

## Preparación de hidrolizados de lactoproteínas para su empleo en un suplemento alimentario para pacientes post-bariátricos

Padilla-Frausto, A.<sup>1</sup>, Espinosa-Andrews, H.<sup>2</sup>, Padilla-Frausto, J.J.<sup>1</sup>, Barrera-Rodríguez A.<sup>1</sup>, Del Toro-Sánchez C.L.<sup>3</sup>, Navarro-Villarruel, C.L.<sup>1</sup>, Sanchez-Patricia.<sup>4</sup>, Casillas J.E.<sup>1</sup>, y Robles-García, M.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, 47820, Ocotlán, Jalisco. México. Tel.: (392)9259400 Ext. 48340.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Subsede Zapopan, Camino Arenero, No. 1227, El Bajío, 45019, Zapopan, Jalisco. México. Tel.:(33)33455200 Ext. 1230.

<sup>3</sup>Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, 83000, Sonora, México. Tel.:(662) 2592208

<sup>4</sup>Unidad de cirugía bariátrica y metabólica. Hospital Dr. Juan I. Menchaca, Salvador de Quevedo y Zubieta No. 750 44348 Guadalajara, Jalisco, México. Tel.: (33) 3942 4400

Correo: [miguel.robles@academicos.udg.mx](mailto:miguel.robles@academicos.udg.mx)

**Palabras Clave:** Suplemento alimenticio, obesidad.

### Introducción

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial. La OMS reconoce a la obesidad como una epidemia global y un grave problema de salud pública [1]. La obesidad es el resultado de una acumulación excesiva de la cantidad de grasa corporal como resultado de un balance positivo en la ecuación energética entre ingestión y/o gasto energético. Debido a la magnitud del problema de prevalencia de obesidad, la Estrategia Nacional propuesta frente al sobrepeso y obesidad es: educación, prevención, tratamiento y rehabilitación [2].

El manejo bariátrico, en la actualidad es una de las alternativas más aceptadas para el tratamiento de la obesidad mórbida, ya que se presenta como única forma efectiva a largo plazo para la pérdida progresiva del peso corporal, control y resolución de las comorbilidades asociadas a esta condición. La cirugía bariátrica es enfocada en el tratamiento de la obesidad para los pacientes que tienen los siguientes criterios: i) índice de masa corporal arriba de 40 kg/m<sup>2</sup> o arriba de 35 kg/m<sup>2</sup> con alguna enfermedad relacionada a la obesidad como la diabetes o hipertensión; ii) obesidad al menos durante 5 años. Los dos tipos principales de cirugía bariátrica son los siguientes: i) Procedimientos restrictivos que incluyen: balón gástrico y gastroplastia con banda gástrica ajustable laparoscópica. ii) Procedimientos mixtos de absorción selectiva restrictiva: incluida manga gástrica y bypass gástrico en Y de Roux, que se considera el procedimiento del "estándar de oro". Los procedimientos restrictivos básicamente disminuyen el tamaño del reservorio gástrico, disminuyendo así la cantidad de alimentos que pueden ser ingeridos y a la vez induce a la saciedad temprana. En los procesos de malabsorción se alteran la anatomía, evitando segmentos del tracto gastrointestinal (duodeno y yeyuno), por lo tanto, disminuyendo la superficie secretora y absorbente necesaria para la utilización de nutrientes y el metabolismo. Debido a la modificación gástrica ocasionada por la cirugía se debe recibir suplementos multivitamínicos y minerales a diario. La literatura sugiere que los pacientes de cirugía bariátrica están en riesgo de deficiencia de los siguientes nutrientes después de cirugía: vitaminas B12, B1, C, A, D, K y folato, junto con los minerales hierro, selenio, zinc, y cobre [3]. De igual manera se ha demostrado que la cirugía bariátrica conlleva un mayor riesgo de desarrollar desnutrición proteica.

Quedando en claro que la suplementación de un alimento funcional de proteínas es necesario para el tratamiento postquirúrgico. Los alimentos funcionales son alimentos que tienen un efecto potencialmente positivo en la salud, más allá de la nutrición básica [4]. Los hidrolizados y péptidos de proteínas alimentarias se consideran una categoría de ingredientes alimentarios funcionales prometedores. Las proteínas hidrolizadas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos [5].

