

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA QUINUA (*Chenopodium  
quinua* Willd.) COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS  
MEDIANTE PROTEÓLISIS *in silico*”**

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

**NICOLLE SANDY ESCOBAR MENDOZA**

**LIMA-PERÚ**

**2023**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	Tesis Quinua In silico Nicolle Escobar_VF.docx (D160284437)
<b>Submitted</b>	3/7/2023 12:14:00 AM
<b>Submitted by</b>	Rosana Chirinos
<b>Submitter email</b>	chiri@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	6%
<b>Analysis address</b>	chiri.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS TARWI MAGALY CERNA_VF.docx</b> Document TESIS TARWI MAGALY CERNA_VF.docx (D156168077) Submitted by: chiri@lamolina.edu.pe Receiver: chiri.unalm@analysis.arkund.com	 <b>20</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS VILLASANTE-MTAL_FINAL.docx</b> Document TESIS VILLASANTE-MTAL_FINAL.docx (D149812950) Submitted by: chiri@lamolina.edu.pe Receiver: chiri.unalm@analysis.arkund.com	 <b>12</b>

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
"EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA QUINUA (Chenopodium quinua Willd.) COMO FUENTE DE PÉPTIDOS  
BIOACTIVOS MEDIANTE PROTEÓLISIS in silico"

**54%**

**MATCHING BLOCK 1/32**

**SA**

TESIS TARWI MAGALY CERNA\_VF.docx (D156168077)

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS Presentado por: NICOLLE SANDY ESCOBAR MENDOZA LIMA-PERÚ 2023 La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual) RESUMEN La

quinua, es un grano andino, muy reconocido por la calidad nutricional y propiedades biológicas de su proteína. La presente investigación evaluó el potencial de la proteína globulina de la quinua como precursora de péptidos con actividades inhibitoras de

**68%**

**MATCHING BLOCK 2/32**

**SA**

TESIS TARWI MAGALY CERNA\_VF.docx (D156168077)

la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) (efecto antihipertensivo) y de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA DE QUINUA (*Chenopodium  
quinua* Willd.) COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS  
MEDIANTE PROTEÓLISIS *in silico*”**

Presentado por:

NICOLLE SANDY ESCOBAR MENDOZA

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA  
EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

---

Dra. Ana Aguilar Galvez

PRESIDENTE

---

Ritva Repo de Carrasco, PhD.

MIEMBRO

---

Julio Vidaurre Ruiz, PhD.

MIEMBRO

---

Dr. David Campos Gutiérrez

ASESOR

---

Dra. Rosana Chirinos Gallardo

CO-ASESORA

Lima – Perú

2023

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a mi familia en especial a mi mamá Julia, mi papá Walter y mi hermana Jessica, por darme ánimos y brindarme su apoyo incondicional para poder ejecutarla y sustentarla.*

*A mí querida UNALM por el vasto aprendizaje obtenido, contribuyendo en mi formación profesional y humana. Y permitirme conocer a grandes personas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor y co-asesora, el Dr. David Campos y la Dra. Rosana Chirinos, por haber depositado su confianza en mi persona y permitirme formar parte del prestigioso centro de investigación IBT-UNALM. Agradezco su apoyo constante, dedicación y paciencia en cada una de las etapas del presente trabajo.

A Adelaida Pardo y Andres Figueroa, por su paciencia y estar dispuestos a brindarme su soporte en todo lo concerniente a la parte experimental.

A mis amigos del Instituto de Biotecnología: Patricia, Jahaira y Cristian, por su gran amistad y hacer que el ambiente del laboratorio sea más ameno.

A mis amigos UHT de mi facultad: Irma, Joselin, Alejandro, Jonathan, Luis, Fiorella, Melanie y Javier con quienes compartí grandes momentos en la universidad.

Al Vicerrectorado de Investigación de la UNALM por el financiamiento brindado para el desarrollo de la presente investigación mediante el 11° Concurso de Subvención de Tesis de Pregrado UNALM 2021.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. QUINUA	3
2.1.1. GENERALIDADES	3
2.1.2. VARIEDAD PASANKALLA	6
2.1.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	7
2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS	11
2.2.1. DEFINICIÓN	11
2.2.2. OBTENCIÓN	11
2.3. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	14
2.3.1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	15
2.3.2. PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS	16
2.4. DIABETES MELLITUS TIPO 2	17
2.4.1. DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV	18
2.4.2. PÉPTIDOS HIPOGLUCEMIANTES	19
2.5. ENSAYOS <i>in silico</i> PARA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	20
2.5.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (Docking)	21
<b>III. METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	23
3.2. MATERIA PRIMA	23
3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	23
3.3.1. EQUIPOS	23
3.3.2. MATERIALES	24
3.3.3. REACTIVOS	25
3.3.4. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	25
3.3.5. PROGRAMAS PARA ACOPLAMIENTO MOLECULAR	27
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	28
3.4.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE POR EL MÉTODO DE LOWRY	28
3.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTAL DE KJELDAHL	29

3.4.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	29
3.4.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA <i>in vitro</i>	30
3.4.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA DPP-IV <i>in vitro</i>	32
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	33
3.5.1. OBTENCIÓN <i>in silico</i> DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA E HIPOGLUCEMIANTE A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DEL TIPO GLOBULINAS DE LA QUINUA	33
3.5.2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON TERMOLISINA <i>in vitro</i> CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA E HIPOGLUCEMIANTE A PARTIR DE FRACCIÓN GLOBULINA Y DEL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA	40
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
4.1. OBTENCIÓN <i>in silico</i> DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA	49
4.2. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA	49
4.2.1. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA COMO PRECURSORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS USANDO LA BASE DE DATOS BIOPEP	52
4.2.2. HIDRÓLISIS <i>in silico</i> DE LAS PROTEÍNAS DE QUINUA	55
4.2.3. BIOACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE LA QUINUA OBTENIDOS CON TERMOLISINA Y EVALUACIÓN DE SU ESTABILIDAD FRENTE A LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL EVALUADA BAJO CONDICIONES <i>in silico</i>	59
4.2.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD	63
4.2.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD CON LA ENZIMA ECA	65
4.2.6. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD CON LA ENZIMA DPP-IV	69
4.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS <i>in vitro</i> DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LA FRACCIÓN GLOBULINA Y CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA USANDO LA ENZIMA TERMOLISINA	71
4.3.1. PROTEÍNA TOTAL DE HARINA DESGRASADA, CONCENTRADO,	

FRACCIÓN GLOBULINA DE QUINUA	71
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>76</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>96</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variedades comerciales de quinua en el Perú .....	5
Tabla 2: Referencias de componentes en quinua (g/100 g de materia fresca) .....	8
Tabla 3: Perfil de aminoácidos de la quinua y otros cereales.....	9
Tabla 4: Enzimas proteolíticas provenientes de diferentes fuentes.....	12
Tabla 5: Proteínas de quinua obtenidas de NCBI.....	49
Tabla 6: Formato FASTA de proteínas de quinua obtenidas de NCBI.....	50
Tabla 7: Frecuencia de aparición de péptidos con determinada actividad biológica en la proteína de quinua (A) realizada por BIOPEP .....	52
Tabla 8: Frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos (A) de las proteínas de quinua .....	54
Tabla 9: Grado de hidrólisis, valores de frecuencia de liberación de fragmentos inhibidores de la ECA y DPP-IV (A <sub>E</sub> ) y frecuencia relativa de liberación de inhibidores de la ECA y DPP-IV (W) determinada después de hidrólisis con termolisina. ....	55
Tabla 10: Fracciones de péptidos obtenidos de las proteínas globulinas de la quinua bajo acción de la termolisina por análisis <i>in silico</i> .....	57
Tabla 11: Resultados de bioactividad de péptidos de alta bioactividad de las globulinas de quinua antes y después de la digestión gastrointestinal <i>in silico</i> .....	60
Tabla 12: Bioactividad de fragmentos (PeptideRanker y BIOPEP) obtenidos de péptidos antes y después de la digestión simulada.....	62
Tabla 13: Hidrofobicidad y toxicidad de péptidos con mayor bioactividad (antes y después de la digestión simulada) .....	64
Tabla 14: Contenido de proteína total de la harina desgrasada de quinua (HD), concentrado proteico de quinua (CPQ) y fracción globulina (G) .....	71
Tabla 15: Características de hidrolizados de concentrado proteico de quinua (CPQ) y fracción globulina (G) .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	3
Figura 2: Producción de quinua por departamentos 2011-2020 .....	4
Figura 3: INIA 415 – Pasankalla.....	6
Figura 4: Contenido de la proteína en 12 variedades de quinua (variedades mejoradas y selecciones nativas) .....	7
Figura 5: Solubilidad del aislado de proteína de quinua .....	11
Figura 6: Escisión de enlaces peptídicos por termolisina.....	13
Figura 7: Representación esquemática de subsitios de especificidad de termolisina.....	14
Figura 8: La hipertensión inducida por el sistema renina-angiotensina y las enzimas se dirigen a la modulación negativa por péptidos antihipertensivos.....	15
Figura 9: Características estructurales de los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I (ACE).....	18
Figura 10: Liberación y degradación de las incretinas GIP y GLP-1.....	19
Figura 11: Procedimiento general de acoplamiento. ....	22
Figura 12: Estructura química del lisinopril, fármaco inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina usado principalmente en el tratamiento de la hipertensión .....	37
Figura 13: Estructura química del ligando 715 (Sitagliptina), fármaco inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa- IV (DPP-IV) usado para mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 .....	39
Figura 14: Diagrama de flujo para la obtención de harina de quinua desgrasada.....	42
Figura 15: Diagrama de flujo para la obtención de croncentrado proteico de quinua.....	44
Figura 16: Diagrama de flujo para la obtención de fracciones proteicas de quinua.....	46
Figura 17: Metodología experimental para la determinación de la potencialidad de la fracción globulina de la quinua, como precursora de péptidos bioactivos .....	47
Figura 18. Interacciones del péptido PR en la enzima ECA (PDB 1o8a). A) Interacciones obtenidas entre el péptido PR y la enzima ACE (con una caja 60 Å <sup>3</sup> ), obtenidas a una distancia de 5 Å con pymol. B) Interacciones obtenidas entre el péptido PR y la enzima ACE (con una caja 60 Å <sup>3</sup> ), obtenidas con Discovery. ....	66
Figura 19. Interacciones del péptido IPPG en la enzima ECA (PDB 1o8a). A) Interacciones obtenidas entre el tetrapéptido IPPG y la enzima ECA (con una caja 60 Å <sup>3</sup> ), obtenidas a una distancia de 5Å con pymol. B) Interacciones obtenidas entre el tetrapéptido IPPG y la enzima	

ECA (con una caja 60 Å <sup>3</sup> ), obtenidas con Discovery. ....	68
Figura 20. Interacción entre los péptidos IPPG y SPH con la enzima DPP-IV (PDB 1x70). A) interacción del péptido IPPG con DPP-IV en pymol a 5 Å. B) interacciones obtenidas entre IPPG con DPP-IV, de Discovery. C) interacción del péptido SPH con DPP-IV en pymol a 5Å. D) interacciones obtenidas entre SPH con DPP-IV de Discovery. ....	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: RESULTADO DE GRADO DE HIDRÓLISIS DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA .....	96
ANEXO 2: VALOR IC <sub>50</sub> (INHIBICIÓN DE LA DPP-IV) DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA .....	97
ANEXO 3: VALOR IC <sub>50</sub> (INHIBICIÓN DE LA ECA) DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA .....	98
ANEXO 4: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE DPP-IV .....	99
ANEXO 5: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE ECA.....	100
ANEXO 6: RESULTADO DE LA PROTEÓLISIS in silico DE LA PROTEÍNA DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE QUINUA.....	101
ANEXO 7: SECUENCIAS DE PÉPTIDOS PRODUCIDOS A PARTIR DE LA PROTEÓLISIS in silico CON TERMOLISINA MEDIANTE BIOPEP-UWM Y SUS BIOACTIVIDADES POR PEPTIDERANKER .....	102

## RESUMEN

La quinua, es un grano andino, muy reconocido por la calidad nutricional y propiedades biológicas de su proteína. La presente investigación evaluó el potencial de la proteína globulina de la quinua como precursora de péptidos con actividades inhibitoras de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) (efecto antihipertensivo) y de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (efecto hipoglucemiante) usando los enfoques *in silico* e *in vitro*. La enzima termolisina fue empleada para la evaluación de la hidrólisis *in silico* de las globulinas de la quinua: *13S globulin seed storage protein 2-like*, *13S globulin seed storage protein 1-like*, *11S globulin seed storage protein 2-like* y *11S seed storage*, empleando la base de datos BIOPEP. Luego de la hidrólisis, mediante el empleo del programa PeptideRanker se seleccionó, de entre todos los péptidos generados de la hidrólisis, a tres de ellos: FPR (Fenilalanina-Prolina-Arginina), YSPHW (Tirosina-Serina-Prolina-Histidina-Triptófano) y IPPG (Isoleucina-Prolina-Prolina-Glicina), como péptidos con bioactividad de interés por sus efectos antihipertensivos y/o hipoglucemiantes. Los tres péptidos, fueron posteriormente evaluados *in silico* en su estabilidad frente a las condiciones de digestión gastrointestinal (empleando pepsina, tripsina y quimiotripsina, secuencialmente), encontrándose que FPR y YSPHW sufren hidrólisis obteniéndose péptidos de menor tamaño: PR y SPH respectivamente; mientras que el péptido IPPG, se mantuvo intacto; adicionalmente se observó que el primero destacó por su actividad inhibitora de la ECA, el segundo por su actividad inhibitora de la DPP-IV y el último destacó en ambas actividades; resultados que posteriormente fueron evaluados mediante análisis de acoplamiento molecular (docking) *in silico*, donde se vieron respaldados los hallazgos encontrados. Los resultados encontrados del análisis *in silico*, fueron posteriormente corroborados mediante evaluación *in vitro* realizados en un concentrado proteico y en la fracción globulina de la quinua que fueron hidrolizados con termolisina. Los resultados de la presente investigación nos indican que la fracción globulina de la quinua hidrolizada con termolisina puede ser considerada una muy buena fuente para la obtención de péptidos antihipertensivos e hipoglucemiantes.

**Palabras clave:** Quinoa, péptidos bioactivos, *in silico*, *in vitro*, antihipertensivo, hipoglucemiante.

## ABSTRACT

Quinoa is an Andean grain, well known for the nutritional quality and biological properties of its protein. Thus, the present investigation evaluated the potential of quinoa globulin protein as a precursor of peptides with inhibitory activities of the angiotensin I converting enzyme (ACE) (antihypertensive effect) and of the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) (hypoglycemic effect) using *in silico* and *in vitro* approaches. The thermolysin enzyme was used for the evaluation of the *in silico* hydrolysis of the globulins: 13S globulin seed storage protein 2-like, 13S globulin seed storage protein 1-like, 11S globulin seed storage protein 2-like and 11S seed storage, using the BIOPEP database. After hydrolysis, using the PeptideRanker program, it was selected, among all the peptides generated from hydrolysis, to three of them: FPR (Phenylalanine-Proline-Arginine), YSPHW (Tyrosine-Serine-Proline-Histidine-Tryptophan) and IPPG (Isoleucine-Proline-Proline-Glycine), as peptides with bioactivity of interest for their antihypertensive and/or hypoglycemic effects. The three peptides were subsequently evaluated *in silico* for their stability against gastrointestinal digestion conditions (using pepsin, trypsin and chymotrypsin, sequentially), finding that FPR and YSPHW undergo hydrolysis, obtaining smaller peptides: PR and SPH, respectively; while the IPPG peptide remained intact; additionally, it was observed that the first one stood out for its ACE inhibitory activity, the second for its DPP-IV inhibitory activity and the last one stands out for both activities; results that were evaluated by molecular docking analysis (docking) *in silico*, where the findings found were supported. The results found from the *in silico* analysis were later corroborated by *in vitro* evaluation carried out on a protein concentrate and on the quinoa globulin fraction, hydrolyzed with thermolysin. The results of this research indicate that the globulin fraction of quinoa hydrolyzed with thermolysin can be considered a very good source for obtaining antihypertensive and hypoglycemic peptides.

**Keywords:** Quinoa, bioactive peptides, *in silico*, *in vitro*, antihypertensive, hypoglycemic.

## I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), es un grano andino que está recibiendo atención a nivel mundial debido a sus propiedades nutricionales y biológicas (Pedrali *et al.*, 2022). Además de tener proteínas de alta calidad por su contenido equilibrado de aminoácidos esenciales, es libre de gluten (Galante *et al.*, 2019). Respecto a la hipertensión, Aluko y Monu (2003) demostraron el efecto inhibitorio de los péptidos antihipertensivos producidos a partir de la quinua usando alcalasa sobre la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA). Mientras que, en el caso de la diabetes, Vilcacundo *et al.* (2017) evidenciaron que los péptidos de quinua poseen actividad de inhibición a la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y recientemente Guo *et al.* (2020) a través de evaluaciones *in silico* e *in vitro* reportaron la presencia de péptidos derivados de la proteína de la quinua que inhiben la DPP-IV.

El método más ampliamente documentado para la obtención de péptidos es mediante el empleo de una hidrólisis *in vitro*, usando proteasas de origen vegetal, animal o microbiano, lo que involucra una serie de pasos, como: la selección del sustrato (proteína) y la enzima, evaluar las condiciones de hidrólisis, el estudio de la bioactividad de los péptidos obtenidos *in vitro*, la purificación y separación de fracciones activas, la identificación de secuencias peptídicas, seguido de la validación en estudios *in vivo* (FitzGerald *et al.*, 2019). De acuerdo con FitzGerald *et al.* (2019), todo ello requiere de un esfuerzo significativo debido al largo tiempo empleado y en algunas oportunidades no se llega a obtener un resultado exitoso). Frente a ello, surge la alternativa del empleo de los métodos *in silico* (empleados desde hace tiempo atrás para el desarrollo de fármacos), estos hacen uso de herramientas bioinformáticas (ej. BIOPEP, NCBI, Discovery, NAMD, entre muchos otros) para descubrir péptidos bioactivos, con una tasa más rápida de adquisición y de recuperación de resultados, un menor uso y consumo de reactivos y bajo costo (Iwaniak *et al.*, 2019), siendo necesario posteriormente realizar evaluaciones a nivel *in vitro* o *in vivo*, para validar los hallazgos.

Teniendo en cuenta la viabilidad de la metodología y la escasa investigación en esta temática referida a la proteólisis *in silico* empleando a la termolisina para la obtención péptidos con propiedades antihipertensivas e hipoglucemiantes a partir de la proteína de la quinua, es que el presente trabajo se desarrolló teniendo como objetivos: 1) Evaluar el potencial de la termolisina para liberar péptidos con actividad antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina-I, ECA) e hipoglucemiante (inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV, DPP-IV) mediante simulación de hidrólisis *in silico*; 2) Predecir la estabilidad de los péptidos generados frente a la digestión gastrointestinal simulada *in silico*; 3) Evaluar en los péptidos su potencial de bioactividad, las propiedades de hidrofobicidad y toxicidad; así como realizar el análisis de modelamiento molecular y 4) Evaluar las propiedades antihipertensiva e hipoglucemiante de la proteína y la fracción globulina de la quinua hidrolizadas con termolisina mediante hidrólisis *in vitro*.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. QUINUA

#### 2.1.1. GENERALIDADES

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una planta con origen en las regiones andinas (Morales *et al.*, 2021), se pueden cultivar en montañas altas y es tolerante al frío y sequías (Repo-Carrasco *et al.*, 2010). En los últimos años está siendo cultivada en muchos países de Asia y Europa (FAOSTAT, 2019). Su semilla, llamada por el mismo nombre, fue considerada un pseudocereal de alta importancia para las culturas precolombinas en América Latina y hasta la actualidad es consumido en zonas rurales como los pueblos aymaras y quechuas (Abugoch, 2009). En la Figura 1 se puede observar la morfología de la planta.



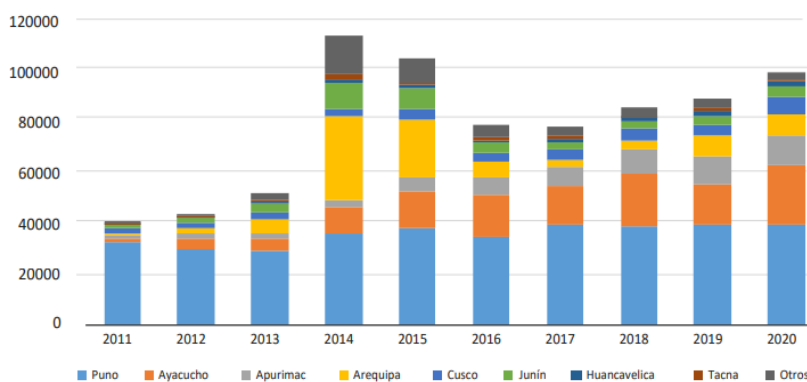
**Figura 1:** *Chenopodium quinoa* Willd

FUENTE: Murphy y Matanguihan (2015)

Según Apaza *et al.* (2013) la posición taxonómica de la quinua es la siguiente:

Reino: Vegetal  
División: Fanerógamas  
Clase: Dicotiledoneas  
Sub clase: Angiospermas  
Orden: Centrospermales  
Familia: Amaranthaceae  
Género: *Chenopodium*  
Sección: Chenopodia  
Subsección: Cellulata  
Especie: *Chenopodium quinoa* Willdenow

El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (Midagri) (2021) señala que la quinua se cultiva en 19 de los 24 departamentos de Perú. En la Figura 2 se muestra la distribución anual de producción de quinua desde el año 2011 hasta el 2020, destacando la región Puno, seguido de Ayacucho, Apurímac, Arequipa, Cusco y Junín.



**Figura 2: Producción de quinua por departamentos 2011-2020**

FUENTE: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (Midagri) (2021)

El Perú presenta diversas variedades comerciales de quinua, las cuales se reportan a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1: Variedades comerciales de quinua en el Perú**

<b>Nombre de la variedad</b>	<b>Zonas de producción</b>
INIA 431 - Altiplano	Altiplano, Costa
INIA 427 - Amarilla Sacaca	Valles Interandinos
INIA 420 - Negra Collana	Altiplano, Valles Interandinos, Costa
INIA 415 - Pasankalla	Altiplano, Valles Interandinos, Costa
Illpa INIA	Altiplano
Salcedo INIA	Altiplano, Valles Interandinos, Costa
Quillahuaman INIA	Valles Interandinos
Ayacuchana INIA	Valles Interandinos
Amarilla Marangani	Valles Interandinos
Blanca de Juli	Altiplano
Blanca de Junín	Valles Interandinos, Costa
Cheweca	Altiplano
Huacariz	Valles Interandinos
Hualhuas	Valles Interandinos
Huancayo	Valles Interandinos
Kankolla	Altiplano
Mantaro	Valles Interandinos
Rosada de Junín	Valles Interandinos
Rosada Taraco	Altiplano
Rosada de Yanamango	Valles Interandinos

FUENTE: Apaza *et al.* (2013)

### 2.1.2. VARIEDAD PASANKALLA

La variedad INIA 415- Pasankalla (Figura 3), de acuerdo con INIA (2012), fue desarrollada por el Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA como alternativa para los productores, exportadores, agroindustria y mercado interno debido a su alta productividad y buena calidad.

Se desarrolla en la zona agroecológica Suni del altiplano (3815-3900 msnm) a temperaturas entre 4 a 15°C, con clima frío seco (INIA, 2012) y en la región costa entre los 640 y 1314 msnm, temperatura máxima de 24 a 25°C en suelos de textura franco arenoso (Apaza *et al.*, 2013).

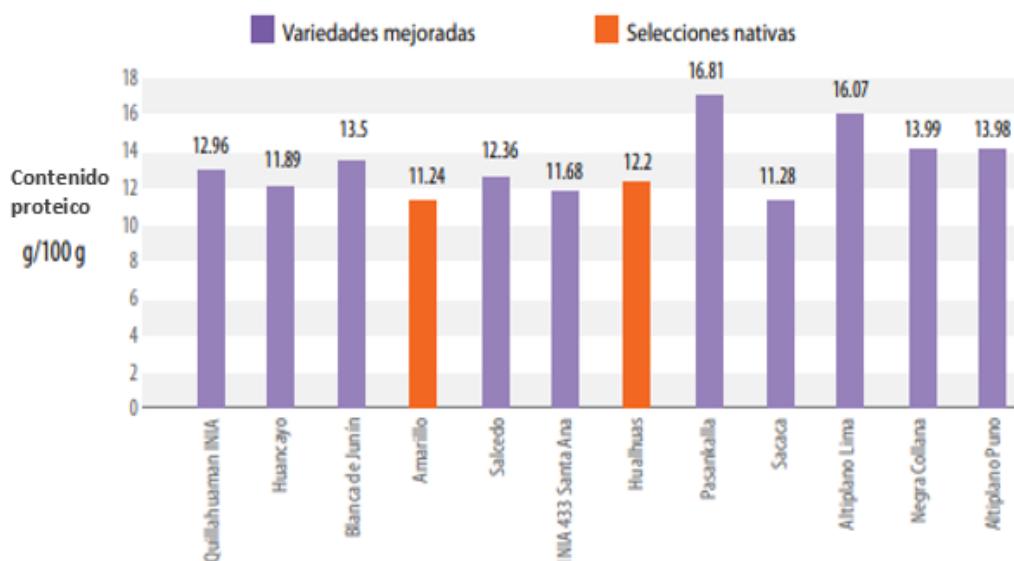


**Figura 3: INIA 415 – Pasankalla**

FUENTE: Apaza *et al.* (2013)

Apaza *et al.* (2013) describen a esta variedad como una semilla de aspecto opaco, color: perigonio (púrpura), pericarpio (plomo claro), episterma (vino oscuro), perisperma (blanco) y de forma cilíndrica. Además, es consumida tradicionalmente en sopas, ensaladas, guisos, postres, panes y bebidas, mientras que, en la agroindustria se procesa bajo forma: expandida, perlada, laminada, molienda y extruida. En la Figura 4, se puede observar que la variedad Pasankalla posee el mayor contenido proteico (16.81 g/100g) seguido de la variedad

Altiplano Lima (16.07 g/100g) (Soto *et al.*, 2015).



**Figura 4: Contenido de la proteína en 12 variedades de quinua (variedades mejoradas y selecciones nativas)**

FUENTE: Soto *et al.* (2015)

### 2.1.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Wei *et al.* (2022) señalan que en los últimos años la quinua ha recibido un creciente interés en diferentes regiones del mundo por su alta calidad nutricional y sobre todo por su alto contenido en proteína (14-23 por ciento). En la Tabla 2, se muestra el análisis proximal de las semillas de quinua.

Dentro del grupo de carbohidratos que posee la quinua, tenemos al almidón que constituye entre el 58.1 al 64.2 por ciento de materia seca y se caracteriza por su alta digestibilidad y solubilidad (Repo-Carrasco *et al.*, 2003). Tanwar *et al.* (2019) señalan que la quinua contiene de 8-13 por ciento de fibra dietética, más alta comparada a otros cereales como el arroz y maíz. Respecto a la composición lipídica de la quinua se componen también por ácidos grasos insaturados como  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 (proporción 6:1) ampliamente conocidos por sus efectos beneficiosos para la salud (Gordillo-Bastidas *et al.*, 2016).

