487. DOI: 10.1080/10408398.2013.772089
38. Mamoudou H, Mune Mune MA, Fookalbo VO, Muhammad ZH, Bahri B, Bayang JP, Minka SR. Consumption of underutilised grain legumes and the prevention of type II diabetes and cardiometabolic diseases: Evidence from field investigation and physicochemical analyses. *Environ Chall*. 2022; 9: 100621. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100621>
39. Wang C, Yang Y, Xu W, Yu D, Wu J, Cai Q, *et al*. Legume consumption and gut microbiome in elderly Chinese men and women. *J Nutr*. 2021; 151(8): 2399-2408. DOI: 10.1093/jn/nxab139
40. Pearce M, Fanidi A, Bishop T, Sharp S, Imamura F, Dietrich S, *et al*. Associations of Total Legume, Pulse, and Soy Consumption with Incident Type 2 Diabetes: Federated Meta-Analysis of 27 Studies from Diverse World Regions. *J Nutr*. 2021;151 (5):1231–1240. DOI: 10.1093/jn/nxaa447

41. Mazumder K, Hossain R, Aktar A, Dash R, Farahnaky A. Biofunctionalities of unprocessed and processed flours of Australian lupin cultivars: Antidiabetic and organ protective potential studies. *Food Res Int.* 2021; 147:110536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110536>
42. Garmidolova A, Desseva I, Mihaylova D, Fidan H, Terziyska M, Pavlov A. Papain Hydrolysates of Lupin Proteins with Antioxidant, Antimicrobial, and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities. *Appl Sci.* 2022; 12 (23): 12370. DOI: <https://doi.org/10.3390/app122312370>
43. Kalmovit W, Nilsén V, Zambrana S, Mohanty S, Gonzales E, Östenson CG, Brauner A. *Lupinus mutabilis* Edible Beans Protect against Bacterial Infection in Uroepithelial Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018; 2018: 1098015. DOI: 10.1155/2018/1098015
44. Zambrana S, Lundqvist LC, Mamani O, Catrina SB, Gonzales E, Östenson CG. *Lupinus mutabilis* Extract Exerts an Anti-Diabetic Effect by Improving Insulin Release in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. *Nutrients.* 2018; 933(10): 1-18. DOI: 10.3390/nu10070933.
45. Baldeon ME, Castro J, Villacres E, Narvaez L, Fornasini M. Hypoglycemic effect of cooked *Lupinus mutabilis* and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutr Hosp.* 2012; 27(4), 1261-1266. DOI:10.3305/nh.2012.27.4.5761
46. Fornasini M, Castro J, Villacrés E, Narváez L, Villamar P, Baldeón ME. Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutr Hosp.* 2012; 27(2), 425-433. DOI:10.1590/S0212-16112012000200012.

47. Fornasini M, Abril V, Beltrán P, Villacrés E, Cuadrado L, Robalino F, *et al.* Efficacy of a *Lupinus mutabilis* Sweet snack as complement to conventional type 2 diabetes mellitus treatment. *Nutr Hosp.* 2019; 36(4): 905-911. DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02590>
48. Chirinos R, Cerna E, Pedreschi R, Calsin M, Aguilar-Galvez A, Campos D. Multifunctional in vitro bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chem.* 2020; 98(2):423-433. DOI: <https://doi.org/10.1002/cche.10382>
49. Nielsen PM, Dambmann PC. Improved Method for Determining Protein Degree of Hydrolysis. *J Food Sci.* 2001; 66(5):642-646. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
50. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259), 680-685. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
51. Caron J, Domenger D, Dhulster P, Ravallec R, Cudennec B. Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. *Food Res Int.* 2017; 92: 113-118. DOI:10.1016/j.foodres.2017.01.002.
52. Curti C, Carvalho L, Olivares AP, Badan AP, Timotheo D, Vinderola G, *et al.* The addition of Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) protein concentrate enhances the nutritive value and the antioxidant activity of yoghurt. *Rev Esp Nutr Hum Diet.* 2022; 26(Supl. 1):e1406. DOI: <https://doi.org/10.14306/renhyd.26.S1.1406%20>