Abugoch (2009) afirma que las semillas de quinua son ricas en micronutrientes como minerales y vitaminas, siendo los principales minerales: potasio, fósforo y magnesio; poseen altos niveles de vitamina B<sub>6</sub> y folato total en 100 g que cubren lo requerido en la dieta de niños y adultos. Por otro lado, es importante señalar que la quinua contiene alrededor de 71.7 mg de ácido gálico equivalente (AGE)/100g de polifenoles totales, el cual es mayor al contenido de otros cereales como el amaranto y trigo (Punia *et al.*, 2021), este contenido varía de acuerdo a la variedad del grano, como es el caso de la quinua roja que contiene un 90% más de flavonoides totales que los granos simples (Brend *et al.*, 2012).

De otro lado, Punia *et al.* (2021) señalan que no todos los componentes de la quinua son beneficiosos para la salud, debido a que posee factores anti nutricionales como es el caso de las saponinas (que se encuentran en altas cantidades), ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina, nitratos y oxalatos.

**Tabla 2: Referencias de componentes en quinua (g/100 g de materia fresca)**

<b>Componentes</b>	<b>(Dini <i>et al.</i>, 1992)</b>	<b>(Koziol, 1992)</b>	<b>(De Bruin, 1963)</b>	<b>(Wright <i>et al.</i>, 2002)</b>	<b>Media</b>
<b>Carbohidratos</b>	60.0	69.0	69.7	74.7	68.4
<b>Proteínas</b>	12.5	16.5	15.6	16.7	15.3
<b>Grasas</b>	8.5	6.3	7.4	5.5	6.9
<b>Cenizas</b>	3.7	3.8	3.0	3.2	3.4

FUENTE: Vargas *et al.* (2019)

#### **a. PROTEÍNA DE LA QUINUA**

La proteína de la quinua se ha considerado una fuente potencial para el enriquecimiento de alimentos o para la producción de alimentos funcionales debido a su alto contenido proteico y calidad proteica (Daliri *et al.*, 2021; Vega - Gálvez *et al.*, 2010), debido a su composición equilibrada de aminoácidos y su enriquecimiento con aminoácidos esenciales (Galante *et al.*,

2019). Dakhili *et al.* (2019) afirman que las semillas de quinua son ricas en lisina, histidina y metionina, aminoácidos que son generalmente limitados en cereales comunes (Tabla 3).

De acuerdo con las recomendaciones de la FAO/WHO, la quinua proporciona más del 150 por ciento de requerimientos diarios de aminoácidos esenciales en escolares y más del 200 por ciento en adultos, debido a que no es deficiente en aminoácidos esenciales (Dakhili *et al.*, 2019). El perfil de aminoácidos de la quinua y otros cereales en comparación con el patrón de WHO/FAO se presenta en la Tabla 3:

**Tabla 3: Perfil de aminoácidos de la quinua y otros cereales**

<b>Aminoácidos (g/100g proteína)</b>	<b>Quinua (Elsohaimy <i>et al.</i>, 2015; USDA, 2015)</b>	<b>Trigo (USDA, 2015)</b>	<b>Arroz (Koziol, 1992)</b>	<b>FAO/WHO (FAO, 1985; WHO, 1985)</b>
<b>Aminoácidos esenciales</b>				
Histidina	2.9	2.3	2.1	1.6
Leucina	5.9	6.8	8.2	1.9
Isoleucina	3.6	3.6	4.1	1.3
Lisina	5.4	2.7	3.8	1.6
Metionina + cisteína	3.6	4.2	3.6	1.7
Fenilalanina + tirosina	6.1	7.8	10.5	1.9
Treonina	3.0	2.9	3.8	0.9
Valina	4.2	4.4	6.1	1.8
Triptófano	1.2	1.3	1.1	0.5
<b>Aminoácidos no esenciales</b>				
Alanina	4.2	3.6	5.4	0.26
Glicina	4.9	4.2	4.25	0.2
Prolina	5.5	10.2	4.9	0.61
Serina	4.0	4.6	4.8	0.53
Ácido glutámico	13.2	31.7	17.2	1.75
Ácido aspártico	8.0	5.1	8.6	0.88

«Continuación»

---

Arginina	7.7	4.7	9.1	0.46
----------	-----	-----	-----	------

---

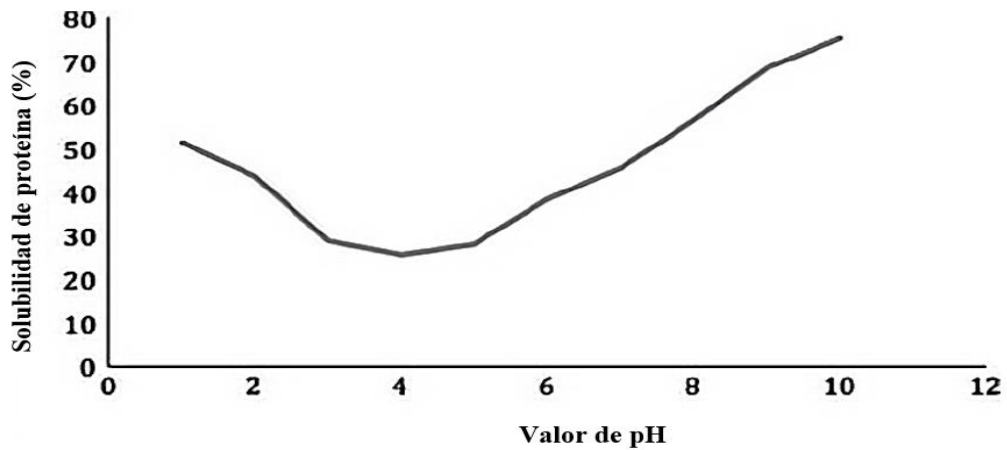
FUENTE: Dakhili *et al.* (2019)

Abugoch (2009) señala que las proteínas de la quinua están conformadas principalmente por albuminas 2S (35%), globulinas 11S (Quenopedina globular) (37%) y posee bajos porcentajes de prolaminas (0.5-7.0%). Punia *et al.* (2021) afirman que las globulinas de la quinua son ricas en ácido glutámico, asparagina / ácido aspártico, arginina, serina, leucina y glicina, excepto metionina y cisteína (aminoácidos que contienen azufre). Dakhili *et al.* (2019) mencionan que las propiedades funcionales y estructura de las globulinas de quinua dependen del pH (estables en el intervalo de 6-9) y poseen estructura de un hexámero. Si se exponen a un pH ácido pueden perder su estructura terciaria mientras que a un pH alcalino sufren disociación de subunidades debido a la repulsión electrostática (Marcone, 1997).

### **a.1. PRECIPITACIÓN Y SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS DE QUINUA**

Elsohaimy *et al.* (2015) realizaron un estudio sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales del aislado proteico de quinua, donde determinaron un mayor rendimiento de proteína precipitada a pH 4.5 con  $88.74 \pm 0.53$  por ciento, siendo el punto isoeléctrico (pI) de la proteína cercano al de otras proteínas de fuentes vegetales como: leguminosas (pI = 4.5), trigo (pI = 4.22) y arroz (pI = 4.46). Asimismo, los estudios realizados por Elsohaimy *et al.* (2015) mostraron que la solubilidad de la proteína depende del pH (Figura 5), a pH mayores (pH 10) se alcanzó la máxima solubilidad (71.21 por ciento), mientras que a un pH 4 se observó una solubilidad mínima (25.59 por ciento), determinando que el valor de pH óptimo para la máxima solubilidad de la proteína fue pH 10.





**Figura 5: Solubilidad del aislado de proteína de quinua**

FUENTE: Elsohaimy *et al.* (2015)

## 2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

### 2.2.1. DEFINICIÓN

Los péptidos bioactivos son definidos por Sánchez y Vázquez (2017) como compuestos orgánicos formados de aminoácidos (2 a 20 unidades) que se encuentran unidos por enlaces covalentes (enlace amida o peptídicos). De acuerdo con García *et al.* (2013) los péptidos bioactivos pueden presentar diversas actividades tales como: antioxidante, antihipertensivo, hipocolesterolémico, inmunoestimulante, entre otros.

### 2.2.2. OBTENCIÓN

Los péptidos bioactivos están encriptados en secuencias primarias de proteínas y pueden ser liberados por la acción de enzimas proteolíticas (exógenas y endógenas), la fermentación microbiana o durante el procesamiento de alimentos (Singh *et al.*, 2022).

Sánchez y Vázquez (2017) afirman que la hidrólisis enzimática es el método más eficaz y confiable para la producción de péptidos con funcionalidad, así se han producido una gran

cantidad de péptidos y mezcla de péptidos (hidrolizados) a partir de proteínas de fuentes vegetales (ej. soja, maíz, patata, maní) y animales (ej. suero, leche, huevo y carne). Las enzimas empleadas para la proteólisis se clasifican en endopeptidasas y exopeptidasas, de acuerdo al sitio de acción sobre el sustrato; las exopeptidasas hidrolizan los extremos N- o C-terminales del péptido, mientras que las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos dentro y lejos de los extremos de una cadena polipeptídica (Sitanggang *et al.*, 2021).

Las enzimas proteolíticas derivadas de plantas, animales y microorganismos se pueden utilizar para el proceso de hidrólisis de proteínas con la finalidad de obtener péptidos bioactivos (Tabla 4) (Kim *et al.*, 2012).

**Tabla 4: Enzimas proteolíticas provenientes de diferentes fuentes**

<b>Proteasas</b>	<b>Nombre</b>	<b>Puntos de acción</b>
<b>Vegetales</b> <sup>(1)</sup>	Papaína (Papaya)	C-terminal: Arginina, fenilalanina, leucina, glicina, treonina <sup>(5)</sup> N-terminal: Glutamina <sup>(5)</sup>
	Bromelina (Piña)	C-terminal: Alanina, treonina, leucina, arginina, glicina, serina, fenilalanina <sup>(5)</sup>
	Ficina (Ficus sp)	C-terminal: Lisina, fenilalanina, tirosina, glicina, serina, leucina, arginina, histidina. <sup>(5)</sup>
<b>Animal</b> <sup>(2)</sup>	<b>Tripsina</b>	<b>C-terminal: Lisina, arginina.</b> <sup>(5)</sup>
	Quimiotripsina	C-terminal: Tirosina, triptófano, fenilalanina, leucina, asparagina, histidina, metionina. <sup>(5)</sup>
	Pepsina	C-terminal: Fenilalanina, leucina, glicina, tirosina, alanina, glutamato, glutamina, treonina, asparagina, lisina, aspartato, metionina. <sup>(5)</sup> N-terminal: Valina, isoleucina <sup>(5)</sup>
<b>Microbiano</b> <sup>(1)(3)(4)</sup>	Termolisina (Endoproteasa de <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> )	N-terminal: Alanina, leucina, isoleucina, valina, tirosina, fenilalanina <sup>(5)</sup>

---

«Continuación»

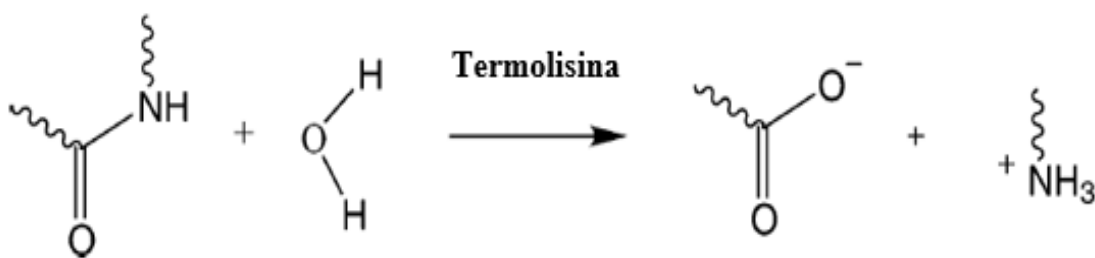
Neutrased (Endoproteasa C-terminal Leucina y fenilalanina en la de *Bacillus amyloliquefaciens*) posición P1<sup>(7)</sup>

---

FUENTE: <sup>(1)</sup> Mazorra-Manzano *et al.* (2017) <sup>(2)</sup> Sitanggang *et al.* (2021) <sup>(3)</sup> Lacroix y Li-Chan (2012) <sup>(4)</sup> Bruno *et al.* (2019) <sup>(5)</sup> BIOPEP (2022) <sup>(6)</sup> Torruco – Uco *et al.* (2009) <sup>(7)</sup> BRENDA Enzyme Database (s/f).

#### a. PROTEASA MICROBIANA: TERMOLISINA

La termolisina obtenida de *Geobacillus stearothermophilus* es una proteasa neutra termoestable de 34.4 kDa descrita como una de las mejores estudiadas de las metaloproteasas de zinc (O'Dononue *et al.*, 1994 citado por Ke *et al.*, 2013), se caracteriza por ser termoestable debido a que en su interior posee cuatro iones Ca<sup>2+</sup> que evitan grandes fluctuaciones conformacionales (Blumberger *et al.*, 2007). De acuerdo con Blumberger *et al.* (2007) esta endoproteasa de zinc extracelular bacteriana cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en la región N-terminal de grandes residuos hidrofílicos (Figura 6), además se ha demostrado que este único ion de zinc es esencial para su función catalítica.

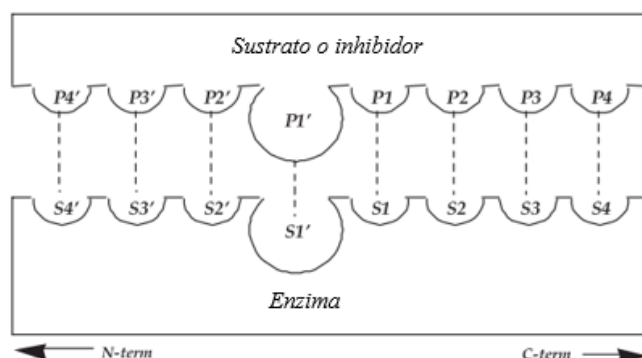


**Figura 6: Escisión de enlaces peptídicos por termolisina**

FUENTE: Blumberger *et al.* (2007)

El sitio principal para la especificidad de escisión por la termolisina es el sitio S1' como se observa en la Figura 7 (Adekoya *et al.* 2009). Así también, la herramienta informática

BIOPEP (2020) señala que la termolisina hidroliza los enlaces peptídicos a partir del lado N-terminal de los aminoácidos: alanina, leucina, isoleucina, valina, tirosina y fenilalanina.



**Figura 7: Representación esquemática de subsitios de especificidad de termolisina**

FUENTE: Adekoya *et al.* (2009)

### 2.2.3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA PROTEÍNA DE QUINUA

Shi *et al.* (2019) señala que estudios han demostrado el mejoramiento de propiedades bioactivas de las proteínas mediante hidrólisis enzimática en condiciones controladas. Tal es el caso de la generación de péptidos inhibidores de DPP-IV a partir de la proteína de quinua realizando una digestión simulada con: pepsina, pancreatina y extracto de bilis (todas de origen porcino) (Vilcacundo *et al.*, 2017) y mediante el uso de proteasas vegetales, como: papaína, ficina y bromelina (Guo *et al.*, 2020). También se ha reportado la producción de péptidos inhibidores de la ECA y  $\alpha$ -glucosidasa usando las enzimas: bromelina, quimiotripsina y pronasa E bajo condiciones *in vitro* (Mudgil *et al.*, 2020). Recientemente, You *et al.* (2022) obtuvieron péptidos con propiedades inhibitorias sobre la DPP-IV, a partir de proteína de quinua germinada, donde la hidrólisis *in vitro* se realizó con las enzimas: Papaína, Alcalasa, Neutrasa, Flavourzyme y la digestión con pepsina-tripsina.

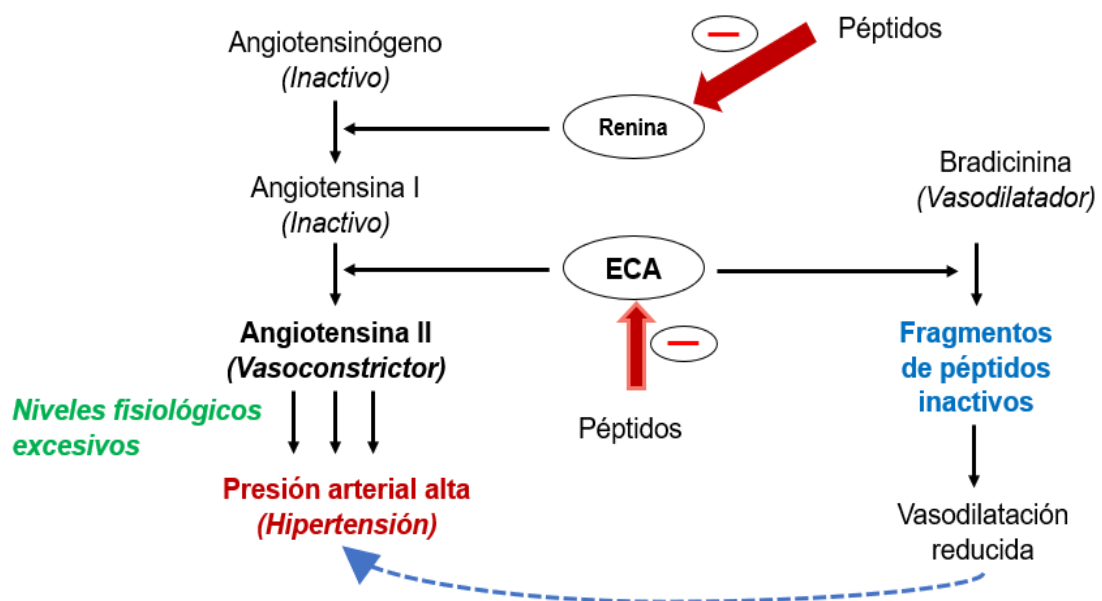
### 2.3. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión o también llamada presión arterial elevada (PA) es un problema de salud

global, afecta hasta al 30 por ciento de la población adulta en países desarrollados y en desarrollo (Norris y FitzGerald, 2013). La hipertensión es una enfermedad crónica que generalmente se manifiesta como presión arterial alta excesiva (valores sistólicos  $\geq 140$  mmHg y diastólicos  $\geq 90$  mmHg), que se caracteriza por una relajación insuficiente de los vasos sanguíneos y un flujo sanguíneo reducido (Aluko, 2015). Si no se recibe un tratamiento, la hipertensión puede conllevar a un flujo sanguíneo insuficiente a los órganos vitales, lo que desencadena un derrame cerebral y finalmente, la muerte (Aluko, 2015).

### 2.3.1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Aluko (2015) afirma que la hipertensión sistémica es la más estudiada porque involucra actividades del sistema renina-angiotensina (SRA), la principal vía que conduce a la contracción de los vasos sanguíneos (Figura 8).



**Figura 8: La hipertensión inducida por el sistema renina-angiotensina y las enzimas se dirigen a la modulación negativa por péptidos antihipertensivos.**

FUENTE: Aluko (2015)

Durante la regulación normal de la presión arterial, la renina convierte el angiotensinógeno en un fragmento de péptido inactivo llamado angiotensina I. Luego, la enzima convertidora de angiotensina-I, una glicoproteína que contiene un resto de carbohidrato compuesto de

manosa, galactosa, fructosa, ácido N-acetilneuramínico y N -acetil-glucosamina (Murray y FitzGerald, 2007), convierte la angiotensina I en angiotensina II, esta última se une a los receptores de la pared vascular para causar contracciones de los vasos sanguíneos, que es una causa principal de la hipertensión (Aluko, 2015); por otro lado, la ECA también hidroliza e inactiva la bradisinina, un potente vasodilatador (Wu *et al.*, 2006).

### **2.3.2. PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS**

El primer estudio acerca de péptidos antihipertensivos inhibidores de la ECA de origen natural a partir de veneno de serpiente (*Bothrops jararaca*) fue realizado por Ferreira *et al.* (1970). A partir de esa investigación se han reportado varios péptidos inhibidores de la ECA obtenidos de proteínas de alimentos de origen vegetal y animal, en especial a partir de proteínas de leche, pescado, huevo y soja (Udenigwe y Aluko, 2012).

#### **a. MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA ECA**

Sato *et al.* (2002) afirman que el mecanismo de inhibición de la ECA (metalopeptidasa de zinc) por péptidos derivados de proteínas alimentarias se realiza mediante inhibición competitiva. Es decir, la inhibición de la enzima se caracteriza por la competencia de los péptidos con el sustrato de ECA por los sitios catalíticos de la enzima (Udenigwe y Aluko, 2012). Sin embargo, existen péptidos que poseen un modo de inhibición no competitiva, que consiste en la unión de un inhibidor a un sitio alostérico (que difiere del sitio activo) dando como resultado una disminución de la eficacia de la enzima (Delaune y Alsayouri ,2021) y anticompitativa (donde el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato) (Kenakin,2012), que también han demostrado inhibir a la ECA (Sato *et al.*, 2002).

#### **b. ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

Gobbetti *et al.* (2002) afirman que la inhibición de la ECA produce principalmente un efecto antihipertensivo, las correlaciones estructura-actividad entre inhibidores peptídicos de la ECA indican que la unión a la ECA está fuertemente influenciada por el tripéptido C-

terminal de la secuencia del sustrato; la ECA parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que tienen principalmente residuos de aminoácidos hidrófobos (cadenas laterales aromáticas o ramificadas) en las tres posiciones C-terminales.

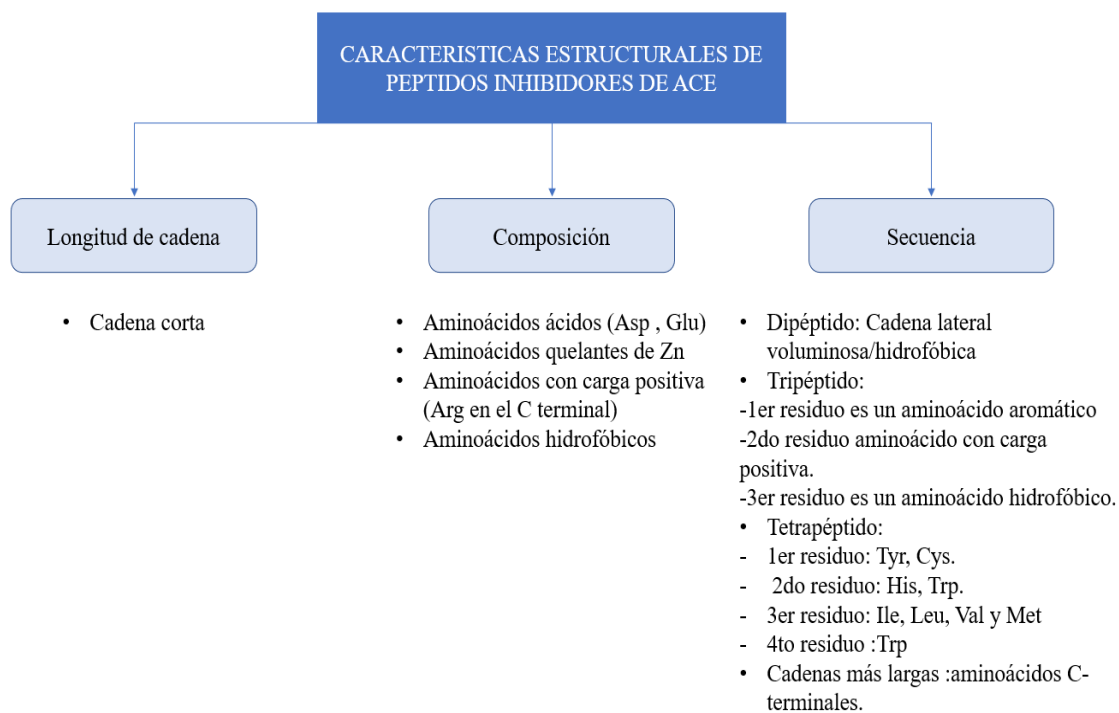
Por otro lado, los estudios realizados por Wu *et al.* (2006) señalaron que los aminoácidos hidrófobos voluminosos C-terminales (como, Pro, Trp, Phe y Tyr) y los aminoácidos alifáticos N-terminales (Leu, Ile, y Val) son necesarios en la estructura de dipéptidos y tripéptidos para la inhibición de la ECA. Además, los aminoácidos con carga positiva en el grupo  $\epsilon$ -amino (Arg y Lys) contribuyen a la inhibición de la ECA si están presentes en el extremo C-terminal de los péptidos, debido a que podrían interactuar con sitios de unión alostéricos aniónicos es decir diferentes del sitio activo de ECA (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Nakamura *et al.* (1995) a partir de leche agria fermentada con *L. helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* aislaron dos tripéptidos (Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro) que inhiben la ECA. Tuomilehto *et al.* (2004) demostraron que los tripéptidos Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro (derivados de la leche agria) redujeron la presión arterial en sujetos levemente hipertensos. En la Figura 9 Daskaya-Dikmen *et al.* (2017) resumen las características estructurales de los péptidos inhibidores de la ECA (que tienen funciones importantes en la actividad inhibidora de la ECA).

#### **2.4. DIABETES MELLITUS TIPO 2**

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracteriza principalmente por la insensibilidad a la insulina como consecuencia de la resistencia a este compuesto, la disminución de la producción de insulina y la eventual falla de las células beta del páncreas, lo cual conlleva a una disminución en el transporte de glucosa al hígado, las células musculares y las células grasas, así debido a los niveles inadecuados de insulina y el aumento de la resistencia a la insulina, se produce hiperglucemia (Olokoba *et al.*, 2012).

Carrillo-Larco y Bernabé-Ortiz (2019) realizaron una revisión para conocer la prevalencia de la DM2 en el Perú, concluyendo que en los últimos años ha aumentado, registrando aproximadamente dos casos nuevos por cada cien personas al año. Seclén (2015) señala que



**Figura 9: Características estructurales de los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-I (ACE)**

FUENTE: Daskaya-Dikmen *et al.* (2017)

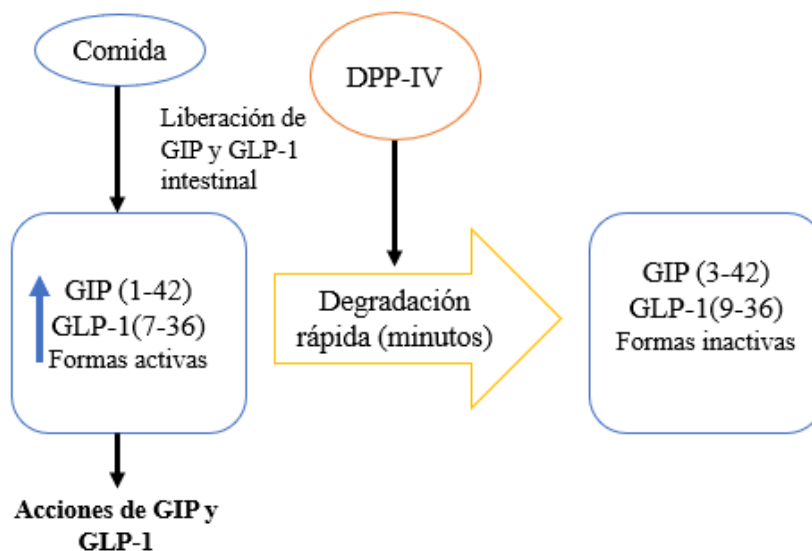
esta tendencia va en aumento debido al estilo de vida de la población peruana, que conlleva a una excesiva ingesta de alimentos con alto contenido calórico como la comida chatarra y bebidas azucaradas, como también reducción de actividad física que producen tasas elevadas de sobrepeso y obesidad.

#### 2.4.1. DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV

La DPP-IV es una glucoproteína conformada por 766 aminoácidos transmembrana, siendo también conocida como adenosina desaminasa o CD26 (Alfonso *et al.*, 2016). La enzima multifuncional DPP-IV es expresada en una variedad de células, particularmente en tejidos epiteliales, como hígado, riñón e intestino (Lorey *et al.*, 2003; Thoma *et al.*, 2003, citados por Lacroix y Li-Chan, 2012). Pérez-Durillo (2016) afirma que su función es degradar de forma rápida (menos de dos minutos) (Figura 10) las incretinas GLP-1 (péptido similar al glucagón-1) y GIP (polipéptido inhibidor gástrico). La primera secretada por las células L



intestinales (íleon y colon) y las segundas producidas por las células K del duodeno, ambas incretinas ejercen el efecto hipoglucemiante (regulación de glucosa) mediante un efecto conocido como efecto incretina y son secretadas debido a la ingesta de carbohidratos en la dieta (Yap- Campos *et al.*, 2017).



**Figura 10: Liberación y degradación de las incretinas GIP y GLP-1**

FUENTE: Ruiz (2007)

#### 2.4.2. PÉPTIDOS HIPOGLUCEMIANTES

Se ha informado que los péptidos bioactivos aislados de hidrolizados de fuentes vegetales y animales tienen un papel crucial en la homeostasis energética, la señalización de insulina y la resistencia con un potencial prometedor para el desarrollo farmacológico en terapias para la diabetes (Billyard *et al.*, 2007; Chakrabarti *et al.*, 2018, citados por Majid y Priyadarshini, 2019).

Wang *et al.* (2015) citados Majid y Priyadarshini (2019) realizaron un estudio sobre granos alimenticios, donde encontraron que los péptidos liberados de las proteínas de avena, trigo sarraceno y cebada exhibieron actividades inhibitoras de la DPP-IV con valores variables de IC50, los valores de IC50 oscilaron entre 0.13 mg/mL (avena) y 8.15 mg/mL (cebada). Vilcacundo *et al.* (2017) realizaron un estudio con quinua *in vitro* y se identificaron tres

péptidos bioactivos de la globulina 11S B (11S globulin B) y la globulina 11S B de almacenamiento (11S seed storage globulin B) con actividad inhibidora de DPP IV,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.

#### **a. MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA DPP-IV**

Nongonierma y FitzGerald (2017) afirman que el mecanismo de inhibición de la DPP IV por péptidos bioactivos se da por inhibición competitiva debido a estos que se unen al sitio activo de la DPP-IV. Esta unión involucra varios subsitios en la molécula de proteína (S1, S1', S2, S2 extenso). Los más estudiados han sido (S1 y S2), el subsitio S1 posee una estructura estrecha y se ha informado que se une a compuestos hidrofóbicos pequeños; mientras que el subsitio S2, que se une a los inhibidores mediante la formación de puentes salinos, es más grande que el sitio S1, por ende, el sitio S2 puede acomodar compuestos más voluminosos que el sitio S1 (Nabeno *et al.*, 2013; Sattigeri *et al.*, 2017 citados por Nongonierma y FitzGerald, 2017).

#### **b. ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

Estudios realizados para comprender las propiedades catalíticas y las funciones de DPP-IV también han llevado a la identificación de varios di, tri y oligopéptidos que presentan actividad inhibitoria a la DPP-IV, varios de estos péptidos contienen prolina y/o aminoácidos hidrófobos dentro de su secuencia (Bella *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 1992, citados por Lacroix y Li-Chan, 2012). Araki *et al.*, (2020) sintetizaron tripéptidos agregando varios aminoácidos al extremo C-terminal de Ile-Pro y Val-Pro, que tienen una actividad inhibitoria especialmente alta, sin embargo, cuando se añadieron aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Met, Val, Trp), la actividad inhibitoria de DPP IV aumentó varias veces.

### **2.5. ENSAYOS *in silico* PARA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Los péptidos derivados de proteínas alimentarias se analizan utilizando diferentes enfoques que involucran estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (Darewicz *et al.*, 2014; Udenigwe, 2014,

citados por Iwaniak *et al.*, 2019).

El primer enfoque citado (*in silico*; empleo de bioinformática) posee múltiples usos en los campos de toxicología (Myatt *et al.*, 2017), farmacéutica (Parenti y Rastelli, 2012) así como también en la elaboración de bases de datos y análisis de proteínas (Pruess y Apweiler, 2003) y de péptidos (Agyei *et al.*, 2019; Kalmykova *et al.*, 2018, citados por Iwaniak *et al.*, 2019).

Y se ha vuelto popular como una herramienta poderosa para el descubrimiento de péptidos bioactivos debido a su tasa más rápida de adquisición y recuperación de resultados, menor uso /consumo de reactivos químicos y bajo costo (Dziuba y Dziuba, 2010; Nongonierma *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019, citados por Iwaniak *et al.*, 2019). Existen diversos trabajos realizados bajo el enfoque *in silico* como el realizado por Udenigwe *et al.*, (2013) quienes evaluaron a la proteína RuBisCO de cereales (arroz, cebada, trigo, avena, sorgo y maíz) como fuentes de péptidos bioactivos y descubrieron que tenían la actividad de inhibir a ECA y DPP-IV.

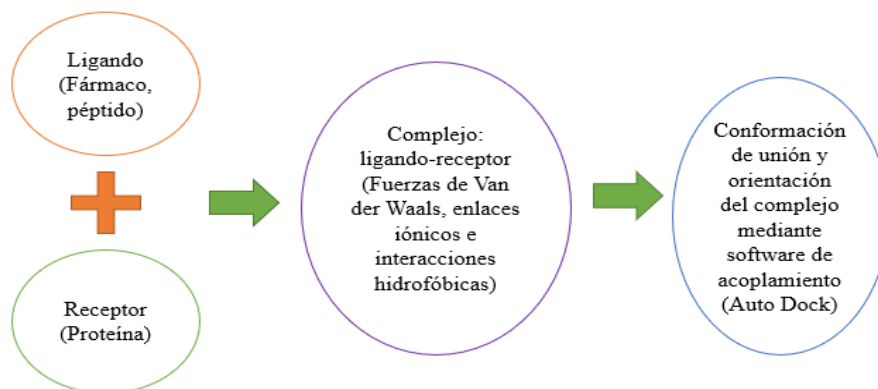
Otro estudio que destaca el empleo de la proteólisis *in silico* es el realizado por Guo *et al.* (2020), quienes evaluaron el potencial de la proteína de la quinua para la liberación de péptidos bioactivos usando la base de datos BIOPEP, concluyendo que la globulina 11S-2 de la quinua se perfila como una buena fuente de péptidos bioactivos inhibidores de ECA y DPP-IV (Guo *et al.*, 2020). Recientemente Barrero *et al.* (2021) encontraron once tipos de péptidos biológicamente activos (obtenidos a partir de la digestión de proteínas de leche de vaca, oveja, cabra y búfalo) con actividades múltiples: estimulantes, inhibidores de renina, inhibidores de DPP-IV, antioxidantes, inhibidores de ECA, inhibidores de DPP-III, agentes hipocolesterolémicos, inhibidores de CaMPDE, reguladores, agentes anticancerígenos e inmunomoduladores.

### **2.5.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (Docking)**

El acoplamiento molecular o *Docking* es la aplicación de modelos basados en computadora para la predicción de la mejor orientación de ajuste de un ligando (péptidos, nueva entidad química o fármacos) que se une a un receptor de interés particular (ej. proteína) (Kitchen *et*

*al.*, 2004). Este método ha ganado popularidad en la comunidad científica por ahorrar tiempo y dinero involucrados en el proceso de desarrollo de fármacos, por ello su uso se ha incrementado entre los investigadores debido a la disponibilidad y fácil uso de los softwares (Gupta *et al.*, 2018).

A continuación, en la Figura 11 se observa el procedimiento general de un acoplamiento molecular.



**Figura 11: Procedimiento general de acoplamiento.**

FUENTE: Gupta et al. (2018)

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La presente investigación realizó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología - Área de Biotecnología Industrial & Bioprocesos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

Para la evaluación *in vitro* se utilizó semillas de quinua de la variedad Pasankalla adquirida del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Sobre las enzimas empleadas en los estudios *in silico* e *in vitro*, se utilizaron en la hidrólisis *in silico* de la proteína de la quinua a la termolisina (EC 3.4.24.27) y para evaluar la estabilidad de los péptidos resultantes frente a la digestión gastrointestinal a la pepsina pH > 2.0 (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina (EC 3.4.21.1) y para la ejecución de la hidrólisis *in vitro* se usó a la enzima termolisina T7902 (de *Geobacillus stearothermophilus*) adquirida de Sigma Aldrich (USA).

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

##### **3.3.1. EQUIPOS**

- Agitador magnético con sensor de temperatura (Heidolph®, modelo 505, Alemania).
- Agitador Vórtex (VELP®Scientific, modelo F202A0175, Europa).

- Incubadora con agitación (Lab Companion®, modelo SI-300R, República de Corea)
- Balanza analítica (OHAUS®, modelo AR2 140, Alemania).
- Baño seco digital (Benchmark®, modelo BSH1004, USA).
- Bomba de vacío (Vacuumbrand®. Modelo ME2C, Alemania)
- Cabina de secado con flujo de aire recirculado (Fravil®, Perú)
- Centrífuga refrigerada (Hettich®, modelo Rotofix 32, Alemania).
- Centrífuga (Hettich®, modelo Rotina 420, Alemania).
- Centrífuga (Eppendorf ®, modelo 5430 R, Alemania).
- Cocina eléctrica (Miray®, modelo CMM-15, China).
- Congeladora (Electrolux®, modelo H300, Brasil).
- Cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) con detector PAD (Water Associates®, modelo 2489, USA).
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific®, Genesys 10 UV, USA)
- Lector de microplacas (Eon Biotek®, modelo Synergy 2, USA).
- Liofilizador (Labconco®, modelo Freezone Benchtop, USA).
- Molino (IKA®, modelo A11 Basic, USA)
- Potenciómetro digital (Thermo Scientific®, Genesys 10 UV, USA).
- Refrigeradora (LG®, modelo GR-482BEF, Corea)

### **3.3.2. MATERIALES**

- Columna C18 Kinetex 1.7  $\mu\text{m}$ , 50 x 4.6 mm (Phenomenex, USA).
- Filtros de jeringa no estéril 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex, Merck, Alemania).
- Materiales de plástico: Tubos de centrífuga de 15 y 50 mL, eppendorf de 1.5, 2.0 y 5 mL, puntas para micropipeta de 10, 200, 1000 y 5000  $\mu\text{L}$ , entre otros.
- Materiales de vidrio: Placas Petri, bureta, matraz erlenmeyer, vaso precipitado, pipetas graduadas, fiolas, tubos de ensayo, probetas graduadas.
- Micropipetas de 0.5-10; 20-200; 100-1000; 1000-5000  $\mu\text{L}$  (Brand, Alemania).
- Papel de filtro Whatman N°1 (Sigma-Aldrich Inc., USA).
- Tamices de malla de 500  $\mu\text{m}$  (Tyler, USA).

- Membrana de celulosa para tubos de diálisis de 21 mm de diámetro (D9652 Sigma-Aldrich Inc., USA).

### **3.3.3. REACTIVOS**

- Acetonitrilo grado HPLC (Fermont, México).
- Ácido clorhídrico 37% (J.T. Baker, México).
- Ácido bórico (Sigma Aldrich, USA).
- Ácido hipúrico 98% (Sigma, USA).
- Ácido picrilsulfónico 5% (Sigma Aldrich, India)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma, USA).
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich, USA)
- Enzimas: Enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA) de pulmón de conejo (Sigma Aldrich, USA) y dipeptidil peptidase IV humana recombinante (Sigma Aldrich, USA).
- Éter de petróleo (J.T. Baker, USA)
- Folin Ciocalteau 2N (Merck, Alemania).
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Gly-Pro p-nitroanilide hydrochloride (Sigma Aldrich, USA).
- Hidróxido de sodio (Merck, Alemania).
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratada 95% (Sigma Aldrich, USA).
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99% (Sigma Aldrich, USA)
- Tris base (Sigma Aldrich, USA).

### **3.3.4. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS**

Las herramientas bioinformáticas empleadas en la presente investigación se exponen a continuación:

**a. NCBI**

La NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) una base de datos que alberga una gran cantidad de secuencias proteicas (Xu y Xu, 2004), fue empleada para conocer la secuencia de aminoácidos de la proteína del tipo globulina de la quinua a ser empleada en el estudio *in silico*.

**b. BIOPEP**

BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/>) es una herramienta que permite simular una hidrólisis enzimática utilizando ciertas proteasas y estimar la liberación de péptidos bioactivos (Panjaitan et al., 2018). Contiene detalles de las estructuras de los péptidos bioactivos, así como su probable bioactividad (inhibidores de la ECA o DPP-IV, antioxidantes, otros) (Nongonierma et al., 2015).

**c. PEPTIDE RANKER**

Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) es un tipo de base de datos que proporciona ciertas clases de péptidos bioactivos con características estructurales específicas (Qiao et al., 2018). Mide la bioactividad teórica de los péptidos, presentando como valores de puntuación de 0 (la más pobre bioactividad) a 1 (mejor bioactividad) (Guo et al., 2020).

**d. PEPTIDE 2.0**

Peptide 2.0 ([https://www.peptide2.com/N\\_peptide\\_hydrophobicity\\_hydrophilicity.php](https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php)) es un servidor en línea que permite calcular la hidrofobicidad de los péptidos.

**e. TOXINPRED**

ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) es un método *in silico* único en su tipo,



útil para predecir la toxicidad de péptidos/proteínas y además útil para diseñar péptidos menos tóxicos y descubrir regiones tóxicas en proteínas (Gupta et al., 2013).

### **3.3.5. PROGRAMAS PARA ACOPLAMIENTO MOLECULAR**

#### **a. PEP-FOLD3**

PEP-FOLD3 es un marco computacional novedoso, que permite la predicción libre o sesgada para péptidos lineales entre 5 y 50 aminoácidos y la generación de conformaciones de péptidos similares a los nativos que interactúan con una proteína cuando el sitio de interacción se conoce de antemano (Lamiable et al., 2016).

#### **b. AVOGADRO**

El programa Avogadro es un editor y visualizador de moléculas con avanzado diseñado para uso multiplataforma en química computacional, modelado molecular, bioinformática, ciencia de materiales y áreas relacionadas (Hanwell et al., 2012).

#### **c. PUBCHEM**

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) es un repositorio público de información sobre sustancias químicas y sus actividades biológicas (Kim et al., 2016).

#### **d. AUTODOCK**

De acuerdo con Forlì et al. (2016) Auto Dock es un paquete de software empleado para el acoplamiento computacional y la detección virtual de moléculas pequeñas en receptores macromoleculares. Gromiha (2010) señala que el paquete consta de tres programas aplicados secuencialmente, AutoTools, AutoGrid4 y AutoDock4: (1) AutoTools se usa para preparar al ligando y proteína antes de la interacción; (2) AutoGrid4 calcula la energía no covalente de interacción entre la parte rígida del receptor y un átomo de sonda que se encuentra en varios puntos de la rejilla de la red, generando un mapa de cuadrícula de potencial

electrostático y un mapa de desolvatación; y (3) AutoDock4 usa el conjunto de mapas de cuadrícula y la parte flexible del receptor para guiar el proceso de acoplamiento de los ligandos seleccionados.

**e. PROTEIN DATA BANK**

El Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) se define como el único archivo mundial de datos estructurales de macromoléculas biológicas (Berman et al., 2000), entre ellos proteínas.

**f. PYMOL**

PyMOL, una herramienta de gráficos moleculares multiplataforma se ha utilizado ampliamente para la visualización tridimensional (3D) de proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, densidades de electrones, superficies y trayectorias (Yuan et al., 2017).

**g. DISCOVERY STUDIO**

De acuerdo a Pawar et al. (2021) Discovery Studio es una interfaz gráfica unificada para el diseño avanzado de fármacos y la investigación de modelos de proteínas. Este software proporciona varios de visores para mostrar gráficos y representaciones gráficas de datos.

**3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

**3.4.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE POR EL MÉTODO DE LOWRY**

El contenido de proteína soluble fue determinado según la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951). En este método se utiliza ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, también conocido como reactivo de Folin-Ciocalteu, que interactúa con los iones cuprosos y las cadenas laterales de tirosina, triptófano y cisteína para producir un color azul verdoso que

puede detectarse entre 650 nm y 750 nm (Shen,2019).

Se mezclaron 400  $\mu$ L de la muestra hidrolizada con 2 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 por ciento en 0.1 M de NaOH,  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 0.5 por ciento en agua destilada y tartrato de sodio al 1 por ciento en agua destilada, en la proporción (100:1:1), incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Seguido se añadió 200  $\mu$ L del reactivo Folin Ciocalteu 1N y el conjunto se agitó e incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego, se leyó la absorbancia a 650 nm. Los resultados se determinaron con la ayuda de una curva estándar utilizando una solución de BSA como patrón, en un rango de concentración de 0.5 - 3 mg/mL y fueron expresados en mg/mL. Para el blanco se sustituyó la muestra hidrolizada por 400  $\mu$ L de una solución acuosa de cloruro de sodio al 0.9 por ciento.

### **3.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTAL DE KJELDAHL**

Se determinó el contenido de proteína total en el concentrado proteico como en la fracción globulina de quinua utilizando el método de Kjeldahl, según el método 984.13 (AOAC 1995). La primera etapa del procedimiento es la digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, donde el nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio, que al someterlo a hidróxido de sodio libera amoníaco, que se separa por destilación y se recoge en un matraz receptor del exceso de ácido bórico, formando borato de amonio. El ácido bórico residual luego se titula con un ácido estándar con el uso de un indicador de punto final adecuado para estimar el contenido total de nitrógeno de la muestra (Jiang *et al.*, 2014 y Goulding *et al.*, 2020). Después de la determinación del nitrógeno total, el factor de conversión de proteína usado fue de 5.85 (Cisneros, 2017).

### **3.4.3. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS**

Se determinó mediante el método reportado por Adler – Nissen (1979) con ligeras modificaciones, la reacción se basa en la determinación de los grupos amino libres con ácido 2,4, 6- trinitrobenceno-1-sulfónico (TNBS). Debido a que las aminas primarias reaccionan con el TNBS forman un cromógeno que es detectado a 340 nm. En primer lugar, en un tubo

de ensayo se agregó 0.5 mL de buffer fosfato de potasio 5mM (pH 8.0), luego 63 µL de muestra proteica hidrolizada y 0.5 mL de una solución de ácido picrilsulfónico (TNBS, 1 mg/mL).

En ausencia de luz se procedió a agitar e incubar en baño maría a 50 °C durante un tiempo de 60 minutos. Para detener la reacción se agregó 1 mL de HCl 0.1N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se añadió 2 mL agua destilada y se dejó durante 10 minutos más, seguidamente se procedió a leer la absorbancia a 340 nm. Para la preparación del blanco se reemplazó la muestra por 63 µL de una solución de SDS al 1 por ciento en agua. Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$GH (\%) = 100 \times [(AN_2 - AN_1) / Npb]$$

Donde:

GH: Grado de hidrólisis

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

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

Npb: Es el contenido de nitrógeno amínico de los enlaces peptídicos en el sustrato (concentrado proteico), el cual se determinará después de la hidrólisis total con HCl 6 M a 110 °C por 24 h.

Los valores de AN<sub>2</sub> y AN<sub>1</sub> fueron obtenidos a partir de una curva estándar a 340 nm de absorbancia versus mg/L nitrógeno amino generado con L-leucina (concentración en el rango entre 0.4 a 2.5 mM).

#### **3.4.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA *in vitro***

Para la determinación de la actividad inhibidora de la ECA se utilizó el método de Wu et al. (2002) modificado por Chirinos et al. (2021). Brevemente, la reacción se realizó con 50 µL de solución de hipuril histidil leucina (HHL, sustrato), 10 µL de la muestra (hidrolizado

proteico) y 10  $\mu$ L de 2 mU de ECA (preparados en buffer borato salino BBS 100 mM, conteniendo 300 mM de NaCl, pH 8.3) a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando 85  $\mu$ L de HCl 1N. Un control y blanco compuestos por la misma mezcla de reacción, donde para el control los 10  $\mu$ L de la muestra fue reemplazado 10  $\mu$ L de buffer borato y para el blanco se empleó 10  $\mu$ L de la solución de ECA inactivada (con 1N HCl). Las soluciones se pasaron por un filtro 0.22  $\mu$ m Millipore, tipo GV (Millex, Merck, Alemania) previo al análisis por UPLC-PAD. La detección y cuantificación del ácido hipúrico (AH, producto formado a partir del HHL) y HHL, se realizó a 229 nm. Las muestras (2  $\mu$ L) se inyectaron por una columna Kinetex C18 RP (50 x 4,6 mm; 1.7  $\mu$ m) (Waters, Milford, USA) con guarda columna. Se emplearon dos solventes: (A) 0.05% ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 0.05 % TFA en acetonitrilo. La corrida total se realizó en 6 min, a 30 °C bajo un flujo de 0.5 mL/min. La actividad inhibitoria de la ECA fue calculada de la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria de la ECA (\%)} = \frac{[(Ac - As)]}{(Ac - Ab)} * 100$$

Donde:

Ac= Concentración del AH del control

As = Concentración del AH de la muestra

Ab = Concentración del AH del blanco

Los resultados se expresaron en porcentaje para una determinada concentración de proteína (en este estudio a 1 mg proteína/mL). El valor IC<sub>50</sub> se define como la concentración de hidrolizado proteico que permite una inhibición del 50 por ciento de la actividad inhibitoria de la ECA expresada en mg proteína/mL. Para su determinación se evaluaron concentraciones en un rango de 0.25 a 1.5 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinó mediante un análisis de regresión entre los valores inhibición de la ECA (porcentaje) frente al log de la concentración de la proteína (mg proteína/mL).

### 3.4.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA DPP-IV *in vitro*

La actividad inhibidora de DPP-IV se midió en placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo descrito por Silveira et al. (2013) citado por Vilcacundo et al. (2017). Brevemente, se incubó la DPP-IV (0.26 mU por pocillo de prueba; 15  $\mu$ L) a 37 °C en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de muestras (hidrolizados proteicos, volumen final 50  $\mu$ L por pocillo) durante 10 minutos. Se utilizó diprotina A como control positivo. Seguidamente se añadió a cada pocillo un volumen de 50  $\mu$ L de una solución de H-Gly-Pro-p-nitroanilina (sustrato) a una concentración final de 100  $\mu$ M. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de microplaca (Biotek Instrument, Eon, USA) a intervalos de 2 min, por un tiempo de hasta 20 min. Los valores de absorbancia fueron ploteados versus el tiempo. Para los cálculos se consideró la porción de la línea recta de la reacción tanto de las muestras, como del control. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (a una concentración de muestra evaluada en mg/mL) de la siguiente forma:

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

Donde:

$V_{\text{control}}$  = pendiente del control (donde en lugar de muestra está la solución buffer)

$V_{\text{muestra}}$  = pendiente de muestra a evaluar

Para la determinación del valor IC50 se evaluaron concentraciones de los hidrolizados en un rango de 1 a 7 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinó mediante un análisis de regresión entre los valores inhibición de la DPP-IV (porcentaje) frente al log10 de la concentración de la proteína (mg proteína/mL).

### **3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.5.1. OBTENCIÓN *in silico* DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA E HIPOGLUCEMIANTE A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DEL TIPO GLOBULINAS DE LA QUINUA**

##### **a. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA**

Se tomaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas globulinas de quinua a partir de la base de datos NCBI bajo formato FASTA, se analizaron las secuencias elegidas por Guo et al. (2020) quienes usaron como criterio de elección las proteínas globulinas con mayor posibilidad aparición de péptidos bioactivos. A continuación, se listan:

- 13S globulin seed storage protein 2-like (Referencia de la secuencia XP\_021752668.1)
- 13S globulin seed storage protein 1-like (Referencia de la secuencia XP\_021752233.1)
- 11S globulin seed storage protein 2-like (Referencias de la secuencia XP\_021770184.1)
- 11S seed storage globulin (Referencia de la secuencia AAS67036.1)

##### **b. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA COMO PRECURSORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS USANDO LA BASE DE DATOS BIOPEP**

Las secuencias de proteínas obtenidas de la base de datos NCBI para las globulinas de la

quinua seleccionadas, fueron introducidas a la base de datos BIOPEP y sometidas a proteólisis, con la enzima termolisina. Una vez realizada la proteólisis se obtuvo como resultado a las fracciones de péptidos generados de la reacción.

Las proteínas que generaron péptidos con las actividades bioactivas buscadas (inhibición de la ECA y DPP-IV), fueron evaluadas mediante los parámetros: A, AE y W, calculados por el programa, los cuales se describen a continuación:

El parámetro de evaluación A, indica la frecuencia de aparición de péptidos con una actividad dada en una proteína (Iwaniak, et al., 2019). Este valor fue calculado por el programa BIOPEP mediante la siguiente ecuación (1):

$$A = a/N \dots\dots\dots\text{eq (1)}$$

Donde:

a = Número de fragmentos con actividad determinada en la secuencia de la proteína.

N = Número de residuos de aminoácidos en la secuencia de la proteína.

El parámetro A<sub>E</sub> define la frecuencia de liberación de péptidos con una bioactividad determinada por enzimas seleccionadas (Guo *et al.*, 2020), también calculado por el programa BIOPEP mediante la ecuación (2):

$$A_E = d/N \dots\dots\dots\text{eq (2)}$$

Donde:

d = Número de péptidos con actividad dada liberada de la secuencia de la proteína por la enzima seleccionada.



N= Número de residuos de aminoácidos en la proteína.

Finalmente, la frecuencia relativa de liberación de péptidos con actividad determinada por la enzima seleccionada (W) (Guo *et al.*, 2020), bajo la ecuación 3:

$$W = A_E / A \dots\dots eq (3)$$

Donde:

A<sub>E</sub>: La frecuencia de liberación de fragmentos con una actividad determinada por enzimas seleccionadas.

A: La frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos en una secuencia de proteínas (de la Ecuación).

De los péptidos resultantes con los mejores valores encontrados y que presentasen mas de tres aminoácidos fueron evaluados en el programa PeptideRanker para el cálculo de su bioactividad teórica, con resultados en puntuación entre 0 (pobre bioactividad) a 1 (mejor bioactividad).

Adicionalmente el programa BIOPEP calculó el grado de hidrólisis teórico (DH<sub>t</sub>) (Langyan *et al.*, 2021) alcanzada con la proteólisis in silico para cada proteína, mediante la ecuación:

$$DH_t = d/D * 100 \dots\dots eq (4)$$

Donde:

d = Número de enlaces peptídicos que se hidrolizan

N= Número total de enlaces peptídicos presentes en la secuencia primaria de la proteína

### **c. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS FRENTE A LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL**

Se evaluó la estabilidad de los péptidos con las mejores propiedades de inhibición de la ECA y la DPP IV obtenidos *in silico* (del análisis previo) simulando condiciones de digestión gastrointestinal, ello con la finalidad de ver si sufren una mayor hidrólisis o si se mantienen. Para ello se siguió la metodología de Guo *et al.* (2020), así los péptidos generados y seleccionados de la etapa anterior, fueron evaluados nuevamente *in silico* con el programa BIOPEP, considerando una hidrólisis con las enzimas: pepsina pH > 2.0 (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina (EC 3.4.21.1), simulando el proceso de digestión gastrointestinal.

La secuencia de péptidos resultantes luego de la simulación frente a la digestión (pudiendo ser fracciones de péptidos más pequeñas, aminoácidos o los péptidos intactos), fueron nuevamente evaluados en las propiedades bioactividades bajo estudio.