53. Mulvihill E, Varin EM, Gladanac B, Campbell JE, Ussher JR, Baggio LL, *et al.* Cellular Sites and Mechanisms Linking Reduction of Dipeptidyl Peptidase-4 Activity to Control of Incretin Hormone Action and Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* 2017; 25(1), 152-165. doi:10.1016/j.cmet.2016.10.007. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.10.007
54. Liu R, Cheng J, Wu H. Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. *Int J MolSci.* 2019; 20(3), 463. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030463>.
55. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *J Food Biochem.* 2019 Jan; 43(1):e12451. DOI: 10.1111/jfbc.12451.
56. Nongonierma AB, Maux SL, Esteveny C, FitzGerald RJ. Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *J Sci Food Agric.* 2017; 97(4):1093-1101. DOI: 10.1002/jsfa.7834
57. Benhammouche T, Melo A, Martins Z, Faria MA, Pinho SC, Ferreira IM, Zaidi F. Nutritional quality of protein concentrates from *Moringa Oleifera* leaves and in vitro digestibility. *Food Chem.* 2021; 348:128858. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128858
58. Ortiz VA. Valorización del lupino (*Lupinus mutabilis*) y del subproducto de lavado de las semillas, mediante la producción de carne vegetal, sustituto lácteo y extracción de principios bioactivos [Tesis de pregrado]. Quito: Escuela Politécnica Nacional; 2022. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/22430/1/CD%2011910.pdf>.

59. Glencross B, Sweetingham M, Hawkins W. A digestibility assessment of pearl lupin (*Lupinus mutabilis*) meals and protein concentrates when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2010; 303(1-4): 59-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.015>
60. Santos CN, Ferreira RB, Teixeira AR. Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(10): 3821–3825. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf970075v>
61. Czubinski J, Grygier A, Siger A. *Lupinus mutabilis* seed composition and its comparison with other lupin species. *J Food Compos Anal*. 2021; 99:103875. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103875>
62. Aguilar-Acosta LA, Serna-Saldivar SO, Rodríguez-Rodríguez J, Escalante-Aburto A, Chuck-Hernandez C. Effect of Ultrasound Application on Protein Yield and Fate of Alkaloids during Lupin Alkaline Extraction Process. *Biomolecules*. 2020; 10 (2): 1-22. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10020292>
63. Acuña O, Caiza J. Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. *Revista Politecnica*. 2010; 29(1): 70-77. DOI: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4352>
64. Ruiz-Lopez MA, Barrientos-Ramírez L, García-Lopez PM, Valdés-Miramontes EH, Zamora-Natera JF, Rodríguez-Macias R, *et al*. Nutritional and Bioactive Compounds in Mexican Lupin beans Species: A mini review. *Nutrients*. 2019; 11(8): 1785. DOI: [10.3390/nu11081785](https://doi.org/10.3390/nu11081785)
65. Embaby HE, Swailam HM, Rayan AM. Preparation and physicochemical properties of protein concentrate and isolate produced from *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne ssp. *raddiana*. *J Food Sci Technol*. 2018; 55(2):489–495. DOI: [10.1007/s13197-017-2957-1](https://doi.org/10.1007/s13197-017-2957-1)

66. Soto L. Efecto de la temperatura y el pH en las propiedades de adsorción en la proteína concentrada de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet). [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/16974/Soto_sl.pdf?sequence=1&isAllowed=y
67. Tacias-Pascasio VG, Morellon-Sterling R, Siar EH, Tavano O, Berenguer-Murcia A, Fernandez-Lafuente R. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *Int J Biol Macromol.* 2020; 165: 2143-2196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>.
68. Pastor-Cavada E, Juan R, Pastor JE, Alaiz M, Vioque J. Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chem.* 2009; 117(3): 466- 469.
69. Lqari H, Vioque J, Pedroche J y Millán F. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry.* 2002; 76: 349-356. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.039>
70. Rieder A, Afseth NK, Böcker U, Knutsen SH, Kirkhus B, Mæhre HK, *et al.* Improved estimation of in vitro protein digestibility of different foods using size exclusion chromatography. *Food Chem.* 2021; 358: 129830. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129830>
71. Pasarin D, Lavric V, Enascuta CE, Ghizdareanu AI, Matei CB. Optimal Enzymatic Hydrolysis of Sweet Lupine Protein towards Food Ingredients. *Fermentation.* 2023; 9(3): 1-14. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9030203>

72. Oliveira P, Benavides S, Huenufil D, Zarate P, Petit-Breuilh X. Hydrolyzed protein from *Lupinus albus* (INIA-Boroa variety) for the functional food industry: An example of partnership between farmers and academia. *LWT-Food Science and Technology*. 2023; 174: 114428. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114428>

73. De Souza T, Real L, Kil Y, Gonzalez E. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable to inhibit dipeptidyl peptidase IV. *Food Res Int*. 2014; 64: 799-809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.016>

74. Mojica L, Chen K, Gonzales E. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. *J Food Sci*. 2015; 80(1):H188-98. DOI: 10.1111/1750-3841.12726

X. ANEXOS

a. FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO