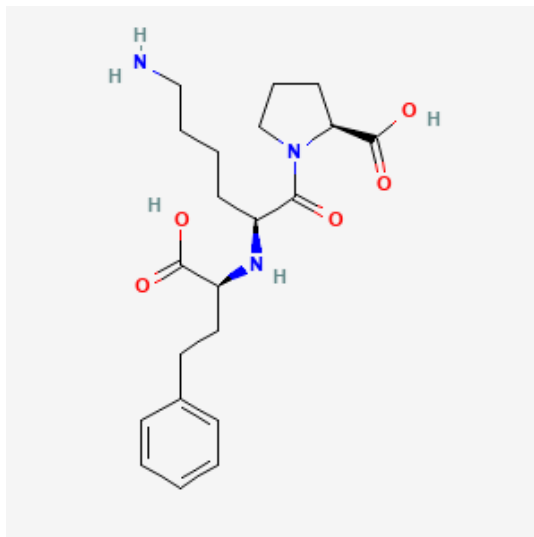
### **d. CARACTERIZACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD Y TOXICIDAD DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD**

Los péptidos que demostraron tener mayor bioactividad con PeptideRanker y BIOPEP (específicamente para tener actividad de inhibición de ECA y DPP-IV), antes y después de la digestión gastrointestinal fueron sometidas a evaluación para conocer su hidrofobicidad, la cual fue determinada por el programa Peptide 2.0. Por otro lado, la característica de toxicidad fue determinada con la base datos Toxin Pred.

### **e. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) DE LOS PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD FRENTE A LAS ENZIMAS ECA Y DPP-IV**

#### **e.1. DOCKING DE LOS PÉPTIDOS PR Y IPPG CON LA ENZIMA ECA (PDB: 1O8A)**

Para la realización del estudio con la enzima convertidora de angiotensina humana (PDB 1O8A) se empleó como ligando control el lisinopril (Figura 12). El docking en esta etapa se realizó con los péptidos IPPG y PR.



**Figura 12: Estructura química del lisinopril, fármaco inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina usado principalmente en el tratamiento de la hipertensión**

FUENTE: National Center for Biotechnology Information (2022)

### **e.1.1. Preparación de los ligandos**

El lisinopril (control) se obtuvo a partir de la estructura cristal 1O86, mientras que el IPPG se obtuvo a partir del programa PEP-FOLD y el PR se obtuvo de la librería Pubchem en 3D. A todos ellos se les preparó agregando grupos OH de los carboxilos terminal con el programa Avogrado, las cargas de Gasteiger-marsili y enlaces rotables con el programa AutoDock Tools (todo ello de acuerdo a los requerimientos de las moléculas) y el producto resultante por molécula, se guardó en archivo de extensión pdbqt.

### **e.1.2. Preparación de la proteína**

La proteína convertidora de angiotensina (1O8A) fue obtenida de la base de datos

ProteinDataBank. La preparación de la proteína se llevó a cabo en el programa AutoDockTools, guardándose el resultado en archivo bajo formato pdbqt, para su posterior uso.

### **e.1.3. Preparación de la proteína con el ligando**

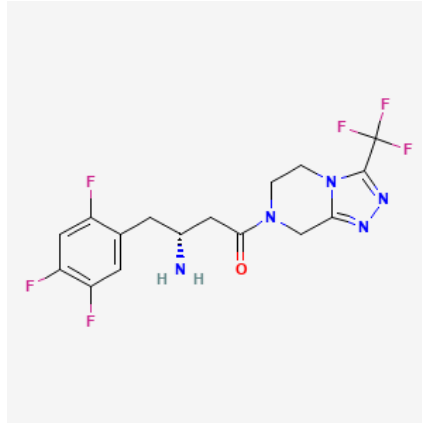
En el programa AutoDockTools, se preparó los ligandos (péptidos) y la proteína diana (ECA), tomando en consideración los formatos con extensión pdbqt previamente elaborados. Se preparó la caja en grid (representación en cuadrículas en 3D) con un tamaño de 60 Å<sup>3</sup> a 375 Å<sup>3</sup> para el análisis de docking dirigido centrado a las coordenadas del Zn (metal que forma parte de la enzima ECA), se ajustaron las coordenadas x, y & z de la caja de acuerdo con el espacio del sitio activo de cada proteína, siguiendo lo recomendado por Sixto-Lopez y Correa-Basurto (2021).

### **e.1.4. Docking**

Se procedió a correr las muestras de la etapa previa bajo la forma autogrid4 y autodock4 de cada ligando (péptido) con cada la proteína (ECA), producto de ello se obtuvieron las interacciones que se podían establecer, obteniéndose un archivo: ligando.dlg. En AutoDockTools se analizó el archivo dlg obteniéndose los mejores  $\Delta G$  (energía libre, menor  $\Delta G$ ) de cada ligando con la proteína, se guardó este en formato ligando.pdb. Posteriormente con el programa PyMol, se obtuvieron los aminoácidos con los que interactúa cada uno de los péptidos con la proteína (ECA) para finalmente con el programa Discovery studio visualizar dichas interacciones.

## **e.2. DOCKING DE LOS PEPTIDOS IPPG Y SPH EN LA ENZIMA DPP-IV (PDB:1X70)**

Para la realización del estudio con la enzima DPP-IV (PDB 1X70) se empleó como ligando control el 715 (Sitagliptina) (Figura 13). El docking en esta etapa se realizó con los péptidos: SPH y IPPG.



**Figura 13: Estructura química del ligando 715 (Sitagliptina), fármaco inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa- IV (DPP-IV) usado para mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2**

FUENTE: National Center for Biotechnology Information (2022)

### **e.2.1. Preparación de los ligandos**

El ligando 715 se obtuvo del cristal 1X70 mientras que SPH y IPPG se obtuvieron del programa PEP-FOLD, posteriormente se agregaron los OH de los ácidos carboxílico terminal con el programa Avogadro. Se agregaron cargas de Gasteiger-marsili y enlaces rotables con el programa AutoDock Tools generándose un archivo de extensión pdbqt por cada molécula.

### **e.2.2. Preparación de la proteína**

La proteína dipeptidil peptidasa IV (PDB 1X70) se obtuvo de la base de datos ProteinDataBank. La preparación de la proteína se llevó a cabo en el programa AutoDockTools. A la proteína se le agregaron cargas de Kollman, seleccionándose únicamente los hidrógenos polares, la proteína preparada se guardó en un archivo en formato pdbqt para su posterior uso.

### **e.2.3. Preparación de la proteína con el ligando**

En el programa AutoDockTools, se abrieron los archivos de la proteína y péptidos en formato pdbqt y se preparó la caja en grid con un tamaño de 60 Å<sup>3</sup> a 375 Å<sup>3</sup> para el de análisis de docking dirigido, focalizando el grid center al carbono  $\alpha$  del Glu206, debido a que es un residuo importante en el sitio activo de la enzima (Aertgeerts et al., 2004), posteriormente se ajustaron las coordenadas x, y & z de la caja de acuerdo con el espacio del sitio activo de la proteína y el producto resultante se guardó en archivo con extensión gpf siguiendo el procedimiento reportado por Sixto-López y Correa-Basurto (2021).

### **e.2.4. Docking**

Se procedió a correr los archivos en autogrid4 y autodock4 de cada ligando (péptido) con con la proteína (enzima DPP-IV), obteniéndose un nuevo archivo con extensión dlg. En AutoDockTools se analizó el archivo dlg, de ahí se obtuvieron los mejores  $\Delta G$  (menor  $\Delta G$ ) de cada ligando con la proteína, guardándose los resultados en archivo de formato lpdb, posteriormente con el programa PyMol, se obtuvieron los aminoácidos con los que interactúa cada uno de los péptidos con la proteína.

## **3.5.2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON TERMOLISINA *in vitro* CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA E HIPOGLUCEMIANTE A PARTIR DE FRACCIÓN GLOBULINA Y DEL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA**

### **a. PREPARACIÓN DE LA HARINA DE QUINUA**

La preparación de harina a partir de granos de quinua variedad Pasankalla se realizó siguiendo la metodología de Guerrero-Ochoa et al. (2015) con algunas modificaciones (Figura 14) y se describe a continuación:

**Limpieza:** Para eliminar todo el material extraño de las semillas de quinua como piedras, pajas, hojas, etc. Se determinó la humedad inicial del grano.

**Lavado:** Con la finalidad de eliminar las saponinas del grano de quinua.

**Secado:** A una temperatura de 50 °C, hasta que las semillas llegaron a una humedad de 8-10%.

**Molienda:** Se molieron las semillas usando un molino de laboratorio para reducir el tamaño de partícula.

**Tamizado:** La harina de quinua pasó por un tamiz Tyler malla N°35.

**Desgrasado:** La harina resultante se desgrasó por 12 h usando éter de petróleo como solvente, en una relación harina: disolvente de 1: 4 (p/v) bajo condiciones de agitación (300 rpm) y a temperatura ambiente.

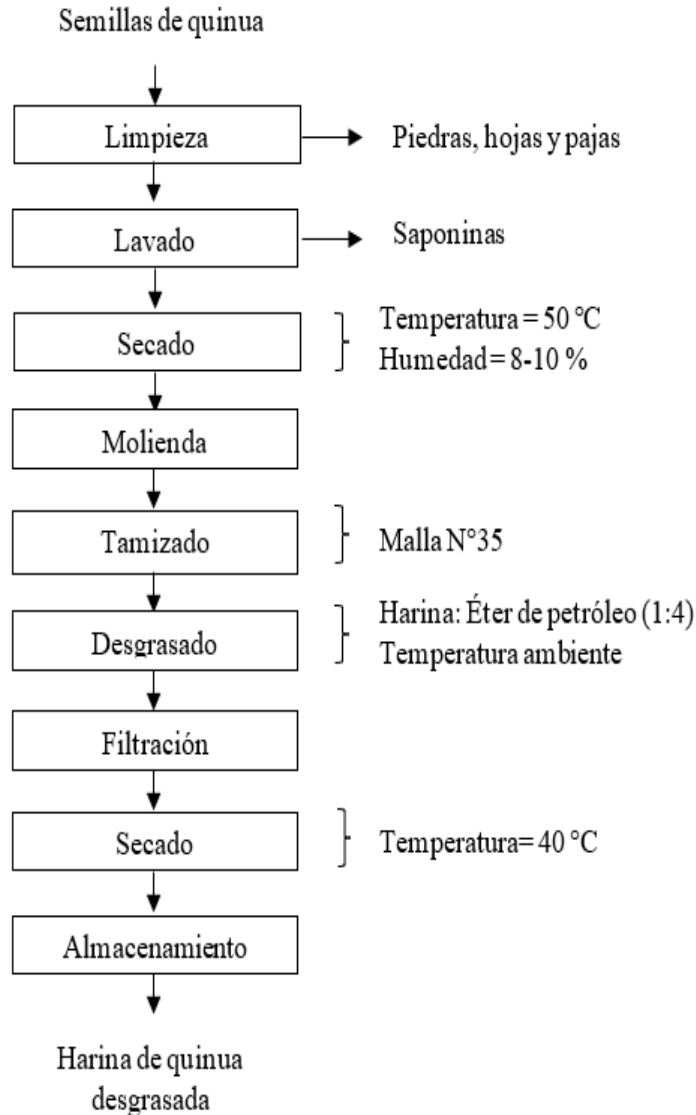
**Filtración:** Se filtró la mezcla a través del papel Whatman N° 1 en condiciones de vacío para separar el éter de petróleo con la grasa extraída de la harina de quinua.

**Secado:** Luego la harina de semillas de quinua desgrasada se colocó en una estufa con circulación de aire a 40 °C por 1 h con la finalidad de eliminar el solvente residual.

**Almacenamiento:** La harina desgrasada se empacó en bolsas de polietileno y se conservaron a temperatura ambiente.

## **b. OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA**

La obtención del concentrado de proteína de quinua (CPQ), se realizó, según el método descrito por Guerrero-Ochoa *et al.* (2015). A continuación, se describe el proceso (Figura 15):



**Figura 14: Diagrama de flujo para la obtención de harina de quinua desgrasada**

**Extracción alcalina sólido-líquido:** Se pesó 20 gramos de la harina desengrasada y se llevó a condiciones alcalinas de pH 10.0, con NaOH 1N, utilizando la proporción harina: agua destilada de 1:20 (p/v). Esta solución se mantuvo por 90 minutos bajo agitación a 200 rpm y a la temperatura de ~ 30 °C.

**Centrifugación:** La solución se centrifugó inmediatamente a 6000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante.



**Precipitación ácida:** El sobrenadante se llevó a un pH entre (4 - 4.5) con HCl 1N, se llevó a reposo (4 °C por 10 minutos), luego el conjunto se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos. La torta residual se lavó dos veces con agua destilada acidulada a pH 4.5, en la proporción precipitado: agua de 1:3 (p/v), se procedió a reposar (4 °C por 10 minutos), seguido de una centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos. El precipitado lavado fue suspendido en agua destilada y llevado a pH 7, con NaOH 1 N.

**Liofilización:** La suspensión final fue liofilizada y se almacenó en congelación (- 20 °C) en bolsas de polietileno, para la posterior hidrólisis.

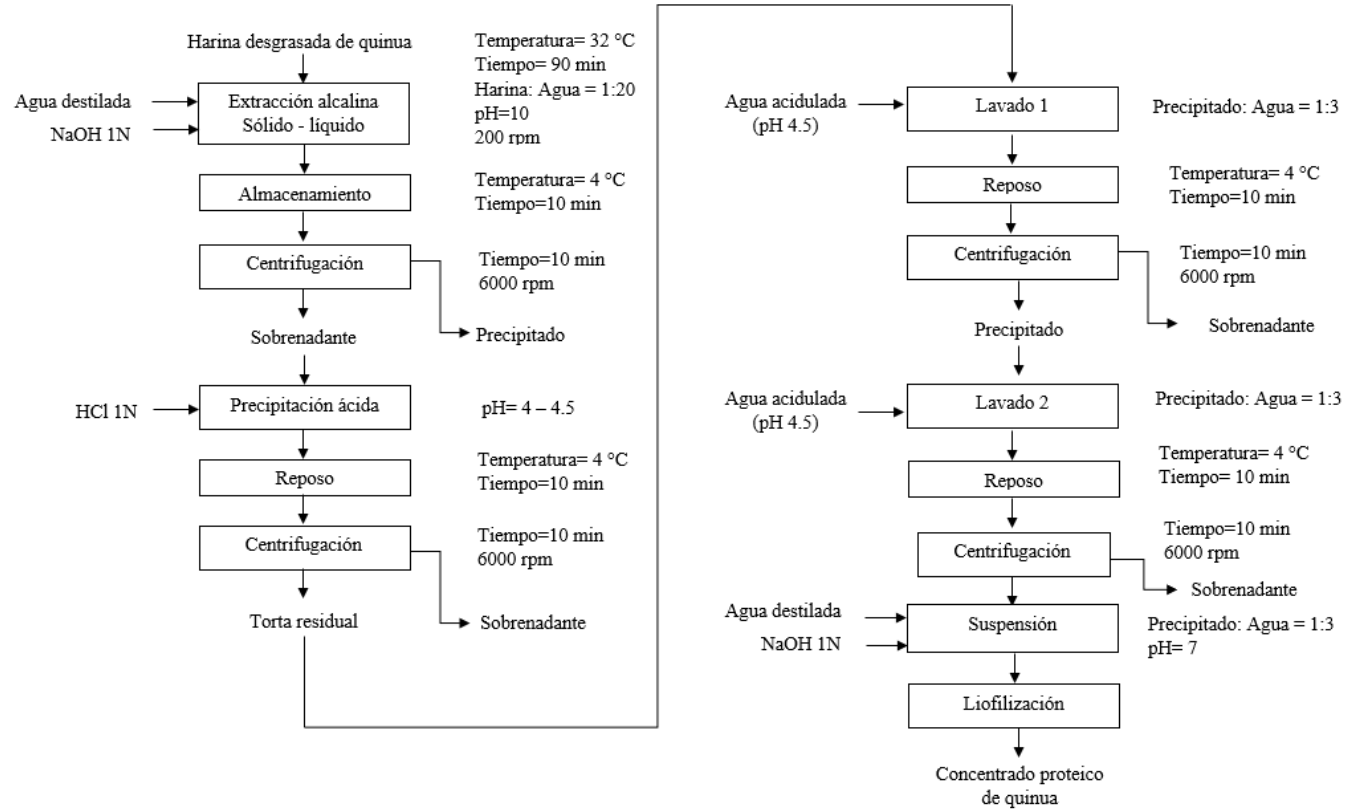
El contenido de proteína total, del concentrado liofilizado, se cuantificó por el método Kjeldahl, considerando el factor de 5.85 (Guerreo-Ochoa *et al.* 2015).

En la Figura 15 se presente el diagrama de flujo para la obtención de concentrado de proteína de quinua.

### c. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN GLOBULINA DE QUINUA

El fraccionamiento proteico se realizó según el método de Osborne descrito por Van de Vondel *et al.* (2020) con algunas modificaciones. En este caso se procedió a la extracción de las fracciones: albúmina y globulina, debido a que solo la fracción globulina era de interés para esta investigación. A continuación, se describe el proceso:

**Albúminas:** Se pesaron 20 gramos de la harina desengrasada y se suspendió en agua MilliQ utilizando proporción (muestra: agua) de 1:10 (p/v). Esta solución se mantuvo durante 10 minutos en agitación a 150 rpm a temperatura ambiente. Luego inmediatamente la solución se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, donde se recuperó el sobrenadante. Este mismo procedimiento se realizó por segunda vez obteniéndose un segundo sobrenadante. El residuo obtenido fue empleado para la obtención de la fracción globulina.



**Figura 15: Diagrama de flujo para la obtención de croncentrado proteico de quinua.**

**Globulinas:** El residuo obtenido del paso anterior fue suspendido en una solución de NaCl 0.4 M en la proporción 1:10 (p/v), luego se procedió durante 10 minutos a una agitación a 150 rpm a temperatura ambiente. Se centrifugó a las mismas condiciones de que la etapa anterior, se recuperaron dos sobrenadantes (primera y segunda extracción), ambos fueron mezclados y almacenados en congelación para ser liofilizados.

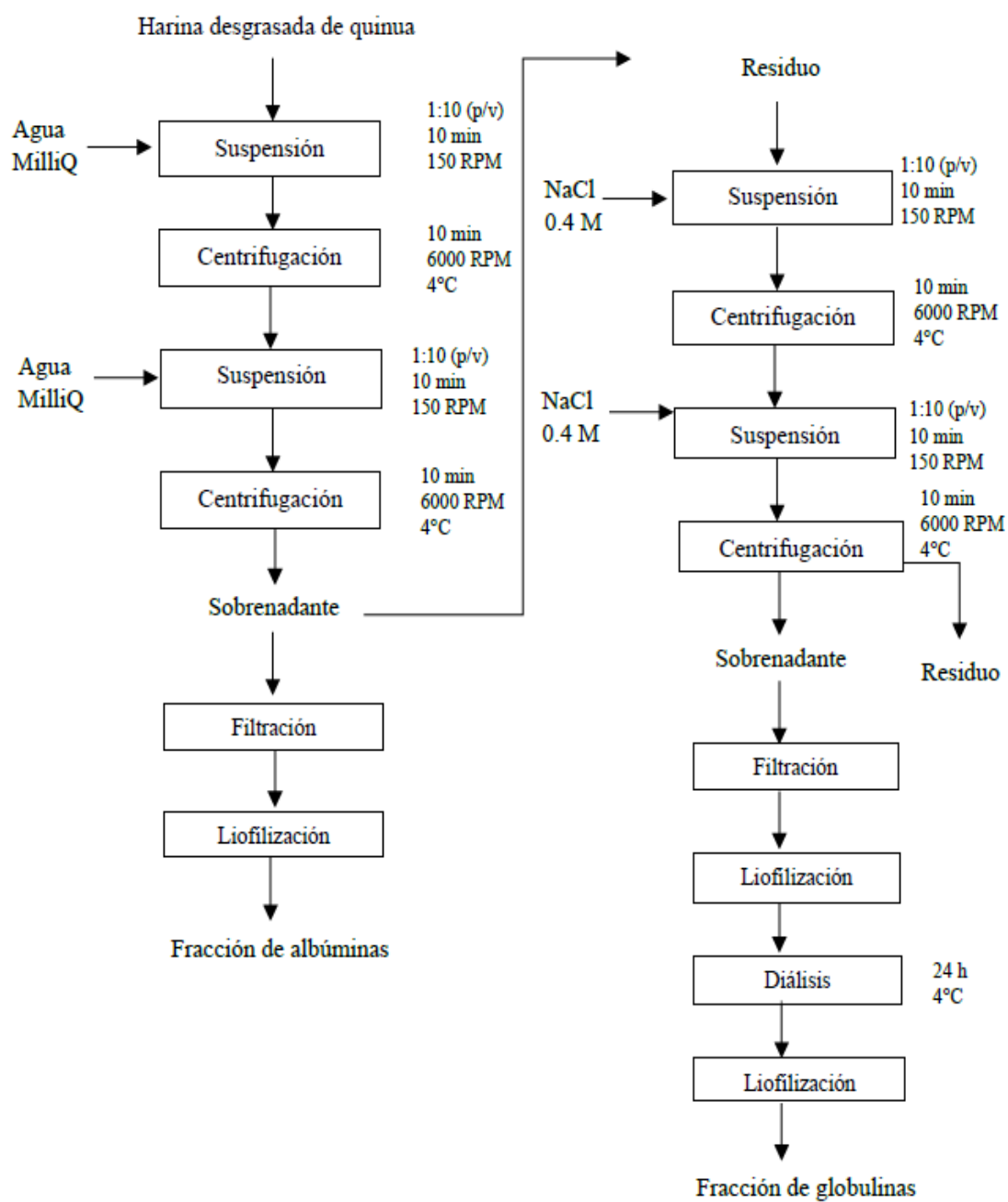
Obtenido el liofilizado, este pasó por el proceso de diálisis con la finalidad de eliminar la sal del producto, para ello el liofilizado se diluyó en agua milliQ a una relación 1:2 (p/v) y el conjunto se colocó en membranas de celulosa (límite de peso molecular :14 kDa), que fueron cuidadosamente cerradas y fueron sumergidas en buffer fosfato de potasio 10 mM (pH 8.0) a la relación solución: buffer de 1:100, el conjunto se sometió a agitación constante, a 4 °C durante 24 h. Finalmente, la solución dializada fue nuevamente liofilizada obteniéndose la fracción globulina, a la que se le determinó el contenido de proteína total.

En la Figura 16 se observa el diagrama de flujo para la obtención de fracciones proteicas de quinua.

#### **d. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

La fracción globulina (G) y concentrado proteico (CPQ) de quinua pasaron por hidrólisis enzimática de manera separada, para ello se empleó la enzima termolisina (endopeptidasa) a una relación enzima: proteína (E:S, 1:100), a un pH inicial de 8.0 y temperatura de 50 °C (Esteve *et al.*, 2015).

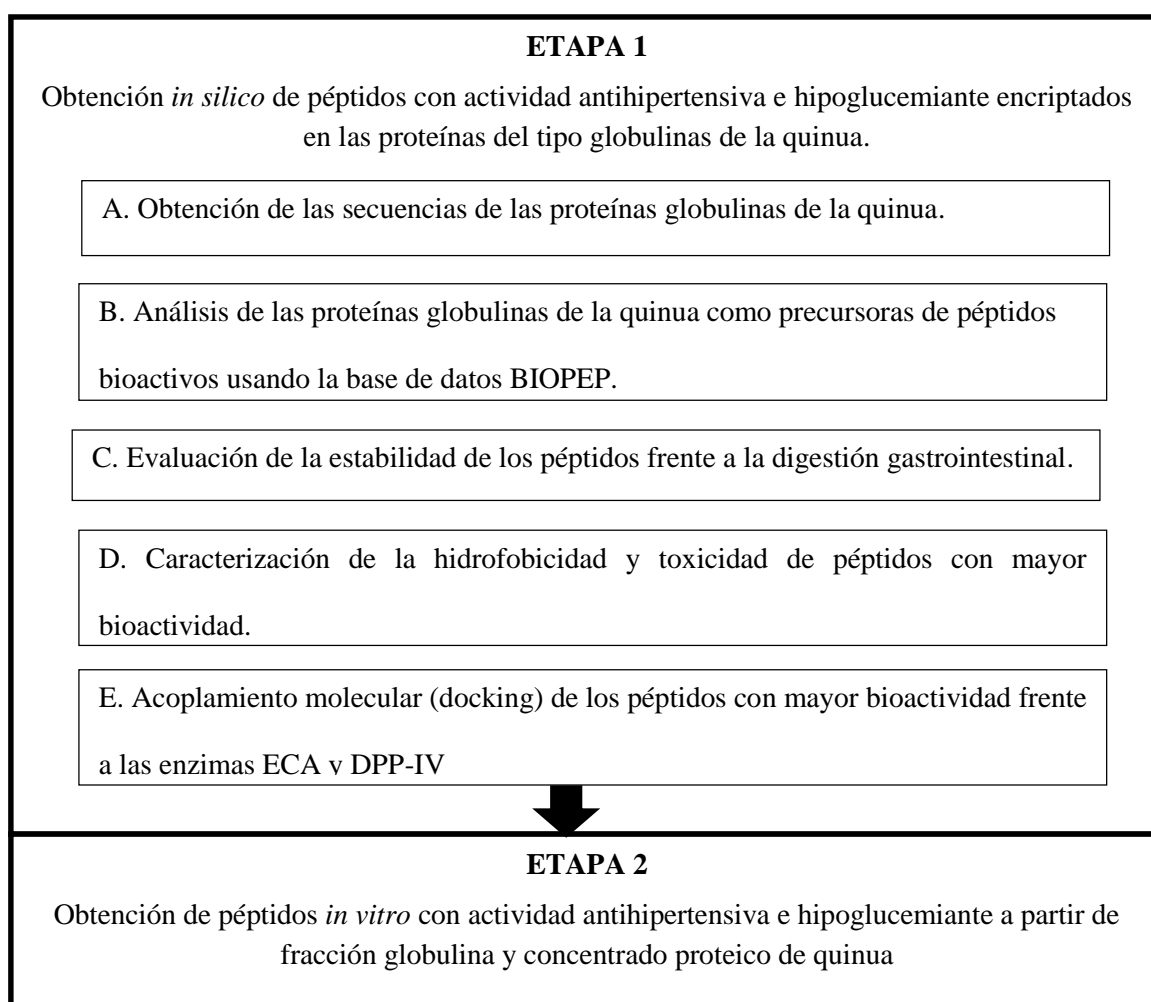
**Hidrólisis enzimática:** La reacción se realizó en erlenmeyers de 50 mL, conteniendo inicialmente 10 mL de solución a una concentración de 2.5 por ciento (p/v) de proteína disuelta en buffer fosfato de potasio 5 Mm (pH 8). La hidrólisis inició con la adición de la enzima termolisina a un pH 8 por un tiempo total de 4 horas, bajo agitación constante (150 rpm) y a temperatura controlada (50 °C), mediante un agitador magnético con baño maría. Se detuvo la reacción mediante inactivación térmica a 100 °C por 10 minutos.



**Figura 16: Diagrama de flujo para la obtención de fracciones proteicas de quinua**

**Centrifugación:** Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, recuperándose el sobrenadante, que posteriormente se congeló a -20 °C.

A los hidrolizados proteicos de: fracción globulina (G) y concentrado proteico (CPQ) se les realizó los análisis correspondientes: valores IC<sub>50</sub> para la ECA y la DPP-IV, proteína soluble y grado de hidrólisis. Una hidrólisis adicional fue realizada bajo las mismas condiciones solo con el CPQ considerando un tiempo de 24 h de hidrólisis. En la Figura 17 se muestra el esquema de la metodología experimental seguida para la evaluación de la fracción globulina de la quinua como potencial precursora de péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva e hipoglucemiante, mediante hidrólisis con termolisina.



**Figura 17: Metodología experimental para la determinación de la potencialidad de la fracción globulina de la quinua, como precursora de péptidos bioactivos**

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todas las pruebas de bioactividad de péptidos *in vitro* se realizaron con tres repeticiones independientes (n=3) (Anexo 1, 2 y 3), y sus datos se expresaron como la media  $\pm$  desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 19. Las diferencias entre las medias se probaron utilizando un ANOVA seguido de la prueba de Tukey con un 95 por ciento de confianza (Anexo 4 y 5).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OBTENCIÓN *in silico* DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA

### 4.2. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA

La Tabla 5 muestra algunas de las características de las proteínas del tipo globulinas de quinua, con las que se trabajó en esta investigación, obtenidas a partir de la base de datos NCBI, donde se encuentran los siguientes datos: abreviatura, accesoión y número de aminoácidos que conforma la proteína.

**Tabla 5: Proteínas de quinua obtenidas de NCBI**

<b>Fuente</b>	<b>Proteína</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Accesión</b>	<b>Número de aminoácidos</b>
Quinua	11S seed storage globulin	11S-1	AAS67036.1	480
	11 S globulin seed storage protein 2-like	11S-2	XP_021770184	474
	13S globulin seed storage protein 1-like	13S-1	XP_021752233	463
	13S globulin seed storage protein 2-like	13S-2	XP_021752668	542

Brinegar y Goundan (1993) y Brinegar et al. (1996) citados por Abugoch (2009) afirman que las albúminas y las globulinas representan a las principales proteínas de almacenamiento

en quinua. En la presente investigación, para poder evaluar el potencial que poseen las proteínas globulinas de la quinua como fuente de péptidos bioactivos, se estudiaron cuatro secuencias de proteínas de este tipo.

Estas proteínas fueron también empleadas en un estudio previo realizado por Guo *et al.* (2020) quienes usaron como criterio de selección a las proteínas globulinas de la quinua con mayor sumatoria de frecuencia total de aparición de péptidos bioactivos empleando la herramienta bioinformática BIOPEP. A continuación, en la Tabla 6 se observan las secuencias de proteína de quinua en formato FASTA obtenidos de la base de datos NCBI.

**Tabla 6: Formato FASTA de proteínas de quinua obtenidas de NCBI**

<b>Proteína</b>	<b>Formato FASTA</b>
<b>11S-1</b>	MAKSTTTLFLSCSIALVLLNGCMGQGRMREMQQNECQIDRLTALEP TNRIQAEGGLTEVWDTQDQQFQCSGVSVIRRTIEPNGLLLPSFTSGPE LIYIEQNGNISGLMIPGCPETFESMSQESWREGMKRGMRGGRFQDQH QKIRHLRQGHIFAMPAGVAHWAYNTGNEPLVAVILIDTSNHANQLD KDYPKRFYLAGKPQQEHSRHRGGSQRGERGSGGNVFSGLGTKT IAQSFVSEIDIAEKLQAEQDERGNIVLVQEGLHVIKPPSSRSYDDERE QRRHRSPRSNGLEETICSARLSENIDEPSKADVYSPEAGRLTTLNSFNL PILSNLRLSAEKGVLRYNAIMAPHYNLNAHSIIYGVRGRGRIQIVNAQ GNSVFDDELRRGQLVVPQNFVVKQAGEEGFEWIAFKTCENALFQ TLAGRTSAIRAMPLEVISNIYQISREQAYRLKFSRSETTLFRPENQGRQ RRDIAA
<b>11 S - 2</b>	MGGTKILVALSLCLMVSSALGQGSQKRLSVRIQLLLIYQAQQCRINR LTSSEPNQRVECEGLIELWDETEEQFQCSGIHAMRVTVQHNSLSLP NFHPFRLVYIERGEGILGVTFPGCPETYDSSGRQEEGIRGDEQREFGH QKDLHQKVHRFTRGDIIAIPPGAVHWCYNDGNEEVTVIVNDLNNPS NQLDQTFRSFYLAGGVERSSEQRGKHTQQQFNNILRPFDPELLSEAFD VPEDLVRKMQQTENRGLIVRVDKGMRLSPGSEQDYDDER



---

RRKYVGLDVNGLEETICTMRLRHNLDNRREADVYSRHGGRLNIVNEH  
KLPILRHLDMMSVEKGNMFPNTIYSPHWA VNSHSVVYVTRGEAHVQVV  
GNNGQSVMDRDRVNEGEMFVIPQYFTVSVKAGSNGFEYVSFKTTSSPM  
KSPMVGYTSVLRAMPVQVLTNAYQISPSEAHQLKYNREHQTFFLPSR  
GGKSRRF

**13S-1** MAFTTTNANNALLFWVPLCLLVFLISPSLAQLPLLQRQPQQPRGQQWQ  
HDCDIQQLQAAEPHRLRAEAGVIEVWESNSEQFRCAGVAAVRYVIEP  
KGLLLPSYTNAPYVTYVTQGRGIQGVIVPGCPETFESPRGSGSDTTREG  
QRDQHQKVFRVQEGDVIGSPAGVVQWTYNDGDAPIVSVTLLDLSNPN  
NQLDLNFYSFYLAGDPQGGQERRPKEVAGKNIFNGFDDEMLADAFNV  
DTETIRSMKAENDERGSIIRVERDLEILSPEWDDTEEERTRRLNGLEQT  
LCSLIFKQNIIDRPSLADVFTKHGGRINTLNGHKLPLLQYLQLSVERGVL  
YKNALMTPHWNINAHSIYITRGTGWIQVARENGRLVFDDRQEGQL  
LVVPQNFVVVKKAEQEGWKVVSFKTNDNAMISPLAGKLSAIRGMPEE  
VLMNSYDMSRDEVRRRLKYGREELSLFSPRTRSF

**13S-2** MSRVFLLPLALTLILSPTSLSAQLGFQLGQSPFLPSGQSSPQHSRLQRGQ  
QALNDCQINQLSANEPSIRIQAEAGITEVWDPKEQQEFQCAGVTVIRRE  
IEPKGLLLPHYNNAPSISYVIRGRGLLGLSSLGCADTYESGSPEFFSEES  
RRSERFEESRRSERGSEEMRDQHQKVRRFHKGHVIGLPAGVSKWVYN  
DGEDRLTIVTLYDTNMFQNLDDNLSFFLAGNPQGRGGDQSGRQHE  
SSRRHTRGGQEEMGQNILSGFDKQLLADAFEVESDTISKIQGENDDRG  
AIIRVESGELEMLIPEWDQEEQRSERHHRGGGSESERSEEEERSERHHRGG  
RGRQSESSRPHNGIEQTLCSARLSVNIDNPERADVFNPPQGGRLTNINSN  
KLPILNYLRLSAEKVNLYKNAIMTPNWKINAHSIVYFTKGSGRVQIAN  
HEGELVFDDMVQEGQLVVVPQNFVVLKRAQDQGLEWVALLTNDNA  
MSSPLAGRISAIRGMPIEVVMNSYKLSREEAQLKYGRQELSVFSPSKR  
SERRGDEYAIV

---

#### 4.2.1. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS GLOBULINAS DE LA QUINUA COMO PRECURSORAS DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS USANDO LA BASE DE DATOS BIOPEP

La Tabla 7 muestra los valores de frecuencia de aparición de péptidos con determinada actividad en las proteínas globulinas de la quinua seleccionadas, realizadas por BIOPEP.

**Tabla 7: Frecuencia de aparición de péptidos con determinada actividad biológica en la proteína de quinua (A) realizada por BIOPEP**

Actividad	Proteína			
	11S-1	11S-2	13S-1	13S-2
Inhibidor de ECA	0.4396	0.4198	0.4492	0.4317
Activación de proteólisis mediada por ubiquitina	0.0104	0.0063	0.0130	0.0129
Inhibidor de alfa-glucosidasa	0.0187	0.0253	0.0194	0.0203
Antiinflamatorio	0.0021	0.0021	0.0022	0.0018
Antiamnesico	0.0042	0.0063	0.0043	-
Antioxidante	0.0667	0.057	0.0389	0.0498
Antitrombótico	0.0042	0.0105	0.0022	0.0018
Inhibidor de CaMPDE	0.0083	0.0042	0.0065	0.0129
Inhibidor de DPPIII	0.0750	0.0970	0.0756	0.0756
Inhibidor de DPPIV	0.6354	0.6561	0.6609	0.6218
Embriotóxico	-	0.0042	-	0.0018
Inhibidor de la HMG-CoA reductasa	-	0.0021	-	-
Hipolipemiente	-	0.0021	-	-
Hipotensivo	0.0021	0.0021	-	-
Neuropéptido	0.0104	0.0063	0.013	0.0148
Reguladora	0.0063	0.0148	0.0108	0.0037
Inhibidor de renina	0.0333	0.0422	0.0324	0.0295
Estimulante	0.0500	0.0633	0.0605	0.0756

«Continuación»

Anticancerígeno	<b>0.0021</b>	-	<b>0.0022</b>	<b>0.0018</b>
Ligando de permeasa bacteriana	-	-	0.0022	-
Vinculante (binding)	-	-	-	0.0018
Hipolipidémico	-	-	-	0.0037
Inmunomodulador	0.0021	-	0.0022	0.0018
<b>Sumatoria de A</b>	<b>1.3709</b>	<b>1.4217</b>	<b>1.3955</b>	<b>1.3631</b>

De acuerdo con la información obtenida de base de datos BIOPEP (consultada al 4 de Setiembre de 2021), las proteínas globulinas pueden dar lugar a fragmentos con 23 actividades biológicas (Tabla 7), entre los cuales se tuvieron fragmentos con inhibición de la ECA, inhibición de la DPP-IV, activación de proteólisis mediada por ubiquitina, antiinflamatoria, anticancerígena, inhibición de la renina, inhibición de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (CaMPDE), entre otras actividades.

En cuanto a la frecuencia total de aparición de péptidos bioactivos, la proteína 11S-2 obtuvo el más alto valor ( $\Sigma A = 1.4217$ ), seguido de 13S-1 ( $\Sigma A = 1.3955$ ), 11S-1 ( $\Sigma A = 1.3709$ ) y finalmente 13S-2 ( $\Sigma A = 1.3631$ ). Las cuatro proteínas globulinas de quinua evaluadas demostraron tener un valor mayor de frecuencia de aparición de péptidos comparadas a las proteínas de soja (Glicinina,  $\beta$ -conglucina  $\alpha'$  y  $\beta$ -conglucina  $\alpha$ ) que de acuerdo a Guo et al. (2020) obtuvieron valores de 1.1628, 1.1949 y 1.2100 respectivamente.

En la Tabla 8 se observan los respectivos valores de frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos por actividad de inhibición de ECA (AECA) y DPP-IV(ADPP-IV) de las proteínas de quinua, usando la base de datos BIOPEP:

**Tabla 8: Frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos (A) de las proteínas de quinua**

Proteína de quinua	Actividad	
	Inhibidor de ECA	Inhibidor de DPP-IV
	A <sub>ECA</sub>	A <sub>DPP-IV</sub>
11S-1	0.4396	0.6354
11S-2	0.4198	0.6561
13S-1	0.4492	0.6609
13S-2	0.4317	0.6218

Al evaluar todos los valores de frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos (A) en las distintas actividades se concluyó que las cuatro proteínas de quinua presentaron un alto valor de “A” para las actividades de inhibición de DPP-IV seguido de ECA respecto a las demás actividades.

Al compararse los valores frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos con actividad inhibidora de DPP-IV de las proteínas evaluadas, la proteína 13S-1 (ADPP-IV=0.6609) fue la que obtuvo el mayor valor, seguido de 11S-2 (ADPP-IV=0.6561), 11S-1 (ADPP-IV=0.6354) y 13S-2 (ADPP-IV=0.6218), encontrándose valores mayores que los hallados por Lacroix et al. (2012) para proteínas de cebada ( $\gamma$ -hordeína-3) con ADPP-IV= 0.173 y las globulinas 11S y 12 S de avena con ADPP-IV= 0.095 y 0.092, respectivamente. En contraste, se obtuvieron valores menores de frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos con actividad inhibidora de ECA respecto a DPP-IV, obteniendo para la proteína 13S-1 el mayor valor (A= 0.4492), seguido de 11S-1 (AECA= 0.4396), 13S-2 (AECA = 0.4317) y finalmente 11S-2 (AECA= 0.4198); siendo estos valores menores a los obtenidos por Iwaniak y Dziuba (2009) en fuentes de origen animal como proteínas de leche y carne como:  $\beta$  – caseína bovina (AECA= 0.536 a 0.569), tropoelastina bovina (AECA= 0.885) y colágeno bovino (AECA=0.751), pero resultaron mayores a los reportados por los mismos autores en prolaminas de arroz (AECA= 0.240- 0.250).

Con las evaluaciones del parámetro A (frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos de las proteínas de quinua) tanto para inhibir la enzima DPP-IV como ECA, la proteína de quinua presenta un alto potencial para la generación de péptidos con ambas actividades.

#### 4.2.2. HIDRÓLISIS *in silico* DE LAS PROTEÍNAS DE QUINUA

Al someter las secuencias de proteína de quinua que se reportan en la Tabla 9 a hidrólisis enzimática con termolisina bajo condiciones *in silico* empleando la plataforma BIOPEP, se puede obtener información sobre el grado de hidrólisis (%), frecuencia de liberación de fragmentos con actividad dada por termolisina (AE) y frecuencia relativa de liberación de fragmentos con actividad dada por la termolisina (W). Ambos parámetros AE y W son indicadores de la bioactividad de los péptidos obtenidos por hidrólisis de las diferentes globulinas de quinua con termolisina con propiedades de inhibición de la ECA y DPP-IV.

**Tabla 9: Grado de hidrólisis, valores de frecuencia de liberación de fragmentos inhibidores de la ECA y DPP-IV (AE) y frecuencia relativa de liberación de inhibidores de la ECA y DPP-IV (W) determinada después de hidrólisis con termolisina.**

Proteína de quinua	Grado de hidrólisis (%)	Actividad			
		Inhibidor de ECA		Inhibidor de DPP-IV	
		AE	W	AE	W
11S-1	31.2	0.0182	0.0441	0.0364	0.0593
11S-2	30.8	0.0225	0.0584	0.0430	0.0686
13S-1	33.6	0.0314	0.0780	0.0461	0.0728
13S-2	29.4	0.0251	0.0658	0.0394	0.0666

Mediante la hidrólisis *in silico* con termolisina se obtuvieron hidrolizados de proteínas de quinua con grado de hidrólisis entre 29.4 y 33.6 por ciento (Tabla 9); sin embargo, de acuerdo a lo afirmado por Guo et al. (2020) la liberación de péptidos bioactivos en este caso no guarda una relación proporcional al grado de hidrólisis de los hidrolizados.

Hsieh et al. (2016) y Borawska-Dziadkiewicz et al. (2021) afirman que altos valores de AE y W pueden demostrar que la proteína dada es una buena fuente de péptidos bioactivos y que las enzimas aplicadas son de utilidad para la liberación de estos péptidos. La mayor frecuencia de liberación de fragmentos inhibidores de ECA usando termolisina (AE) se determinó en las proteínas 13S-1 (0.0314) y 13S-2 (0.0251).

Respecto a la frecuencia relativa de liberación de inhibidores de la ECA determinada después de hidrólisis con termolisina (W) las proteínas que alcanzaron un mayor valor fueron 13S-1 y 13S-2 con 0.0780 y 0.0658, respectivamente. El parámetro AE para 13S-2 es muy cercano al obtenido en hidrolizado de proteína de trigo (0.0313) utilizando enzimas gastrointestinales (pepsina, tripsina y quimiotripsina), mientras que frecuencia relativa de liberación de inhibidores de la ECA determinada después de hidrólisis con termolisina (W) fueron inferiores a los reportados para miosina de salmón y carpa (0.2090 y 0.1841) utilizando enzimas digestivas (Borawska-Dziadkiewicz et al., 2021).

Por otro lado, se hallaron mayores valores de frecuencia de liberación de fragmentos inhibidores de DPP-IV que respecto a la ECA, usando termolisina (AE) en las proteínas 13S-1 (0.0461) y 11S-2 (0.0430). Guo et al. (2020) obtuvieron valores mayores de frecuencia de liberación de fragmentos inhibidores de DPP-IV (AE) usando la enzima vegetal bromelina para la globulina 13S-1 (0.0692) y globulina 11S-2 (0.0633) de la quinua.

De la misma forma, el valor de AE obtenidos por Hsieh et al. (2016) para liberación de péptidos inhibidores de DPP-IV utilizando termolisina en proteína globulina 7S de soya (0.0800) fue mayor a las frecuencias halladas. Los valores de frecuencia relativa de liberación de inhibidores de la DPP-IV determinada después de hidrólisis con termolisina (W) (0.0728 y 0.0686 para 13S-1 y 11S-2, respectivamente) fueron inferiores a los reportados por Guo et al. (2020) usando la enzima papaína en globulinas 13S-1(0.1622) y

11S-2 (0.1177) de la quinua. Las secuencias de proteína de quinuas obtenidas de la base de datos NCBI reportadas en la Tabla 6 fueron introducidas a la base BIOPEP usando termolisina como enzima, generando así los péptidos que se encuentran en la Tabla 10.

**Tabla 10: Fracciones de péptidos obtenidos de las proteínas globulinas de la quinua bajo acción de la termolisina por análisis *in silico***

Proteína	Resultado de la acción de termolisina
11S-1	M - AKSTTT - L - F - L - LSCS - I - A - L - V - L - LNGCMGQGRMREMQGNECQ - IDR - LT - A - LEPTNR - IQ - AEGG - LTE - VWDTQDQQ - FQC SG - VS - V - IRRT - IEPNG - L - L - LPS - FTSGPE - L - I - Y - IEQGNG - ISG - LM - IPGCPET - FESMSQESWREGMKRGMRGGR - FQD QHQB - IRH - LRQGH - I - F - AMP - AG - V - AHW - A - YNTGNEP - L - V - A - V - I - L - IDTSNH - ANQ - LDKD - YPKR - F - Y - L - AGKPQQEHSRHQH RGGESQRGERGSGGN - V - FSG - LGTKT - I - AQS - FG - VSED - I - AEK - LQ - AEQDERGN - I - V - L - VQEG - LH - V - IKPPSSRS - YDDE REQRRHRSPRSNG - LEET - ICS - AR - LSEN - IDEPSK - AD - V - YSPE - AGR - LTT - LNS - FN - LP - I - LSN - LR - LS - AEKG - V - L - YRN - A - IM - APH - YN - LN - AHS - I - I - YG - VRGRGR - IQ - I - VN - AQGNS - V - FDDE - LRQGG - L - V - V - VPQN - F - A - V - VKQ - AGEEG - FEW - I - A - FKTCE N - A - L - FQT - L - AGRTS - A - IR - AMP - LE - V - ISN - I - YQ - ISREQ - A - YR - LK - FSRSETT - L - FRPENQGRQRRD - L - A - A
11S-2	MGGTK - I - L - V - A - LS - LC - LM - VSS - A - LGQGSQKR - LS - VR - IQ - L - L - L - I - YQ - AQQCR - INR - LTSSEPNQR - VECEGG - L - IE - LWDET EEQ - FQCSG - IH - AMR - VT - VQHNS - LS - LPN - FHP - FPR - L - V - Y - IEREGE - I - LG - VT - FPGCPET - YDSSGRQEEG - IRGDEQRE - FGHQKD - LHQB - VHR - FTRGD - I - I - A - IPPG - A - VHWC - YNDGNEE - V - VT - V - I - VND - LNNPSNQ - LDQT - FRS - F - Y - L - AGG - VERSS EQRGKHTQQQ - FNN - I - LRP - FDPE - L - LSE - A - FD - VPED - L - VRKMQQTENRG - L - I - VR - VDKGEMR - I - LSPGSEQD - YDDERR RK - Y - VG - LD - VNG - LEET - ICTMR - LRHN - LDNRRE - AD - V - YSRHGGR - LN - I - VNEHK - LP - I - LRH - LDMS - VEKGNM - FPNT - I - YSPHW - A - VNSHS - V - V - Y - VTRGE - AH - VQ - V - VGNNQGS - VMDDR - VNEGEM - F - V - IPQ - Y - FT - VS - VK - AGSNG - FE - Y - VS - FKTTSSPM KSPM - VG - YTS - V - LR - AMP - VQ - V - LTN - A - YQ - ISPSE - AHQ - LK - YNREHQT - F - F - LPSRGGKSRR - F

«Continuación»

---

**13S-2** MSR - V - F - L - LP - L - A - LT - L - L - I - LSPTS - L - AQ - LG - FQ  
- LGQSP - F - LPSGQSSPQHRSR - LQRGQQ - A - LNDCQ - INQ - LS  
- ANEPS - IR - IQ - AE - AG - ITE - VWDPKEQQE - FQC - AG - VT  
- V - IRRE - IEPKG - L - L - LPH - YNN - APS - IS - Y - V - IRGRG -  
L - LG - LSS - LGC - ADT - YESG SPE - F - FSEESRRSER -  
FEESRRSERGSEEMRDQHOK - VRR - FHKGH - V - IG - LP - AG -  
VSKW - V - YNDGEDR - LT - I - VT - L - YDT NN - FQNQ - LDDN  
- LRS - F - F - L -  
AGNPQGRGGDQSGRQHESRRHTRGGQEEMGQN - I - LSG -  
FDKQ - L - L - AD - A - FE - VESDT - I SK - IQGENDDRG - A - I -  
IR - VESGE - LEM - L -  
IPEWDQEEQRSEHHRRGGGSEERSEEEERSEHHRRGGRRGRQSESS  
RPHNG - IEQT - LCS - AR - LS - VN - IDNPER - AD - V - FNPQGGR  
- LTN - INSNK - LP - I - LN - Y - LR - LS - AEK - VN - L - YKN - A  
- IMTPNWK - IN - A HS - I - V - Y - FTKGSGR - VQ - I - ANHEGE -  
L - V - FDDM - VQEGQ - L - V - V - VPQN - F - V - V - LKR - AGQDG  
- LEW - V - A - L - LTNDN - AMSSP - L - AGR - IS - A - IRGMP - IE  
- V - VMNS - YK - LSREE - AQR - LK - YGRQE - LS - V -  
FSPSKRSERRGDE - Y - A - I - V

---

Al someter las proteínas de quinua (11S-1, 11S-2, 13S-1 y 13S-2) a hidrólisis con termolisina, un total de 151, 155, 161 y 165 péptidos respectivamente fueron generados (Anexo 6). Siendo menores al número de péptidos obtenidos por Wong *et al.* (2021) usando papaína para hidrolizar proteínas de quinua: 11S-1, 11S-2, 13S-1, 13S-2 (generando 216, 191, 199, 224 péptidos, respectivamente), pero mayores al número de péptidos resultantes en las mismas proteínas de quinua usando subtilisina (11S-1, 11S-2, 13S-1, 13S-2, obteniendo 128, 139, 135, 159 péptidos, respectivamente).



#### **4.2.3. BIOACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS DE LA QUINUA OBTENIDOS CON TERMOLISINA Y EVALUACIÓN DE SU ESTABILIDAD FRENTE A LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL EVALUADA BAJO CONDICIONES *in silico***

En primer término, todos los péptidos derivados de las cuatro proteínas globulinas de la quinua estudiadas fueron sometidos a un análisis de bioactividad con la base PeptideRanker (Anexo 7) para obtener el valor de bioactividad teórica por el programa (valores de 0 a 1) y a partir de esa data se seleccionaron los péptidos conformados por un número de aminoácidos  $\geq 3$  unidades y con bioactividad mayor a 0.8, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 11. Se observa que a partir de la proteína 11 S-2, se obtuvo un mayor número de péptidos con puntuación alta, seguida de la 11 S-1, 13-S1 y 13-S-2. Obtenidos estos resultados los péptidos, mejores rankeados en bioactividad, pasaron por una hidrólisis simulada en BIOPEP, con las enzimas de la digestión gastrointestinal: pepsina pH > 2.0 (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina (EC 3.4.21.1), ello con la finalidad de poder definir si los péptidos presentarían estabilidad a las condiciones señaladas o se pueden transformar en fracciones mas pequeñas, los resultados también se presentan en Tabla 11.

De la Tabla 11 se puede notar que la mayor parte de los péptidos son hidrolizados bajo la condición de digestión gastrointestinal, la gran mayoría son transformados a unidades de aminoácidos. Esto debido a los fluidos gástricos fuertemente ácidos a los que son expuestos, además de la acción de las enzimas. Es por ello que de acuerdo a Perry y McClements (2020) es necesario suministrarlos péptidos mediante algún tipo de sistema de administración coloidal (gotas de microemulsión, gotas de emulsión, partículas de grasa sólida, liposomas y microgeles), con el fin de protegerlos de la degradación del tracto gastrointestinal en caso se requiera preservar su estructura intacta para que cumpla un efecto funcional dado.

**Tabla 11: Resultados de bioactividad de péptidos de alta bioactividad de las globulinas de quinua antes y después de la digestión gastrointestinal *in silico***

<b>Proteína globulina</b>	<b>Péptido</b>	<b>Bioactividad (PeptideRanker)</b>	<b>Fracciones obtenidas luego de la digestión simulada</b>
<b>11 S-1</b>	FEW	0.944294	F - E - W
	FSG	0.889111	F - SG
	AMP	0.847715	A - M - P
	AHW	0.847307	A - H - W
<b>11 S-2</b>	FPR	0.976464	F - PR
	FHP	0.933756	F - H - P
	YSPHW	0.869551	Y - SPH - W
	AMP	0.847715	A - M - P
	FRS	0.820357	F - R - S
	IPPG	0.809857	IPPG
<b>13 S-1</b>	FRC	0.983577	F - R - C
	FNG	0.910887	F - N - G
	FRS	0.820357	F - R - S
<b>13 S-2</b>	FQC	0.939499	F - Q - C
	FDDM	0.823216	F - D - D - M
	LGC	0.819419	L - G - C

Solo el péptido FSG perteneciente a la proteína 11 S-1 globulina y los péptidos FPR y YSPHW derivados de la proteína 11S-2, produjeron luego de la digestión gastrointestinal simulada una nueva generación de péptidos con dos a más aminoácidos, de otro lado el péptido IPPG de la 11S-2 globulina se mantuvo intacto. Es así que, los cuatro péptidos: SG, PR, SPH e IPPG, fueron evaluados para poder conocer su bioactividad respecto a las propiedades de inhibición de las enzimas DPP-IV y ECA.

Los péptidos que no pasaron por una completamente degradación frente a la digestión gastrointestinal como FRP e YSPHW (generando los dipéptidos PR y SPH, respectivamente), y el tetrapéptido IPPG (que se mantuvo inalterable), mostraron este comportamiento probablemente debido a la presencia de Prolina (P) dentro de su secuencia, ya que de acuerdo a Ahmed et al. (2022) este aminoácido en la secuencia peptídica, los hace resistentes a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal, adicionalmente Ejima et al. (2018) han detectado varios tripéptidos que contienen Pro (P) e His (H) en el plasma sanguíneo humano después de la ingestión oral de hidrolizados de maíz y trigo, lo que demuestra una marcada estabilidad en las condiciones digestivas in vivo del tracto gastrointestinal.

La Tabla 12 muestra a los péptidos antes y después de la digestión gastrointestinal simulada, evaluados con PeptideRanker, con el propósito de conocer su bioactividad, así como los valores de A1 (frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos inhibidores de ECA) y A2 (frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos inhibidores de DPP-IV) mediante BIOPEP: Como se evidencia en la Tabla 12 antes de la digestión simulada el tripéptido FPR de la proteína 11 S-2 fue el péptido con mayor bioactividad teórica según PeptideRanker con 0.9764, sin embargo, después de la digestión se produjo el fragmento PR con una bioactividad menor de 0.7876, sin embargo, sigue siendo alto el valor. Del mismo modo, los fragmentos FSG (proteína 11S-1) e YSPHW (proteína 11S-2) los cuales obtuvieron un valor de bioactividad teórica de 0.8891 y 0.8695, respectivamente, al ser sometidos a la acción de pepsina, tripsina y quimiotripsina (enzimas digestivas) dieron como resultado los péptidos SG y SPH con menores valores de bioactividad (0.4073 y 0.4625, respectivamente). Como ya se mencionó el único péptido que permaneció inalterable frente a la digestión simulada con BIOPEP fue el péptido IPPG el que obtuvo un valor de 0.8098.

**Tabla 12: Bioactividad de fragmentos (PeptideRanker y BIOPEP) obtenidos de péptidos antes y después de la digestión simulada**

Proteína	Péptido	Bioactividad (PeptideRanker)	Actividad (BIOPEP)	
			Inhibición de ECA A <sub>1</sub>	Inhibición de DPP-IV A <sub>2</sub>
<b>Antes de la digestión simulada</b>				
11 S-1	FSG	0.8891	0.3333	-
11 S-2	FPR	0.9764	0.6667	0.3333
	YSPHW	0.8695	0.2000	0.8
	IPPG	0.8098	1.0000	1.0000
<b>Después de la digestión simulada</b>				
11 S-1	SG	0.4073	0.5000	-
11 S-2	PR	0.7876	0.5000	-
	SPH	0.4625	0.3333	0.6667
	IPPG	0.8098	1.0000	1.0000

Por otro lado, BIOPEP, proporcionó información acerca de las actividades de inhibición de ECA y DPP-IV con el parámetro: frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos en la secuencia de proteínas (A). Como se observa en la Tabla 11, los resultados referidos a la frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos inhibidores de ECA en la secuencia (A<sub>1</sub>) indicaron que los péptidos FPR e IPPG obtuvieron los valores más altos con 0.6667 y 1.0000 respectivamente, mientras FSG e YSPHW reportaron valores de 0.3333 y 0.2000, respectivamente. Luego de la digestión SPH proveniente de YSPHW obtuvo un A<sub>1</sub> igual a 0.3333, mientras SG (producto del péptido FSG, proveniente de la proteína 11S-1) y PR (producto del péptido FPR, proveniente de la proteína 11S-2) obtuvieron un valor de A igual

a 0.5. El péptido IPPG obtuvo un valor de  $A_1$  de 1.000, siendo el péptido con mayor actividad de inhibición de ECA entre todos los péptidos analizados tanto antes como después del proceso de digestión.

Respecto a la frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos inhibidores de la DPP-IV en la secuencia de proteínas ( $A_2$ ), fueron IPPG seguido de YSPHW los péptidos con mayor valor de  $A_2$  con valores de 1.0 y 0.8 respectivamente, en contraste FPR obtuvo un valor de 0.3333 mientras FSG no reportó ningún valor. Después de la digestión, fueron solo los péptidos SPH e IPPG aquellos que seguían manteniendo una actividad de inhibición de DPP-IV, reflejándose en sus valores de  $A_2$  de 0.6667 y 1.000, respectivamente.

De los resultados encontrados, se seleccionaron los péptidos resultantes de la digestión gastrointestinal simulada: PR, SPH e IPPG (Tabla 12) para el análisis de acoplamiento molecular (Docking). El péptido PR solo fue sujeto a interacción con la enzima ECA debido a su valor de  $A_1$  de 0.5 y alta bioactividad (0.7876), mientras SPH fue puesto a interacción con la enzima DPP-IV por su valor de  $A_2$  igual 0.6667. Finalmente, IPPG debido a que demostró un valor igual a 1 tanto en  $A_1$  como  $A_2$  se sometió a evaluación con ECA y DPP IV.

#### **4.2.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD**

Como se muestra en la Tabla 13, se realizó la predicción de hidrofobicidad y toxicidad en los péptidos evaluados del acápite anterior. Peighamardoust *et al.* (2021) y Acquah *et al.* (2018) afirman que la hidrofobicidad es una característica de los péptidos bioactivos que determina las interacciones físicas con las moléculas biológicas, lo cual es determinante en su mecanismo de acción y por lo tanto su bioactividad. De la Tabla 13, se observa la característica de hidrofobicidad de los péptidos calculada de acuerdo a Peptide 2.0, los péptidos IPPG y FPR fueron los que obtuvieron un mayor porcentaje de hidrofobicidad (con 75.0 y 66.67 por ciento, respectivamente) seguido de PR (50 por ciento), YSPHW (40 por ciento), FSG e SPH (33.33 por ciento), mientras SG demostró no tener hidrofobicidad. Fu *et al.* (2016) señalan que una característica entre péptidos inhibidores de la ECA, es que sus

residuos de aminoácidos hidrofóbicos (cadena lateral aromática o ramificada), como Pro, Arg y Val en las posiciones C-terminales promueven su unión con la enzima, ayudando a intensificar la inhibición de la ECA. Por lo tanto, los péptidos derivados de la quinua: IPPG y FPR, pueden actuar como potentes inhibidores de la ECA. Gao *et al.* (2020) encontraron que péptidos derivados  $\alpha$ -lactoalbúmina bovina y compuestos por aminoácidos hidrofóbicos como Ile podían inhibir a la DPP-IV, por lo cual se puede relacionar la característica de hidrofobicidad con la actividad inhibitoria de DPP-IV.

**Tabla 13: Hidrofobicidad y toxicidad de péptidos con mayor bioactividad (antes y después de la digestión simulada)**

Proteína	Péptido	Hidrofobicidad (Peptide 2.0) (%)	Toxicidad (ToxinPred)
<b>Antes de la digestión</b>			
11 S-1	FSG	33.33	No tóxico
11 S-2	FPR	66.67	No tóxico
	YSPHW	40	No tóxico
	IPPG	75	No tóxico
<b>Después de la digestión</b>			
11 S-1	SG	0	No tóxico
11 S-2	PR	50	No tóxico
	SPH	33.33	No tóxico
	IPPG	75	No tóxico

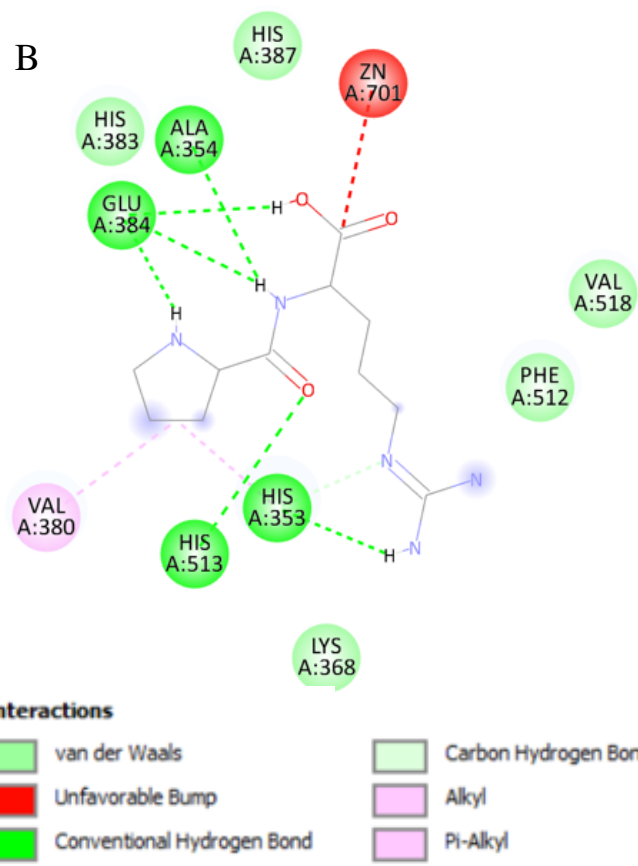
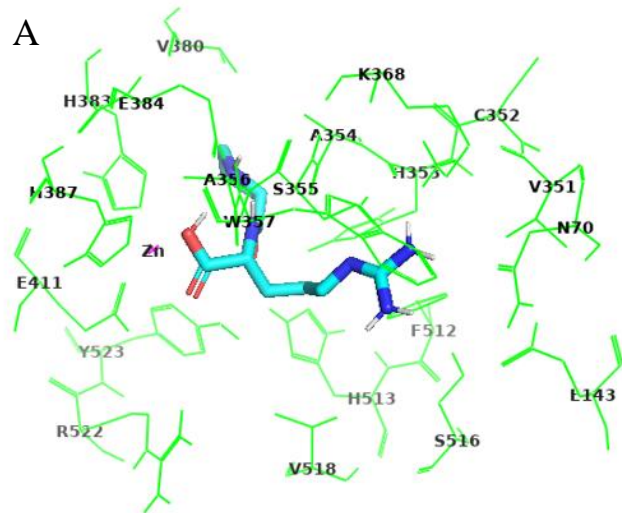
Por otro lado, en la Tabla 13 se muestra, mediante la predicción con ToxinPred que todos los péptidos seleccionados no son tóxicos, al respecto Gupta *et al.* (2013) señalan que esta

plataforma se basa en un conjunto de datos de 1805 péptidos tóxicos ( $\leq 35$  residuos).

#### **4.2.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD CON LA ENZIMA ECA**

La evaluación de bioactividad realizada con PeptideRanker y BIOPEP (Tabla 12) nos permitió elegir a los péptidos PR e IPPG para el análisis *in silico* de acoplamiento molecular con la enzima ECA (identificada con código PDB:1O8a). La interacción molecular entre PR e IPPG y la ECA se determinó mediante análisis de interacción receptor-ligando, como se observa en la Figura 18 y 19, se encontraron que tanto PR e IPPG formaban interacciones hidrofóbicas, puente de hidrógeno y Van der Waals. Observando la Figura 18 se predijo que PR, formó seis interacciones de puente de hidrógeno con Ala 354, Glu 384, His 353, His 513 y dos interacciones hidrofóbicas con Val 380 y His 353. Sin embargo, muestra como no favorable la interacción entre el Zn con el grupo carboxilo del péptido PR. De acuerdo a Corradi *et al.* (2007) el ión Zn es un cofactor de la ECA que en parte es responsable de la fuerza de unión entre esta enzima y sus inhibidores. Asimismo, Tzakos y Gerothanassis, (2005) señalan que potentes inhibidores de la ECA como el lisinopril se unen al ión zinc, mediante su grupo carboxilo.

Se conoce que el sitio activo o sitio de unión de la ECA está constituido por tres sitios de unión: S<sub>1</sub> (Ala354, Glu384 y Tyr523), S<sub>1</sub>' (Glu162) y S<sub>2</sub> (Gln281, His353, Lys511, His513 y Tyr520) (Tahir *et al.*, 2020). En el presente estudio, se predijo que PR formaría tres interacciones de enlace puente de hidrógeno con Glu384 en el sitio S<sub>1</sub>, una con His353 y His513 en el sitio S<sub>2</sub>, además de dos interacciones hidrofóbicas con His353 en el sitio S<sub>2</sub> de la enzima ECA.



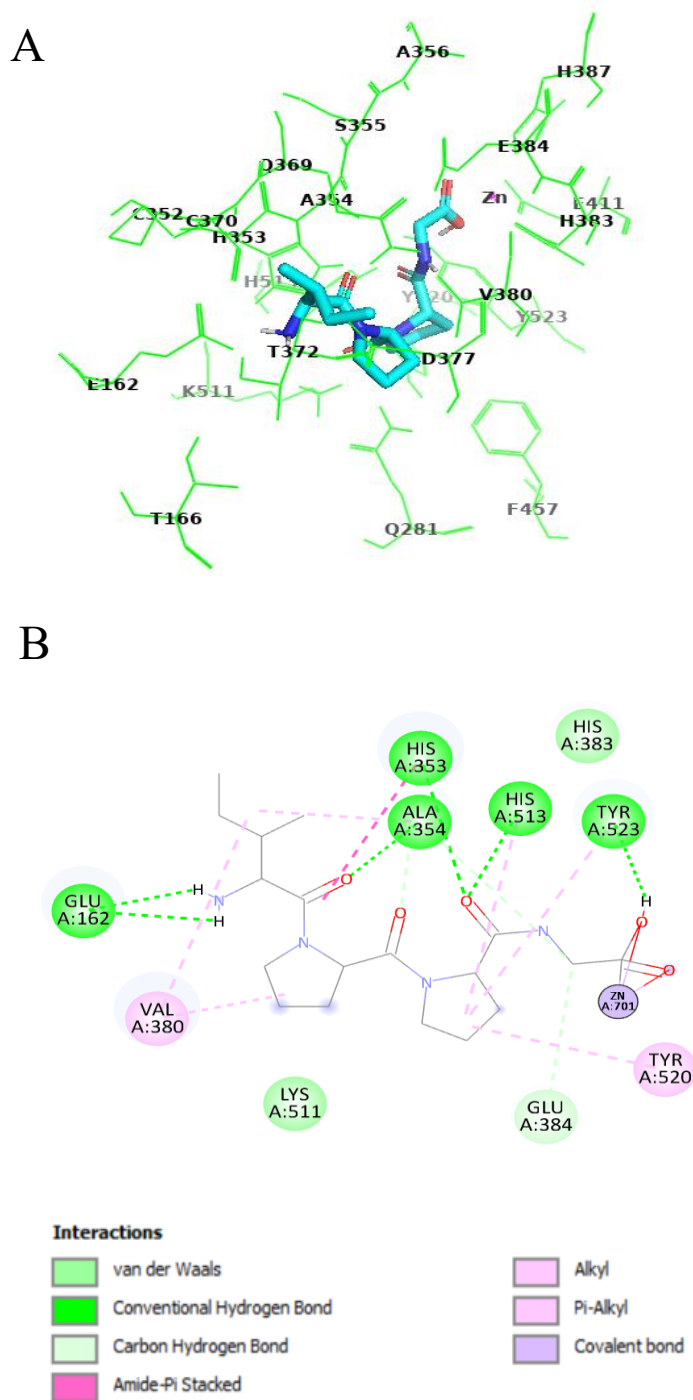
**Figura 18. Interacciones del péptido PR en la enzima ECA (PDB 1o8a). A) Interacciones obtenidas entre el péptido PR y la enzima ACE (con una caja 60 Å<sup>3</sup>), obtenidas a una distancia de 5 Å con pymol. B) Interacciones obtenidas entre el péptido PR y la enzima ACE (con una caja 60 Å<sup>3</sup>), obtenidas con Discovery.**



Se encontró que IPPG (Figura 19) formó nueve interacciones puente de hidrógeno con Glu162, His353, Ala354, His513, Tyr523, Glu384 y seis interacciones hidrofóbicas con Val380, Tyr520, Ala354, His513, Tyr523. En este caso el Zn de la enzima ECA pudo hacer una interacción del tipo covalente con el grupo carboxilo del péptido IPPG. Este péptido IPPG a diferencia de PR hace interacción con aminoácidos similares al lisinopril (fármaco control), además los valores de  $\Delta G$  obtenidos para IPPG mostró mejor  $\Delta G$  (-13.63 kcal/mol) en comparación con el lisinopril (-11.81 kcal/mol).

Por otro lado, IPPG formó dos interacciones de enlace puente de hidrógeno con Glu162 en el sitio S1'; una con Ala354, Glu384, Tyr523 en el sitio S1 y con His513 en el sitio S2; una interacción hidrofóbica con Ala354 y Tyr523 (en el sitio S1') y una con His513 (sitio S2), además formó una interacción tipo covalente entre Zn y el grupo carboxilo del péptido IPPG. De acuerdo a lo mencionado por Tahir et al. (2020), dado que ambos péptidos (PR e IPPG) interaccionan con el sitio activo de la enzima se podrían reportar como péptidos de inhibición de tipo competitivo.

De los péptidos evaluados IPPG destaca debido a que no solo demostró interacción con los sitios S1', S1 y S2 sino también con el Zn, que de acuerdo a Pina y Roque (2009) se considera al co-factor Zn como un componente de gran significancia del sitio activo de ECA y por tanto determinante en su actividad, Yan et al. (2020) señalan que el Zn podría unirse a los péptidos inhibidores de ECA, ayudando al ataque nucleofílico de una molécula de agua activada, lo que lleva a alterar la estructura del sitio activo de ECA. También se ha demostrado que la prolina, especialmente cuando está presente en el extremo C-terminal, potencia la inhibición de la ECA. Las endopeptidasas que generan péptidos que contienen prolina en la secuencia, pueden ser herramientas útiles de hidrólisis de proteínas para producir péptidos antihipertensivos potentes (Aluko, 2015).

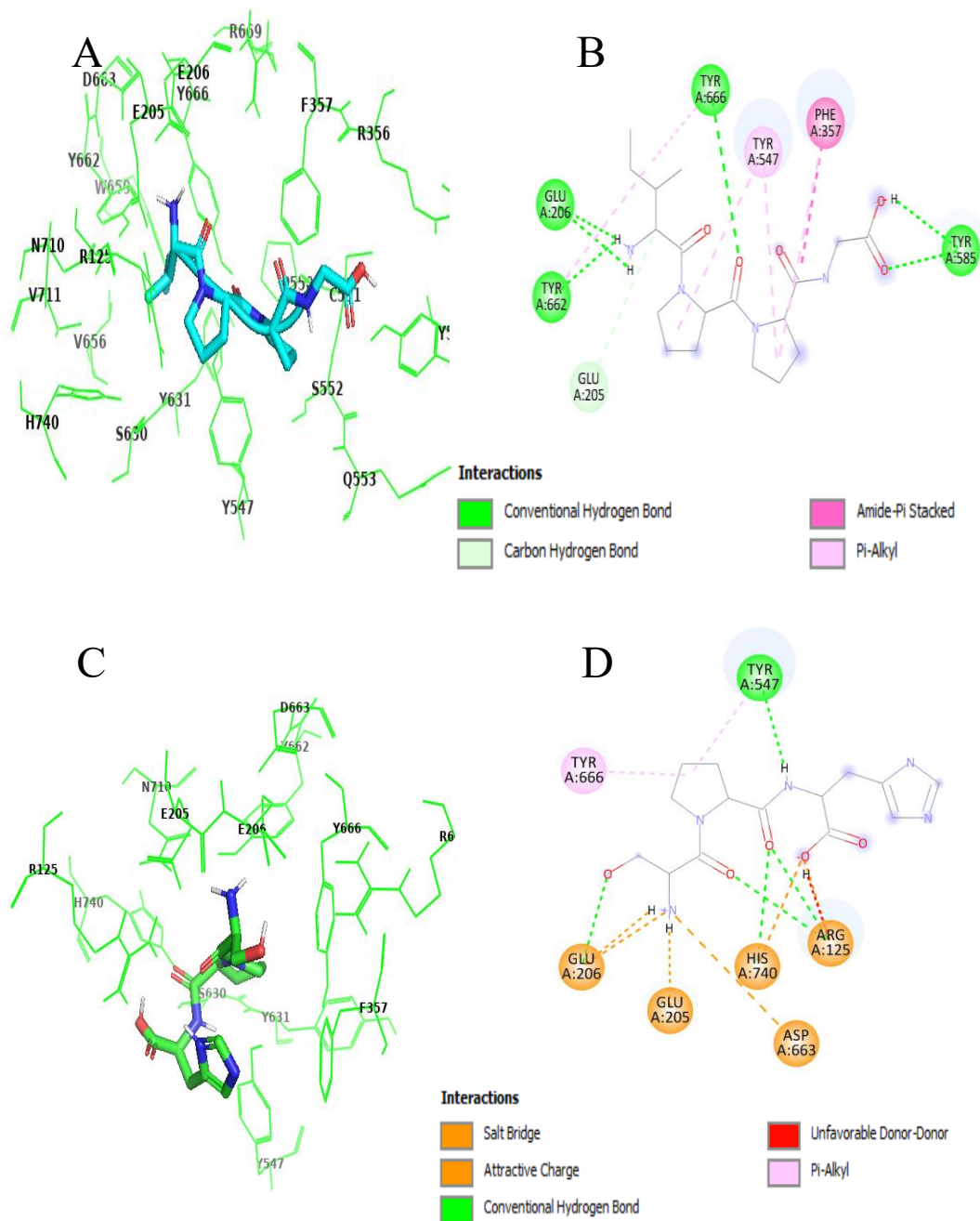


**Figura 19. Interacciones del péptido IPPG en la enzima ECA (PDB 1o8a). A) Interacciones obtenidas entre el tetrapéptido IPPG y la enzima ECA (con una caja 60 Å<sup>3</sup>), obtenidas a una distancia de 5Å con pymol. B) Interacciones obtenidas entre el tetrapéptido IPPG y la enzima ECA (con una caja 60 Å<sup>3</sup>), obtenidas con Discovery.**

#### **4.2.6. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) DE PÉPTIDOS CON MAYOR BIOACTIVIDAD CON LA ENZIMA DPP-IV**

En la Figura 20 se muestran las interacciones de los péptidos IPPG y SPH con la enzima DPP- IV (PDB 1x70) en donde podemos observar que el péptido IPPG (Figura 20B) tiene siete interacciones con los aminoácidos Glu206, Tyr662, Tyr666, Tyr585, Glu205 y cuatro interacciones del tipo hidrofóbicas con Tyr547, Phe357, Tyr666 y Ty662. Mientras que el tripéptido SPH generó cinco interacciones puente de hidrógeno con los aminoácidos Glu206, His740, Arg125 y Tyr547, cinco interacciones de atracción de cargas con Glu206, Glu205, Asp663, His740 y Arg125 y se encontró un enlace desfavorable con Arg125.

Aertgeerts et al. (2004) señala que el sitio activo de la DPP-IV está compuesto por una tríada catalítica conformada por los residuos Ser630, Asp708, Asn710 y His740, además de un sitio activo en S1 que según Hiramatsu et al. (2004) es rico en residuos Tyr (Tyr631, Tyr662 y Tyr666) y un sitio activo en S2 que comprende los residuos Glu205 y Glu206 y Arg125 (Rasmussen et al., 2003 citados por You et al., 2022). En esta investigación, el tetrapéptido IPPG formó dos y una interacción del tipo puente de hidrógeno con Glu206 y Glu205, respectivamente en el sitio S2, asimismo, formó una interacción puente de hidrógeno con Tyr662 y Tyr666; en el sitio S1 de la enzima DPP-IV; mientras que el tripéptido SPH formó dos interacciones del tipo enlace puente de hidrógeno con Arg125, dos y una interacción de carga atractiva con Glu206 y Glu205, respectivamente en el sitio activo S2, mientras que en el S1 formó un enlace hidrófobo con el residuo Tyr666. Por lo tanto, IPPG y SPH pueden ejercer su actividad inhibidora de DPP-IV a través de las interacciones mencionadas anteriormente.



**Figura 20. Interacción entre los péptidos IPPG y SPH con la enzima DPP-IV (PDB 1x70). A) interacción del péptido IPPG con DPP-IV en pymol a 5 Å. B) interacciones obtenidas entre IPPG con DPP-IV, de Discovery. C) interacción del péptido SPH con DPP-IV en pymol a 5Å. D) interacciones obtenidas entre SPH con DPP-IV de Discovery.**

### 4.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS *in vitro* DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LA FRACCIÓN GLOBULINA Y CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA USANDO LA ENZIMA TERMOLISINA

#### 4.3.1. PROTEÍNA TOTAL DE HARINA DESGRASADA, CONCENTRADO, FRACCIÓN GLOBULINA DE QUINUA

A partir de la harina desgrasada de grano de quinua variedad Pasankalla (HD) se obtuvieron al concentrado proteico de quinua (CPQ) y la fracción globulina (G) realizando los procedimientos descritos en el acápite 3.5.2. sección b y c, respectivamente. La Tabla 14 nos muestra el contenido proteico de la harina desgrasada de quinua, concentrado proteico de quinua y la fracción globulina.

**Tabla 14: Contenido de proteína total de la harina desgrasada de quinua (HD), concentrado proteico de quinua (CPQ) y fracción globulina (G)**

<b>Producto</b>	<b>Proteína total (%)</b>
<b>Harina desgrasada de quinua (HD)</b>	12.3
<b>Concentrado proteico de quinua (CPQ)</b>	72.5
<b>Fracción globulina (G)</b>	54.1

(\*) Factor de conversión del nitrógeno a proteína 5.85

Se obtuvo un valor de proteína total de HD (12.3 por ciento), valor inferior al obtenido por Toapanta *et al.* (2016) para harina de quinua desgrasada (13 por ciento), similar al contenido de proteína determinado por Repo-Carrasco-Valencia *et al.* (2010) con 12.69 por ciento para quinua INIA-415 Pasankalla. Por otro lado, se reportó para CPQ (72.5 por ciento) de proteína total, valor cercano al obtenido por Cisneros (2017) (73.2 por ciento) y supera al valor reportado por Quelal *et al.* (2019) (61.5 por ciento). De acuerdo a Steffolani *et al.* (2016) la variedad Pasankalla presenta alto contenido de aminoácidos azufrados como metionina y cisteína (10.4 g/ 100 g de proteína), seguido de aminoácidos aromáticos (Phe y Tyr) (5.48 g/ 100 g de proteína) e isoleucina con 3.5 g/ 100 g de proteína.

Para la extracción de la fracción globulina se aplicó el método de Osbourne, que usa como solvente para extracción de esta fracción NaCl, de acuerdo a Belitz et al. (2009) los iones de sal suprimen las interacciones electrostáticas proteína-proteína que conducen a una mayor capacidad de extracción. Mientras la fracción globulina obtenida por el método de Osborne obtuvo un valor de 54.1 por ciento de proteína total.

#### 4.3.2. CARACTERISTICAS DE LOS HIDROLIZADOS DEL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA Y LA FRACCIÓN GLOBULINA

A continuación, en la Tabla 15 se presentan los valores promedio de las características de los hidrolizados obtenidos.

**Tabla 15: Características de hidrolizados de concentrado proteico de quinoa (CPQ) y fracción globulina (G)**

Característica	Hidrolizados con termolisina		
	CPQ		G
	Tiempo de hidrólisis (4h)	Tiempo de hidrólisis (24h)	Tiempo de hidrólisis (4h)
Grado de hidrólisis (%)	25.74 ± 1.14	35.49 ± 0.85	20.22 ± 1.48
IC <sub>50</sub> para la actividad inhibitoria de DPP-IV (mg proteína /mL)	3.87 ± 0.37 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.41 ± 0.45 <sup>ab</sup>
IC <sub>50</sub> para la actividad inhibitoria de ECA (mg proteína /mL)	0.21 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>b</sup>

Resultados se expresan como en promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla 15 se aprecia que CPQ obtuvo un grado de hidrólisis (GH) promedio de  $25.74 \pm 1.14$  (por ciento) y  $35.49 \pm 0.85$  (por ciento), para 4 y 24 horas de hidrólisis; mientras G reportó un valor de  $20.22 \pm 1.48$  por ciento, menor al obtenido por CPQ para ambos tiempos. Roa et al. (2021) menciona que el grado final de hidrólisis está determinado por la concentración de sustrato; correlación enzima/sustrato; tiempo de incubación y condiciones físicas y químicas como temperatura y pH. En esta investigación se utilizó la enzima termolisina, que es una metaloproteasa de zinc y es termoestable que debido a que posee cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Dononue et al., 1994 citado por Ke et al., 2013; Blumberger et al., 2007) y escinde preferentemente sitios con residuos voluminosos y aromáticos (Ile, Leu, Val, Ala, Met, Phe) en la posición P1' (Keil, 1992). Ejerce el rol de endoproteasa es decir actúa sobre las moléculas del interior (Endo, 1962 citado por Van den Burg y Eijsink, 2013).

En el caso de CPQ el GH aumentó cuando se incrementó el tiempo de hidrólisis alcanzando un valor de  $35.49 \pm 0.85$  por ciento a las 24 horas de incubación con termolisina, como señalan Thamnarathip et al. (2016) es común que el GH aumente con el avance del tiempo de hidrólisis para todas las proteasas, además un GH más alto indica una mayor cantidad de enlaces peptídicos cortados. El GH obtenido ( $35.49 \pm 0.85$  por ciento) para HCP (24 horas) es cercano a los porcentajes de grado de hidrólisis obtenidos en el estudio in silico previo (Tabla 9) valores entre 29.4 y 33.6 por ciento en las globulinas de quinua estudiadas (11S y 13S, respectivamente).

Los GH obtenidos tanto para CPQ (4 y 24 h) y G (4 h) fueron menores a los reportados por Esteve et al. (2015) quienes obtuvieron  $64.6 \pm 5.7$  por ciento, usando termolisina para hidrolizar un aislado de proteína de semilla de olivo (durante 2 h) y por García et al. (2016) ( $46 \pm 7$  por ciento, 4 h de hidrólisis) en proteína de semilla de albaricoque; pero mayores a los valores reportados por Galante et al. (2019) ( $17 \pm 2$  por ciento) en hidrolizados enzimáticos de quinua utilizando una proteasa de serina de *Aspergillus niger* y por You et al. (2022) en hidrolizados de quinua roja germinada ( $12.26 \pm 0.10$  por ciento) usando pepsina y tripsina durante 4 h de hidrólisis.

De acuerdo a Chirinos et al. (2021) el valor IC<sub>50</sub> se define como la concentración de péptido (mg/mL) que se necesita para generar una inhibición del 50 por ciento de una determinada

molécula diana. Este valor se halla mediante un análisis de regresión de la inhibición de DPP-IV (%) frente al log de la concentración de péptidos. En la Tabla 15 se muestran que el CPQ inhiben a un 50 por ciento la actividad de la DPP-IV a concentraciones de  $3.87 \pm 0.37$  y  $2.40 \pm 0.13$  mg/mL para los tiempos de 4 y 24 h respectivamente, es decir el hidrolizado de concentrado proteico de quinua al tiempo de 24 h presenta mayor potencial para inhibir la enzima DPP-IV, esto podría deberse a que al haber un mayor tiempo de hidrólisis, se pudo obtener mayores péptidos con la capacidad de interactuar con la DPP-IV (Boachie et al. 2019). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de IC<sub>50</sub> (mg/mL) de CPQ ( $3.87 \pm 0.37$ ) y G ( $3.41 \pm 0.45$ ) para la hidrólisis de las 4 h.

Boachie et al. (2019) evaluaron los efectos hipoglucemiantes de proteína de guandú hidrolizada luego de una hidrólisis con termolisina durante 4 h (pH 8, 50°C) e informaron un valor IC<sub>50</sub> (4.775 mg/mL), valor mayor al obtenido tanto en CPQ y G usando las mismas condiciones de incubación con termolisina. Vilcacundo et al. (2017) estudiaron la actividad hipoglucemiante en hidrolizado de quinua luego de ser sometido a digestión simulada con pepsina durante 120 minutos, determinando que se necesita una concentración de 2.52 mg/mL para inhibir el 50 por ciento de la DPP-IV, este resultado es cercano al obtenido en la investigación para el CPQ en el tiempo de 24 h ( $2.40 \pm 0.13$  mg/mL).

En la Tabla 15 se reportaron valores de IC<sub>50</sub> (mg proteína /mL) para la inhibición de la ECA, siendo para CPQ de  $0.21 \pm 0.02$  y  $0.20 \pm 0.02$ , para las hidrólisis de 4 y 24 h, respectivamente, sin diferencias significativas en ambos tratamientos ( $p > 0.05$ ); ambos valores fueron inferiores al IC<sub>50</sub> (0.37 mg/mL) al de la fracción globulina de quinua (G) hidrolizada por 4 h. A su vez los valores de IC<sub>50</sub> resultaron inferiores a los obtenidos por Ambigaipalan *et al.* (2015) en hidrolizados de semillas de dátil usando termolisina (2.08 mg/mL), en hidrolizados de quinua con la proteasa vegetal papaína (0.88 mg/mL) (Nongonierma *et al.*, 2015) y en globulinas hidrolizadas de granos de melocotón por tratamiento con alcalasa (0.78 mg/mL) (Wang *et al.*, 2022). En general, los resultados obtenidos *in vitro* dan cuenta del potencial de inhibición de ECA y DPP-IV encontrado previamente en el análisis *in silico*, lo que da cuenta de la potencialidad de las proteínas de la quinua evaluadas como fuente de péptidos antihipertensivos e hipoglucemiantes empleando a la termolisina en la hidrólisis.



## V. CONCLUSIONES

1. Los resultados del análisis *in silico* indicaron que la fracción 11S globulina de quinua sometida a hidrólisis con termolisina puede ser una buena fuente de péptidos bioactivos con efecto antihipertensivo e hipoglucemiante, destacando los péptidos FPR y YSPHW respectivamente, mientras IPPG destacó en ambas actividades.
2. La evaluación de la estabilidad de los péptidos frente a la digestión gastrointestinal evaluada *in silico*, pronosticó péptidos con actividad antihipertensiva para PR, hipoglucemiante para SPH y antihipertensiva e hipoglucemiante para IPPG, todos ellos con alto grado de hidrofobicidad y no mostraron toxicidad.
3. Mediante el modelamiento molecular, se demostró que los péptidos bioactivos resultantes de la proteólisis con termolisina y sometidas a digestión gastrointestinal podían inhibir a las enzimas ECA (péptido IPPG) y DPP-IV (SPH e IPPG) debido a las interacciones establecidas con los sitios activos de las enzimas.
4. Los resultados de la hidrólisis con termolisina y subsecuente análisis *in vitro* evidenciaron el potencial de inhibición de la ECA y DPP-IV en los péptidos derivados del concentrado proteico y de la fracción globulina de la quinua, guardando relación con el análisis *in silico*, desarrollado previamente.
5. El potencial de inhibición de la ECA y DPP-IV de la proteína de quinua, podría ser empleado en la obtención de productos proteicos derivados como: hidrolizados, productos fermentados, fracciones de péptidos enriquecidos, nutraceúticos, ingredientes funcionales, en la prevención a la diabetes e hipertensión.

## VI. RECOMENDACIONES

- Sintetizar y analizar el efecto antihipertensivo e hipoglucemiante de los péptidos con mayor bioactividad predecida del estudio *in silico*; así también como someterlos a condiciones de digestión gastrointestinal *in vitro* y evaluar las propiedades bioactivas para así confirmar los resultados encontrados del estudio *in silico* como *in vitro*.
- Evaluar diferentes proteínas de quinua bajo hidrólisis *in silico* considerando a diferentes proteasas y determinar las diferentes propiedades bioactivas además de la antihipertensiva e hipoglucemiante en las fracciones de péptidos liberados.
- Evaluar concentrados proteicos de quinua de otras variedades y estudiar las propiedades antihipertensiva e hipoglucemiante *in vitro*.
- Obtener un aislado proteico a partir del concentrado realizando un proceso de diafiltración, someter este producto a hidrólisis *in vitro* y hacer un estudio de sus propiedades bioactivas.
- Realizar estudios *in vivo* de toxicidad de los péptidos estudiados para comprobar los resultados obtenidos en el estudio *in silico*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in food and nutrition research*, 58, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Adekoya, O. A., & Sylte, I. (2009). The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chemical biology & drug design*, 73(1), 7–16. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00757.x>
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27:1256–1262.
- Aertgeerts, K., Ye, S., Tennant, M. G., Kraus, M. L., Rogers, J., Sang, B. C., Skene, R. J., Webb, D. R., & Prasad, G. S. (2004). Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 13(2), 412–421. <https://doi.org/10.1110/ps.03460604>
- Ahmed, T., Sun, X., & Udenigwe, C. (2022). Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: A systematic review. *Trends in Food Science and Technology*, 120, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.008>
- AOAC. (1995). The Association of Analytical Chemists: Official methods of analysis. 5<sup>th</sup> ed. Washington D.C, USA

- Alfonso, E., Reyes, F., Pérez, M., Batista, Y., & Peña, Y. (2016). Inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa 4 y una nueva estrategia farmacológica en la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Revista Cubana de Medicina*, 55(3), 239-256. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475232016000300006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475232016000300006&lng=es&tlng=es).
- Aluko, R. (2015). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 235–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- Apaza, V.; Cáceres, G.; Estrada, R.; Pinedo, R. (2013). Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Recuperado de <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/inia/76>
- Acquah, C., Stefano, E. D., & Udenigwe, C. C. (2018). Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *Journal of Food Bioactives*, 4, 88–98. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4164>
- Araki, M., Kanegawa, N., Iwata, H., Sagae, Y., Ito, K., Masuda, K., & Okuno, Y. (2020). Hydrophobic interactions at subsite S1' of human dipeptidyl peptidase IV contribute significantly to the inhibitory effect of tripeptides. *Heliyon*, 6(6), e04227. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04227>
- Barrero, J., Cruz, C., Casallas, J., Vásquez, J. (2021). Evaluación *in silico* de péptidos bioactivos derivados de la digestión de proteínas presentes en la leche de bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*). *Tecnológicas*, 24 (50), 126-150. <https://doi.org/10.22430/22565337.1731>

- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Food chemistry (4th ed.). [version Adobe Digital Editions]. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Berman, H. , Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Blumberger, J., Lamoureux, G., & Klein, M. L. (2007). Peptide Hydrolysis in Thermolysin: Ab Initio QM/MM Investigation of the Glu143-Assisted Water Addition Mechanism. *Journal of chemical theory and computation*, 3(5), 1837–1850. <https://doi.org/10.1021/ct7000792>
- Boachie, R., Okoro, F., Imai, K., Sun, L., Elom, S., Nwankwo, J., Ejike, C., & Udenigwe, C.(2019). Enzymatic release of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (gliptins) from pigeon pea (*Cajanus cajan*) nutrient reservoir proteins: In silico and in vitro assessments. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13071>
- Borawska-Dziadkiewicz, J., Darewicz, M., & Tarczyńska, A. S. (2021). Properties of peptides released from salmon and carp via simulated human-like gastrointestinal digestion described applying quantitative parameters. *PloS one*, 16(8), e0255969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255969>
- Brend, Y., Galili, L., Badani, H., Hovav, R., & Galili, S. (2012). Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Red and Yellow Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds as Affected by Baking and Cooking Conditions. *Food and Nutrition Sciences*, 03(08), 1150–1155. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.38151>
- BRENDA Enzyme Database. (s/f). [Brenda-enzymes.org](https://www.brenda-enzymes.org). Recuperado el 11 de junio de 2022, de <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- Bruno, S., Kudre, T., & Bhaskar, N. (2019). Effects of different pretreatments and proteases on recovery, umami taste compound contents and antioxidant potentials of *Labeo rohita*

head protein hydrolysates. *Journal of food science and technology*, 56(4), 1966–1977.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03663-3>

Carrillo-Larco, Rodrigo M, & Bernabé-Ortiz, Antonio. (2019). Diabetes mellitus tipo 2 en Perú: una revisión sistemática sobre la prevalencia e incidencia en población general. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36(1), 26-36.  
<https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.4027>

Chirinos, R., Cerna, E., Pedreschi, R., Calsin, M., Aguilar-Galvez, A., & Campos, D. (2021). Multifunctional in vitro bioactive properties: Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive of protein hydrolyzates from tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) obtained by enzymatic biotransformation. *Cereal Chemistry*, 98(2), 423–433.  
<https://doi.org/10.1002/cche.10382>

Cisneros, M. (2017). Purificación de péptidos bioactivos de quinua (*Chenopodium quinoa*) con capacidad antioxidante y antihipertensiva. (Tesis para optar por el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Recuperadode:<https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/4003>

Corradi, H., Chitapi, I., Sewell, B. , Georgiadis, D., Dive, V., Sturrock, E., & Acharya, K. (2007). The structure of testis angiotensin-converting enzyme in complex with the C domain-specific inhibitor RXPA380. *Biochemistry*, 46(18), 5473–5478.  
<https://doi.org/10.1021/bi700275e>

Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, 299, 125161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161>

Daliri, H., Ahmadi, R., Pezeshki, A., Hamishehkar, H., Mohammadi, M., Beyrami, H., Heshmati, M. khakbaz, Ghorbani, M. (2021). Quinoa bioactive protein hydrolysate produced by pancreatin enzyme- Functional and antioxidant properties. *Lwt*, 111853.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111853>

Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, 9(4), 316. doi:10.3390/nu9040316

Delaune, K., & Alsayouri, K. (2022). Physiology, noncompetitive inhibitor. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424826/>

Elsohaimy, S. A., Refaay, T. M., & Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Science*, 60(2), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.007>

Esteve, C., Marina, M. L., & García, M. C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food chemistry*, 167, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.090>

Ejima, A., Nakamura, M., Suzuki, Y. A., & Sato, K. (2018). Identification of food-derived peptides in human blood after ingestion of corn and wheat gluten hydrolysates. *Journal of Food Bioactives*, 2, 1–8. <https://doi.org/10.31665/jfb.2018.2145>

FAO. (2019). Faostat: FAO Statistical Databases. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>

Ferreira, S., Bartelt, D., & Greene, L. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9(13), 2583–2593. <https://doi.org/10.1021/bi00815a005>

Forli, S., Huey, R., Pique, M., Sanner, M., Goodsell, D., & Olson, A. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature*

protocols, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

Fu, Y., Young, J., Rasmussen, M., Dalsgaard, T., Lametsch, R., Aluko, R., & Therkildsen, M. (2016). Angiotensin I–converting enzyme–inhibitory peptides from bovine collagen: insights into inhibitory mechanism and transepithelial transport. *Food research international*, 89(1), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.037>

Gao, J., Gong, H., & Mao, X. (2020). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity and related molecular mechanism of bovine  $\alpha$ -lactalbumin-derived peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(13), 3009. <https://doi.org/10.3390/molecules25133009>

Galante, M., De Flaviis, R., Boeris, V., & Spelzini, D. (2019). Effects of the enzymatic hydrolysis treatment on functional and antioxidant properties of quinoa protein acid-induced gels. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 118(108845), 108845. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108845>

García, M., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. (2013). Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>

García, M., González-García, E., Vásquez-Villanueva, R., & Marina, M. (2016). Apricot and other seed stones: Amygdalin content and the potential to obtain antioxidant, angiotensin I converting enzyme inhibitor and hypocholesterolemic peptides. *Food and Function*, 7(11), 4693–4701. <https://doi.org/10.1039/c6fo01132b>

Guerreo-Ochoa, M., Pedreschi, R. & Chirinos, R. (2015), Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Int J Food Sci Technol*, 50: 1815-1822. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12834>

Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., & Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy



- processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223–239.  
<https://doi.org/10.1080/10408690290825538>
- Gordillo-Bastidas, E., Díaz-Rizzolo, D., Roura, E., Massanés, T., & Gomis, R. (2016). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from nutritional value to potential health benefits: An integrative review. *Journal of nutrition & food sciences*, 06(03).  
<https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000497>
- Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). Milk proteins: An overview. En *Milk Proteins* (pp. 21–98). Elsevier.
- Gromiha, M. (2010). Protein Interactions. En *Protein Bioinformatics* (pp. 247–302). Elsevier.
- Guo, H., Richel, A., Hao, Y., Fan, X., Everaert, N., Yang, X., & Ren, G. (2020). Novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides released from quinoa protein by in silico proteolysis. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1415–1422. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1423>
- Gupta, M., Sharma, R., & Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising?. *Computational Biology and Chemistry*, 76, 210–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005>
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Raghava, G. P. S. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS One*, 8(9), e73957.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G.

- R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Hsieh, C.-H., Wang, T.-Y., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Hsieh, Y.-L., Wu, S.-X., & Hsu, K.-C. (2016). In silico, in vitro and in vivo analyses of dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity and the antidiabetic effect of sodium caseinate hydrolysate. *Food & Function*, 7(2), 1122–1128. <https://doi.org/10.1039/c5fo01324k>
- INIA. (2012). Quinoa Inia 415 Pasankalla. Instituto Nacional de Innovacion Agraria. Recuperadode:[https://www.inia.gob.pe/wpcontent/uploads/investigacion/programa/sistP roductivo/variedad/quinoa/INIA\\_415.pdf](https://www.inia.gob.pe/wpcontent/uploads/investigacion/programa/sistP roductivo/variedad/quinoa/INIA_415.pdf)
- Iwaniak, A., & Dziuba, J. (2009). Animal and Plant Proteins as Precursors of Peptides with ACE Inhibitory Activity -An in silico Strategy of Protein Evaluation. *Food Technology and Biotechnology*, 47(4), 441–449.
- Iwaniak, A., Darewicz, M., Mogut, D., & Minkiewicz, P. (2019). Elucidation of the role of in silico methodologies in approaches to studying bioactive peptides derived from foods. *Journal of Functional Foods*, 61(103486), 103486. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103486>
- Jiang, B., Tsao, R., Li, Y., & Miao, M. (2014). Food safety: Food analysis technologies/techniques. En *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (pp. 273–288). Elsevier.
- Ke, Q., Chen, A., Minoda, M., & Yoshida, H. (2013). Safety evaluation of a thermolysin enzyme produced from *Geobacillus stearothermophilus*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.046>
- Keil, B. (1992) Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg New York, p.

- Kenakin, T. P. (2012). Enzymes as Drug Targets. *En Pharmacology in Drug Discovery* (pp. 105–124). Elsevier.
- Kim, S., Thiessen, P., Bolton, E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kim, S., Ngo, D., & Vo, T. (2012). Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 249–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00016-0>
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Lacroix, I., & Li-Chan, E. (2012). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 403–422. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.008>
- Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W449-54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>
- Majid, A. & Priyadarshini, C. (2020). Millet derived bioactive peptides: A review on their functional properties and health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(19): 3342–3351. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1686342>

- Marcone, M., Yada, R., Aroonkamonsri, W., & Kakuda, Y. (1997). Physico-chemical properties of purified isoforms of the 12S seed globulin from mustard seed (*Brassica alba*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 65–74. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.65>
- Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2147–2163. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308312>
- Myatt, G. J., Beilke, L. D., & Cross, K. P. (2017). In Silico Tools and their Application. En *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 156–176). Elsevier.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (Midagri). (2021). Observatorio de las Siembras y Perspectivas de la Producción: Quinoa. Recuperado de <http://repositorio.minagri.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/MIDAGRI/835/OBSERVATORIO%20DE%20QUINUA%20ENERO%202021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Morales, D., Miguel, M., & Garcés-Rimón, M. (2021). Pseudocereals: a novel source of biologically active peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1537–1544. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761774>
- Mudgil, P., Kilari, B. P., Kamal, H., Olalere, O. A., FitzGerald, R. J., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2020). Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. *Journal of Cereal Science*, 96(103130), 103130. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103130>
- Murphy, K., & Matanguihan, J. (2015). Quinoa: Improvement and sustainable production: Murphy/quinoa: Improvement and sustainable production. John Wiley & Sons, Inc.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory

peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773–791. <https://doi.org/10.2174/138161207780363068>

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 4369359, Sitagliptin. Retrieved August 28, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4369359>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5362119, Lisinopril. Retrieved August 28, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lisinopril#section=2D-Structure..>

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of dairy science*, 78(4), 777–783. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76689-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76689-9)

Nongonierma, A., & FitzGerald, R.(2017). Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *Journal of Food Biochemistry*, e12451. doi:10.1111/jfbc.12451

Nongonierma, A., Le Maux, S., Dubrulle, C., Barre, C., & FitzGerald, R. (2015). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *Journal of cereal science*, 65, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.004>

Norris, R., & FitzGerald, J. (2013). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *En Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. InTech.

Langyan, S., Khan, F., Yadava, P., Alhazmi, A., Mahmoud, S. , Saleh, D., Zuan, A., & kumar, A. (2021). In silico proteolysis and analysis of bioactive peptides from sequences of fatty acid desaturase 3 (FAD3) of flaxseed protein. *Saudi Journal of Biological*

Sciences, 28(10), 5480–5489. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.027>

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.

Olokoba, A. , Obateru, O. , & Olokoba, L. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269–273. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.68>

Panjaitan, F., Gomez, H., & Chang, Y. (2018). In Silico Analysis of Bioactive Peptides Released from Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) Roe Proteins Identified by Proteomics Approach. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(11), 2910. <https://doi.org/10.3390/molecules23112910>

Parenti, M. & Rastelli, G. (2012). Advances and applications of binding affinity prediction methods in drug discovery. *Biotechnology Advances*, 30(1), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.003>

Pawar, S., & Rohane, S. (2021). Review on Discovery Studio: An important Tool for Molecular Docking. *Asian Journal Of Research in Chemistry*, 14(1), 1–3. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2021.00014.6>

Peighambardoust, S., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J.(2021). A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications. *Biomolecules*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050631>

Pérez-Durillo, F. (2016). Síndrome metabólico asociación entre glp-1 y factores de riesgo cardiovascular. *Universidad de Jaén*. <http://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/782/1/9788491590118.pdf>

- Perry, S., & McClements D. (2020). Recent Advances in Encapsulation, Protection, and Oral Delivery of Bioactive Proteins and Peptides using Colloidal Systems. *Molecules*, 25(5):1161. <https://doi.org/10.3390/molecules25051161>
- Pina, A., & Roque, A. (2009). Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 22(2), 162–168. <https://doi.org/10.1002/jmr.905>
- Quelal, M., Nazate, K., Villacrés, E., Cuarán, J. (2019). Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinua *Chenopodium quinoa* Willd. *Enfoque UTE*, 10(2), 79-89. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v10n2.424>
- Qiao, M., Tu, M., Chen, H., Mao, F., Yu, C., & Du, M. (2018). Identification and In Silico Prediction of Anticoagulant Peptides from the Enzymatic Hydrolysates of *Mytilus edulis* Proteins. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2100. <https://doi.org/10.3390/ijms19072100>
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J. K., Pihlava, J., & Mattila, P.(2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120(1), 128–133. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.087
- Roa, D., Bravo, J., & Hoyos, J. (2021). Monitoring of the hydrolysis of Quinoa, Rice and Soy proteins by FT-IR spectroscopy. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 1-12. <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v.n.2022.1941>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., & Nakano, T. (2002). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory

- peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6245–6252. <https://doi.org/10.1021/jf020482t>
- Seclén, S. (2015). Diabetes Mellitus en el Perú: hacia dónde vamos. *Revista medica herediana : organo oficial de la Facultad de Medicina “Alberto Hurtado”, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru*, 26(1), 3. <https://doi.org/10.20453/rmp.2015.2340>
- Shen, C. (2019). Quantification and analysis of proteins. En *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 187–214). Elsevier.
- Shi, Z., Hao, Y., Teng, C., Yao, Y., & Ren, G. (2019). Functional properties and adipogenesis inhibitory activity of protein hydrolysates from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Science and Nutrition*, 7(6), 2103–2112. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1052>
- Singh, B., Aluko, R., Hati, S., & Solanki, D. (2022). Bioactive peptides in the management of lifestyle-related diseases: Current trends and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(17), 4593–4606. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1877109>
- Sitanggang, A., Putri, J., Palupi, N., Hatzakis, E., Syamsir, E., & Budijanto, S. (2021). Enzymatic preparation of bioactive peptides exhibiting ace inhibitory activity from soybean and velvet bean: A systematic review. *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26133822>
- Sixto-López, Y. & Correa-Basurto, J. (2021). Docking Approaches Used in Epigenetic Drug Investigations. *Academic Press*. 367-390. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00016-3>
- Soto, E., Mercado, W., Estrada, R., Repo, R., Díaz, F., & Díaz, G. (2015). El mercado y la



producción de quinua en el Perú. In Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Recuperado de: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2652/BVE17038730e.pdf;jsessionid=F2787A69DA260BD644CA9D14308AA9B0?sequence=1>

Steffolani, M., Villacorta, P., Morales-Soriano, E., Repo-Carrasco, R., León, A., & Pérez, G. (2016). Physicochemical and Functional Characterization of Protein Isolated from Different Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Cereal chemistry*, 93(3), 275–281. <https://doi.org/10.1094/cchem-04-15-0083-r>

Repo-Carrasco-Valencia, R., Hellström, J., Pihlava, J., & Mattila, P. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>

Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., & Jacobsen, S. E. (2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*, 19(1–2), 179–189. <https://doi.org/10.1081/fri-120018884>

Ruiz, M. (2007). Las Incretinas en la fisiopatología de la Diabetes. Disponible en <https://profesionales.msd.com.ar/campanas/incretinas.xhtml>

Pedrali, D., Giupponi, L., & Peña-Armada, R. (2022). The quinoa variety influences the nutritional and antioxidant profile rather than the geographic factors. *Food Chemistry*, 133531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133531>

Punia, S., Siroha, A.K., & Kumar, M. (2021). *Handbook of Cereals, Pulses, Roots, and Tubers: Functionality, Health Benefits, and Applications* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003155508>

Pruess, M. y Apweiler, R. (2003). Recursos bioinformáticos para el análisis de proteomas in

silico. *Revista de biomedicina y biotecnología*, 2003 (4), 231-236.  
<https://doi.org/10.1155/S1110724303209219>

Tzakos, A., & Gerothanassis, I. (2005). Domain-selective ligand-binding modes and atomic level pharmacophore refinement in angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitors. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 6(6), 1089–1103.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.200400386>

Tahir, R., Bashir, A., Yousaf, M. N., Ahmed, A., Dali, Y., Khan, S., & Sehgal, S. (2020). In Silico identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from MRJP1. *PloS One*, 15(2), e0228265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228265>

Tanwar, B., Goyal, A., Irshaan, S., Kumar, V., Sihag, M., Patel, A., & Kaur, I. (2019). Quinoa. In J. Johnson & T. C. Wallace (Eds.), *Whole grains and their bioactives: Composition and health* (pp. 269–305). Wiley.

Thamnarathip, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Nitisinprasert, S., Tadakittisarn, S., & Vardhanabhuti, B. (2016). Extraction and characterisation of Riceberry bran protein hydrolysate using enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 194–202. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13008>

Toapanta, A., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Analysis of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 332–334.

Torrucó-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* Seeds. *LWT Food Science and Technology*, 42(10), 1597–1660. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.006>

Tran, K. N., Witt, T., Gidley, M. J., & Fitzgerald, M. (2018). Accounting for the effect of

degree of milling on rice protein extraction in an industrial setting. *Food Chemistry*, 253, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.14>

Tuomilehto, J., Lindström, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M., Mikkola, L., Nissinen, A. (2004). Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 18(11), 795–802. doi:10.1038/sj.jhh.1001745

Udenigwe, C., & Aluko, R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>

Udenigwe, C., Gong, M., Wu, S. (2013). In silico analysis of the large and small subunits of cereal RuBisCO as precursors of cryptic bioactive peptides. *Process Biochemistry*, 48(11), 1794–1799. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.013>

Van de Vondel, J., Lambrecht, M. A., & Delcour, J. A. (2020). Osborne extractability and chromatographic separation of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) wholemeal. *Lwt*, 126(February), 109321. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109321>

Van den Burg, B., & Eijsink, V. (2013). Thermolysin and Related *Bacillus* Metallopeptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (pp. 540–553). Elsevier.

Vargas, P., Arteaga, R., & Cruz, L. (2019). Análisis bibliográfico sobre el potencial nutricional de la quinua (*Chenopodium quinoa*) como alimento funcional. *Centro Azúcar*, 46(4), 89-100. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612019000400089&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612019000400089&lng=es&tlng=es).

Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., & Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(15),

2541–2547. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4158>

Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *The British Journal of Nutrition*, 92(3), 357–366. <https://doi.org/10.1079/bjn20041189>

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

Wang, L., Li, A., Zhong, Z., Tang, Y., Li, D., & Xiao, J. (2022). Isolation, purification and bioactivity of ACE inhibitory peptides from peach kernel protein enzymatic hydrolysate. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.107921>

Wang, F., Yu, G., Zhang, Y., Zhang, B., Fan, J. (2015). Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides Derived from Oat (*Avena sativa* L.), Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), and Highland Barley (*Hordeum vulgare trifurcatum* (L.) Trofim) Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43): 9543–9549. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04016>

Wei, Y., Liu, Y., Li, Y., Wang, X., Zheng, Y., Xu, J., Sang, S., Liu, Y. (2022). A Novel Antihypertensive Pentapeptide Identified in Quinoa Bran Globulin Hydrolysates: Purification, In Silico Characterization, Molecular Docking with ACE and Stability against Different Food-Processing Conditions. *Nutrients*, 14, 2420. <https://doi.org/10.3390/nu14122420>

Wong, F., Ong, J., Kumar, D., & Chai, T. (2021). In silico identification of multi-target anti-SARS-CoV-2 peptides from quinoa seed proteins. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3), 1837–1847. <https://doi.org/10.1007/s10989-021->

- Wu, J., Aluko, R., & Nakai, S. (2006). Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732–738. <https://doi.org/10.1021/jf0512631>
- Xu, D., & Xu, Y. (2004). Protein databases on the internet. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 19, Unit–19.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1904s68>
- Yap-Campos, K., Sánchez-Gálvez, X., & Rivero-López, C. A. (2017). El papel de los inhibidores de la dpp 4: un enfoque actual en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2. *Atención familiar*, 24(3), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.af.2017.07.008>
- Yan, W., Lin, G., Zhang, R., Liang, Z., Wu, L., & Wu, W. (2020). Studies on molecular mechanism between ACE and inhibitory peptides in different bioactivities by 3D-QSAR and MD simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 304, 112702. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112702>
- You, H., Wu, T., Wang, W., Li, Y., Liu, X., & Ding, L. (2022). Preparation and identification of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from quinoa protein. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 156(111176), 111176. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111176>
- Yuan, S., Chan, H., & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as a platform for computational drug design: PyMOL: platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Computational Molecular Science*, 7(2), e1298. <https://doi.org/10.1002/wcms.1298>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: RESULTADO DE GRADO DE HIDRÓLISIS DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA

Producto	Tiempo de hidrólisis (h)	Repetición	Grado de hidrólisis (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Hidrolizado de concentrado proteico de quinua	4	R1	24.95	1.14	4.45
		R2	27.36		
		R3	24.92		
	24	R1	35.73	0.69	1.94
		R2	36.19		
		R3	34.55		
Hidrolizado de globulina de quinua	4	R1	21.56	1.48	7.31
		R2	18.16		
		R3	20.95		

**ANEXO 2: VALOR IC<sub>50</sub> (INHIBICIÓN DE LA DPP-IV) DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA**

<b>Producto</b>	<b>Tiempo de hidrólisis (h)</b>	<b>Repetición</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg proteína/mL)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variabilidad (%)</b>
Hidrolizado de concentrado proteico de quinua	4	R1	4.40	0.37	9.66
		R2	3.63		
		R3	3.58		
	24	R1	2.55	0.13	5.28
		R2	2.24		
		R3	2.43		
Hidrolizado de globulina de quinua	4	R1	3.75	0.45	13.19
		R2	2.78		
		R3	3.70		

**ANEXO 3: VALOR IC<sub>50</sub> (INHIBICIÓN DE LA ECA) DE HIDROLIZADO DE CONCENTRADO PROTEICO Y GLOBULINA DE QUINUA**

<b>Producto</b>	<b>Tiempo de hidrólisis (h)</b>	<b>Repetición</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg proteína/mL)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variabilidad (%)</b>
Hidrolizado de concentrado proteico de quinua	4	R1	0.19	0.02	9.45
		R2	0.20		
		R3	0.23		
	24	R1	0.21	0.01	7.68
		R2	0.19		
		R3	0.18		
Hidrolizado de globulina de quinua	4	R1	0.37	0.03	8.09
		R2	0.34		
		R3	0.40		



## ANEXO 4: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE DPP-IV

Variable dependiente: IC<sub>50</sub>- Inhibición de la DPP-IV

Factor: Muestra

Número de niveles: 3

**Tabla ANOVA**

<b>Fuente</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Muestra</b>	2	3.377	1.6883	9.42	0.014
<b>Error</b>	6	1.075	0.1792		
<b>Total</b>	8	4.452			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Tukey

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>	
<b>IC50 HCP-4 h</b>	3	3.869	A	
<b>IC50 HG-4 h</b>	3	3.412	A	B
<b>IC50 HCP-24 h</b>	3	2.403		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ANEXO 5: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE ECA

Variable dependiente: IC<sub>50</sub>- Inhibición de la ECA

Factor: Muestra

Número de niveles: 3

### Tabla ANOVA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Muestra	2	0.057480	0.028740	57.03	0.000
Error	6	0.003024	0.000504		
Total	8	0.060503			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Tukey

	Casos	Media	Agrupación
IC50 HCP-4 h	3	0.2083	B
IC50 HG-4 h	3	0.3707	A
IC50 HCP-24 h	3	0.1948	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANEXO 6: RESULTADO DE LA PROTEÓLISIS *in silico* DE LA PROTEÍNA DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE QUINUA**

Proteasa	Proteína	NCBI (Número de acceso)	Número de fragmentos liberados				Número total
			Aminoácidos libres	2-5 residuos	6-10 residuos	>10 residuos	
Termolisina	11S seed storage globulin	AAS6703 6.1	64	71	15	5	155
	11 S globulin seed storage protein 2-like	XP_02177 0184.1	51	76	22	2	151
	13S globulin seed storage protein 1-like	XP_02175 2233.1	65	77	15	4	161
	13S globulin seed storage protein 2-like	XP_02175 2668.1	60	88	12	5	165

**ANEXO 7: SECUENCIAS DE PÉPTIDOS PRODUCIDOS A PARTIR DE LA PROTEÓLISIS in silico CON TERMOLISINA MEDIANTE BIOPEP-UWM Y SUS BIOACTIVIDADES POR PEPTIDERANKER**

Tabla de resultados de la acción de la termolisina en 11S seed storage globulin (AAS67036.1)

<b>Nombre de proteína</b>	<b>Results of enzyme action</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Bioactividad (Peptide Ranker)</b>
<b>11S seed storage globulin (AAS67036.1)</b>	F	[9-9] [158-158] [199-199] [410-410]	0.999052
	FG	[245-246]	0.993072
	M	[1-1]	0.970074
	FN	[337-338]	0.951176
	FEW	[421-423]	0.944294
	FSG	[233-235]	0.889111
	LM	[110-111]	0.864197
	AMP	[159-161] [448-450]	0.847715
	AHW	[165-167]	0.847307
	LP	[339-340]	0.79612
	FESMSQESWREGMKRGMRR	[119-139]	0.748894
	FQCSG	[68-74]	0.736091
	IM	[361-362]	0.696975
	YG	[375-376]	0.692969

«Continuación»

L	[8-8] [10-10]	0.639092
	[17-17]	
	[19-19]	
	[87-87]	
	[88-88]	
	[98-98]	
	[176-176]	
	[181-181]	
	[201-201]	
	[267-267]	
	[354-354]	
	[403-403]	
	[435-435]	
	[439-439]	
	[477-477]	
	[490-490]	
AGKPQQEHSRHRGGESQRGERGSGG N	[202-231]	0.579552
LR	[345-346]	0.569984
AGR	[328-330]	0.548993
AG	[162-163]	0.546994
YR	[466-467]	0.525242
YPKR	[195-198]	0.510147
FQT	[436-438]	0.499876
APH	[363-365]	0.478155
Y	[100-100]	0.443611
	[200-200]	
LPS	[89-91]	0.411199
AR	[309-310]	0.394584
IPGCPET	[112-118]	0.385403

«Continuación»

YRN	[355-357]	0.37974
ICS	[306-308]	0.372793
LH	[272-273]	0.337686
IR	[446-447]	0.332363
FTSGPE	[92-97]	0.329544
VRGRGR	[377-382]	0.324985
IRH	[149-151]	0.317609
LSCS	[11-14]	0.301741
ISG	[107-109]	0.285281
LNGCMGQGRMREMQGNECQ	[20-38]	0.261683
LN	[368-369]	0.257214
FDDE	[394-397]	0.255546
LRQGH	[152-156]	0.247253
YN	[366-367]	0.242561
IDR	[39-41]	0.231194
I	[15-15] [99-99]	0.223609
	[157-157]	
	[180-180]	
	[241-241]	
	[251-251]	
	[265-265]	
	[341-341]	
	[373-373]	
	[374-374]	
	[385-385]	
	[424-424]	
	[457-457]	
YSPE	[324-327]	0.216688
IRRT	[78-81]	0.215764

«Continuación»

FQDQHQK	[140-148]	0.210703
IKPPSSRS	[275-282]	0.210456
A	[16-16] [44-44]	0.208643
	[168-168]	
	[178-178]	
	[358-360]	
	[411-411]	
	[425-425]	
	[434-434]	
	[445-445]	
	[465-465]	
	[491-491]	
	[492-494]	
LS	[347-348]	0.204782
AEGG	[53-56]	0.198155
FKTCEN	[426-433]	0.19798
IEPNG	[82-86]	0.196429
LQ	[255-256]	0.195333
YQ	[458-459]	0.186203
FRPENQGRQRD	[478-489]	0.180385
LRQGQ	[398-402]	0.173281
LK	[468-469]	0.170035
VPQN	[406-409]	0.160442
LEPTNR	[45-50]	0.15711
LSN	[342-344]	0.141507
YDDEREQRRHRSPRSNG	[283-301]	0.137192
AGRTS	[440-444]	0.134788
AHS	[370-372]	0.134371
ISN	[454-456]	0.133704

«Continuación»

AD	[321-322]	0.132683
FSRSETT	[470-476]	0.132626
AQGNS	[388-392]	0.129262
AEQDERGN	[257-264]	0.126144
LNS	[334-336]	0.125503
IQ	[51-52]	0.123995
IQ	[383-384]	0.123995
IEQGNG	[101-106]	0.121031
YNTGNEP	[169-175]	0.11486
LT	[42-43]	0.114774
IDEPSK	[315-320]	0.110957
LDKD	[191-194]	0.110626
ANQ	[188-190]	0.100699
AQS	[242-244]	0.0915131
AGEEG	[416-420]	0.087617
VWDTQDQQ	[60-67]	0.0872538
AEKG	[349-352]	0.0859709
LGTKT	[236-240]	0.0845107
IDTSNH	[182-187]	0.0781952
ISREQ	[460-464]	0.0778559
LSEN	[311-314]	0.0674307
LE	[451-452]	0.063148
AKSTTT	[2-7]	0.0596984
LTT	[331-333]	0.0596882
VQEG	[268-271]	0.0538684
VN	[386-387]	0.0466201
VS	[75-76]	0.043932
AEK	[252-254]	0.0427184



«Continuación»

---

LTE	[57-59]	0.0415969
VSED	[247-250]	0.0385704
VKQ	[413-415]	0.0382082
LEET	[302-305]	0.0309773
V	[18-18] [77-77]	0.0266109
	[164-164][177-177]	
	[179-179][232-232]	
	[266-266][274-274]	
	[323-323][353-353]	
	[393-393][404-404]	
	[405-405][412-412]	
	[453-453]	

---

Tabla de resultados de la acción de la termolisina en 11S globulin seed storage protein 2-like  
(XP\_021770184.1)

<b>Nombre de proteína</b>	<b>Results of enzyme action</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Bioactividad (Peptide Ranker)</b>
11S globulin seed storage protein 2-like (XP_021770184.1)	F	[204-204][401-401] [474-474][475-475] [486-488]	0.999052
	FPR	[101-103]	0.976464
	FHP	[98-100]	0.933756
	FD	[243-244]	0.922094
	YSPHW	[357-363]	0.869551
	LM	[14-15]	0.864197
	AMP	[445-447]	0.847715
	LC	[12-13]	0.840738
	FT	[407-408]	0.821956
	FRS	[201-203]	0.820357
	IPPG	[166-169]	0.809857
	VHWC	[171-174]	0.796984
	LP	[336-337]	0.79612
	FQCSG	[76-80]	0.736091
	LRP	[231-233]	0.722289
	LG	[114-115]	0.717282
	FPNT	[352-355]	0.707523
	FPGCPET	[118-124]	0.703259
	AMR	[83-85]	0.688815
	FNN	[227-229]	0.67507
AGG	[207-209]	0.66067	

«Continuación»

L	[7-7] [34-34]	0.639092
	[35-35][36-36]	
	[63-63]	
	[104-104]	
	[206-206]	
	[238-238]	
	[249-249]	
	[261-261]	
FE	[418-419]	0.589707
ICTMR	[303-307]	0.581548
LR	[443-444]	0.569984
FDPE	[234-237]	0.568846
YSRHGGR	[321-327]	0.484572
LPN	[95-97]	0.474096
Y	[106-106] [205-205]	0.443611
	[291-291][372-372]	
	[406-406][420-420]	
LPSRGGKSRR	[476-485]	0.419155
AQQCR	[40-44]	0.412145
FTRGD	[158-162]	0.411111
LRH	[339-341]	0.377331
IPQ	[403-405]	0.350787
MGGTK	[1-5]	0.346437
FKTTSSPM KSPM	[423-436]	0.335173
LDMS	[342-345]	0.300483
FGHQKD	[145-150]	0.277888
AGSNG	[413-417]	0.270138
YDDERR RK	[281-290]	0.260096
LN	[328-329]	0.257214
VMDDR	[390-394]	0.237252

«Continuación»

I	[6-6] [37-37] [113-113][163-163] [164-164][186-186] [230-230][262-262] [272-272][330-330] [338-338][356-356]	0.223609
LD	[294-295]	0.219102
LRHN	[308-311]	0.216636
IH	[81-82]	0.213873
INR	[45-47]	0.213706
AH	[378-379]	0.210152
A	[9-9] [19-19] [165-165][170-170] [242-242][364-364] [454-454]	0.208643
LS	[10-11] [28-29] [93-94]	0.204782
YQ	[38-39] [455-456]	0.186203
VDKGEMR	[265-271]	0.173287
LK	[465-466]	0.170035
LGQGSQKR	[20-27]	0.16915
VG	[292-293] [437-438]	0.168013
LTSSEPNQR	[48-56]	0.153155
ISPSE	[457-461]	0.145125
AHQ	[462-464]	0.134662
LNNPSNQ	[190-196]	0.13298
AD	[318-319]	0.132683
IQ	[32-33]	0.123995
VHR	[155-157]	0.120105
VNG	[296-298]	0.118955
VECEGG	[57-62]	0.118294

«Continuación»

VR	[30-31] [263-264]	0.114691
LDNRRE	[312-317]	0.114052
LSPGSEQD	[273-280]	0.113901
LHQK	[151-154]	0.112743
VEKGNM	[346-351]	0.112655
YDSSGRQEEG	[125-134]	0.101521
VNEGEM	[395-400]	0.0912418
LDQT	[197-200]	0.0908519
IERGEG	[107-112]	0.0896911
VGNNGQS	[383-389]	0.0846386
VPED	[245-248]	0.0838336
LTN	[451-453]	0.0829577
IRGDEQRE	[135-144]	0.0805317
YTS	[439-441]	0.0800624
YNDGNEE	[175-181]	0.0703918
VRKMQQTENRG	[250-260]	0.0674137
LSE	[239-241]	0.0639582
VNSHS	[365-369]	0.0613434
YNREHQT	[467-473]	0.0599112
LWDETEEQ	[66-75]	0.0543305
VQHNS	[88-92]	0.0541911
VSS	[16-18]	0.0522738
IE	[64-65]	0.0501024
VTRGE	[373-377]	0.0492096
VND	[187-189]	0.0481238
VS	[409-410] [421-422]	0.043932
VNEHK	[331-335]	0.0434395
VERSSEQRGKHTQQQ	[210-226]	0.0423501
VQ	[380-381] [448-449]	0.0400898
VK	[411-412]	0.03329

«Continuación»

LEET	[299-302]	0.0309773
V	[8-8] [105-105] [182-182][185-185] [320-320][370-370] [371-371][382-382] [402-402][442-442] [450-450]	0.0266109
VT	[86-87] [116-117] [183-184]	0.0265049

**Tabla de resultados de la acción de la termolisina en 13S globulin seed storage protein 1-like (XP\_021752233.1)**

<b>Nombre de proteína</b>	<b>Results of enzyme action</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Bioactividad (Peptide Ranker)</b>
<b>13S globulin seed storage protein 1-like (XP_021752233.1)</b>	F	[22-22] [205-205] [400-400][475-477]	0.999052
	FW	[13-14]	0.998829
	FR	[157-158]	0.985719
	FRC	[83-85]	0.983577
	M	[1-1]	0.970074
	FN	[242-243]	0.951176
	FNG	[230-232]	0.910887
	LC	[17-18]	0.840738
	FRS	[202-204]	0.820357
	LP	[31-32] [329-330]	0.79612

«Continuación»

LKW	[411-413]	0.771521
AM	[422-423]	0.74549
L	[11-11] [12-12]	0.639092
	[19-19][20-20]	
	[23-23][28-28]	
	[33-33][100-100]	
	[101-101][188-188]	
	[207-207][238-238]	
	[299-299][310-310]	
	[331-331][344-344]	
	[382-382][393-393]	
	[394-394][427-427]	
	[467-467]	
FDDR	[384-387]	0.636752
AP	[108-109] [181-182]	0.626856
FESPRGSGSDTTREGQRDQHQB	[132-155]	0.580417
LR	[64-65]	0.569984
AG	[68-69] [86-87]	0.546994
	[169-170]	
FDDEM	[233-237]	0.520044
LMTPHWN	[349-355]	0.500135
IGSP	[165-168]	0.471823
FSPRTRS	[468-474]	0.467599
LCS	[296-298]	0.446501
Y	[93-93]	0.443611
FESPRGSGSDTTREGQRDQHQB	[132-155]	0.580417
LR	[64-65]	0.569984
AG	[68-69] [86-87]	0.546994
	[169-170]	
FDDEM	[233-237]	0.520044
LMTPHWN	[349-355]	0.500135

«Continuación»

IGSP	[165-168]	0.471823
FSPRTRS	[468-474]	0.467599
LCS	[296-298]	0.446501
Y	[93-93] [110-110] [113-113][206-206] [334-334][365-365]	0.443611
LPS	[102-104]	0.411199
ISP	[424-426]	0.380175
LNG	[289-291]	0.362654
FKQN	[301-304]	0.338295
FTKHGGR	[314-320]	0.332837
IR	[263-264]	0.332363
VPGCPET	[125-131]	0.331253
VQWT	[172-175]	0.307072
ITRGTGW	[366-372]	0.272365
IQG	[120-122]	0.272281
AGDPQGGQERRPKE	[208-223]	0.263879
I	[124-124] [183-183] [229-229][262-262] [271-271][300-300] [363-363][364-364]	0.223609
LQRQPQQPRGQQWQHDCD	[34-51]	0.220181
AEPTHR	[58-63]	0.219633
LD	[189-190] [198-199]	0.219102
YNDGD	[176-180]	0.210128
A	[2-2] [10-10] [57-57][89-89] [90-90][241-241] [348-348][435-435]	0.208643
LS	[337-338] [433-434] [465-466]	0.204782



«Continuación»

AGKN	[225-228]	0.19948
LQ	[55-56] [332-333] [335-336]	0.195333
LNGHK	[324-328]	0.194112
IEPKG	[95-99]	0.183238
LSNPNNQ	[191-197]	0.177035
IRGMPEE	[436-442]	0.17294
LK	[458-459]	0.170035
ARENGR	[376-381]	0.164041
VPQN	[396-399]	0.160442
YDMSRDE	[448-454]	0.152403
IN	[356-357]	0.152106
YKN	[345-347]	0.137944
FKTNDN	[416-421]	0.136596
AHS	[358-362]	0.134371
AD	[239-240] [311-312]	0.132683
VTQGRG	[114-119]	0.129051
IQ	[373-374]	0.123995
AQ	[29-30]	0.121797
VR	[91-92]	0.114691
AENDERGS	[254-261]	0.106991
YTN	[105-107]	0.102907
IQQ	[52-54]	0.0984426
YGREE	[460-464]	0.0967111
VERG	[339-342]	0.0837221
INT	[321-323]	0.0834654
FTTTNNN	[3-9]	0.0774203
VWESNSEQ	[75-82]	0.0702756
LE	[269-270]	0.063148
VQEGD	[159-163]	0.0577472
AEQEG	[406-410]	0.0540579

«Continuación»

VERD	[265-268]	0.0524483
IE	[73-74]	0.0501024
VQEGQ	[388-392]	0.0495262
AE	[66-67]	0.0476288
VS	[184-185] [414-415]	0.043932
LEQT	[292-295]	0.0430413
VKK	[403-405]	0.0379249
VDTET	[244-248]	0.0320144
V	[21-21] [70-72] [88-88][94-94] [123-123][156-156] [164-164][171-171] [224-224][313-313] [343-343][375-375] [383-383][395-395] [401-401] [402-402] [443-443]	0.0266109
VT	[111-112] [186-187]	0.0265049

**Tabla de resultados de la acción de la termolisina en 13S globulin seed storage protein 2-like (XP\_021752668.1)**

<b>Nombre de proteína</b>	<b>Results of enzyme action</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Bioactividad (Peptide Ranker)</b>
<b>13S globulin seed storage protein 2-like (XP_021752668.1)</b>	F	[5-5] [33-33] [148-148] [230-230] [231-231] [472-472]	0.999052
	FQC	[90-92]	0.939499
	FQ	[26-27]	0.916057
	FDDM	[456-459]	0.823216
	LGC	[133-135]	0.819419
	LP	[7-8] [190-191] [401-402]	0.79612
	FNPQGGR	[386-392]	0.777693
	IRGMP	[508-512]	0.749303
	LG	[24-25] [128-129]	0.717282
	L	[6-6] [9-9] [13-13] [14-14] [21-21] [107-107] [108-108][127-127] [211-211][232-232] [274-274][275-275] [312-312][416-416] [454-454][465-465] [488-488][499-499]	0.639092

«Continuación»

FE	[279-280]	0.589707
AGNPQGRGGDQSGRQHESRRHTRGGQEEMGQN	[233-265]	0.571294
LR	[407-408]	0.569984
MSR	[1-3]	0.554004
AGR	[500-504]	0.548993
AG	[76-77] [93-94]  [192-193]	0.546994
IMTPNWK	[421-427]	0.541972
LPH	[109-111]	0.539051
IPEWDQEEQRSERHHRGGGSESEEEERSERHHRGGRGRQSE SSRP HNG	[313-363]	0.534804
LEW	[483-485]	0.529483
FHKGH	[182-186]	0.509007
IG	[188-189]	0.501816
IRGRG	[122-126]	0.460183
LCS	[368-370]	0.446501
Y	[120-120]	0.443611
Y	[406-406]	0.443611
Y	[437-437]	0.443611
Y	[553-553]	0.443611
AR	[371-372]	0.394584
AMSSP	[494-498]	0.374855
FDKQ	[270-273]	0.368542
LSG	[267-269]	0.360064
FQNQ	[219-222]	0.353667
VSKW	[194-197]	0.341594
LPSGQSSPQHSR	[34-45]	0.339786
APS	[115-117]	0.333723
IR	[68-69]	0.332363
IR	[302-303]	0.332363
LGQSP	[28-32]	0.323376

«Continuación»

AGQDG	[478-482]	0.277619
FTKGSGR	[438-444]	0.258299
LN	[404-405]	0.257214
LNDCQ	[53-57]	0.248423
LRS	[227-229]	0.247624
VRR	[179-181]	0.23317
LEM	[309-311]	0.226755
I	[15-15] [208-208] [266-266][301-301] [403-403][435-435] [447-447][555-555]	0.223609
AQR	[527-529]	0.217037
A	[10-10] [52-52] [278-278][300-300] [420-420][487-487] [507-507][554-554]	0.208643
LKR	[475-477]	0.205619
LS	[61-62] [373-374] [409-410][537-538]	0.204782
IDNPER	[377-382]	0.199694
IQGENDDRG	[291-299]	0.194028
FSPSKRSERRGDE	[540-552]	0.18408
IEPKG	[102-106]	0.183238
YNN	[112-114]	0.179952
LK	[530-531]	0.170035
VPQN	[468-471]	0.160442
LSPTS	[16-20]	0.159613
YNDGEDR	[199-205]	0.156923
FSEESRRSER	[149-158]	0.152629

«Continuación»

IN	[428-429]	0.152106
YK	[520-521]	0.145232
LDDN	[223-226]	0.139559
YKN	[417-419]	0.137944
IRRE	[98-101]	0.135201
YGRQE	[532-536]	0.135177
IS	[118-119]	0.134493
IS	[505-506]	0.134493
A HS	[430-434]	0.134371
AD	[276-277]	0.132683
AD	[383-384]	0.132683
LSS	[130-132]	0.132184
I Q	[70-73]	0.123995
AQ	[22-23]	0.121797
YDTNN	[212-218]	0.116888
LT	[11-12]	0.114774
LT	[206-207]	0.114774
VMNS	[516-519]	0.11407
LQRGQQ	[46-51]	0.113314
YESGSPE	[139-147]	0.11267
ANEPS	[63-67]	0.103893
INQ	[58-60]	0.102573
VWDPKEQQE	[81-89]	0.10179
FEESRRSERGSEEMRDQHOK	[159-178]	0.096708
ISK	[286-290]	0.096339
ANHEGE	[448-453]	0.093757
ADT	[136-138]	0.091891
INSNK	[396-400]	0.091371
LTN	[393-395]	0.082957
LTNDN	[489-493]	0.071036
LSREE	[522-526]	0.055643

«Continuación»

IE	[513-514]	0.050102
VQEGQ	[460-464]	0.049526
AE	[74-75]	0.047628
VN	[375-376]	0.046620
VN	[414-415]	0.046620
IEQT	[364-367]	0.043778
AEK	[411-413]	0.042718
VESGE	[304-308]	0.040295
VQ	[445-446]	0.040089
VESDT	[281-285]	0.039308
ITE	[78-80]	0.038848
V	[4-4] [97-97]	0.026610
	[121-121][187-187]	
	[198-198][385-385]	
	[436-436][455-455]	
	[466-466][467-467]	
	[473-473][474-474]	
	[486-486][515-515]	
	[539-539][556-558]	
VT	[95-96] [209-210]	0.026504