El objetivo del presente estudio tiene como finalidad diseñar un suplemento alimenticio rico en polipéptidos de caseína a partir de hidrólisis de las proteínas del suero lácteo enriquecido con vitaminas, para elaborar a futuro un suplemento alimenticio para pacientes post-bariátricos.

## Metodología

### Hidrólisis enzimática del suero de leche:

Se utilizó suero de leche comercial en polvo. La hidrólisis se llevó a cabo con pepsina y alcalasa de grado alimentario. Se estructuró un diseño experimental factorial  $2^3$  por duplicado (16 ejecuciones), para definir la mejor condición para alcanzar el mayor porcentaje de hidrólisis de las proteínas del suero de leche. Para ello, el suero de leche fue disuelto al 6 % (P/V) y se hidrolizó con pepsina porcina (PP) (Emprove®, Ohio, EUA) (-1) o alcalasa (Alk) (Sigma-Aldrich®, Massachusetts, EUA) (1). Se utilizó una relación enzima:sustrato de 1:50 (P/P)(-1) y 1:75 (P/P)(1) durante 6 horas a 37 °C, para la hidrólisis con pepsina porcina, o una relación de 1 (-1) o 4 % (1) durante 6 horas a 40 °C para la hidrólisis con alcalasa. Añadiendo la mitad de la proporción de la enzima al inicio de la reacción y el restante al cabo de 3 horas. El pH al que se probaron las enzimas fueron: 4.0 (-1) y 8.0 (1), ajustados con HCl 0.1 - 1 M o NaOH 1-5 M. La inactivación de las enzimas se llevó a cabo por incremento del pH hasta 7.0-7.2 con solución búffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck Millipore®, CDMX, México).

### Cuantificación del grado de hidrólisis enzimática del suero de leche, como variable de respuesta:

El grado de hidrólisis se determinó mediante el método de determinación de los grupos  $\alpha$ -amino libres, que consiste en generar una curva de calibración espectrofotométrica de serina (Abs vs. concentración de serina con el reactivo OPA), las diferentes muestras de hidrolizados de suero de leche se centrifugaron a 3,500 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes se diluyeron 1/100 en agua Milli-Q, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se diluyeron en 1.8 mL de reactivo OPA (Sigma-Aldrich®, CDMX, México) en celda de cuarzo, tras mezclar y esperar 2 min a 37 °C se midió la absorbancia a 340 nm. La Absorbancia se extrapolo con la curva de serina para calcular el número de enlaces peptídicos hidrolizados. Mediante la cuantificación de proteína total por el método Kjeldhal descrito por la AOAC (1995) [6] en el suero de la leche se calculó el número total de enlaces peptídicos. Así mismo, se calculó la variable de respuesta mediante la fórmula siguiente:

$$GH = \frac{n^\circ \text{ de enlaces peptidicos hidrolizados}}{n^\circ \text{ total de enlaces peptidicos}} * 100$$

Los resultados se evaluaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion V15.1.02 (Inc-Manugistics®).

### Visualización de los péptidos hidrolizados mediante SDS-PAGE:

Finalmente, para los tratamientos que produjeron un mayor grado de hidrólisis se siguió el método propuesto por Pardo y Natalucci (2002) [7] para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y con ello evidenciar la presencia de los fragmentos peptídicos hidrolizados. Así mismo, se realizó una precipitación ácida (pH= 4.5) para separar las proteínas grandes/completas (de peso molecular >10kDa), para incluirla en la SDS-PAGE.

## Resultados y discusión

El análisis comparativo de los resultados de la hidrólisis de los ocho tratamientos, se muestra en la Tabla 1, donde se observa que los factores pH y relación enzima:sustrato muestran diferencia estadística significativa, siendo los niveles altos de cada uno de estos (pH= 8 y una relación de 1:75 para PP y 4 % para Alk, respectivamente) los que muestran el mayor porcentaje de hidrólisis, independientemente de que enzima se empleó (ver Tabla 2).

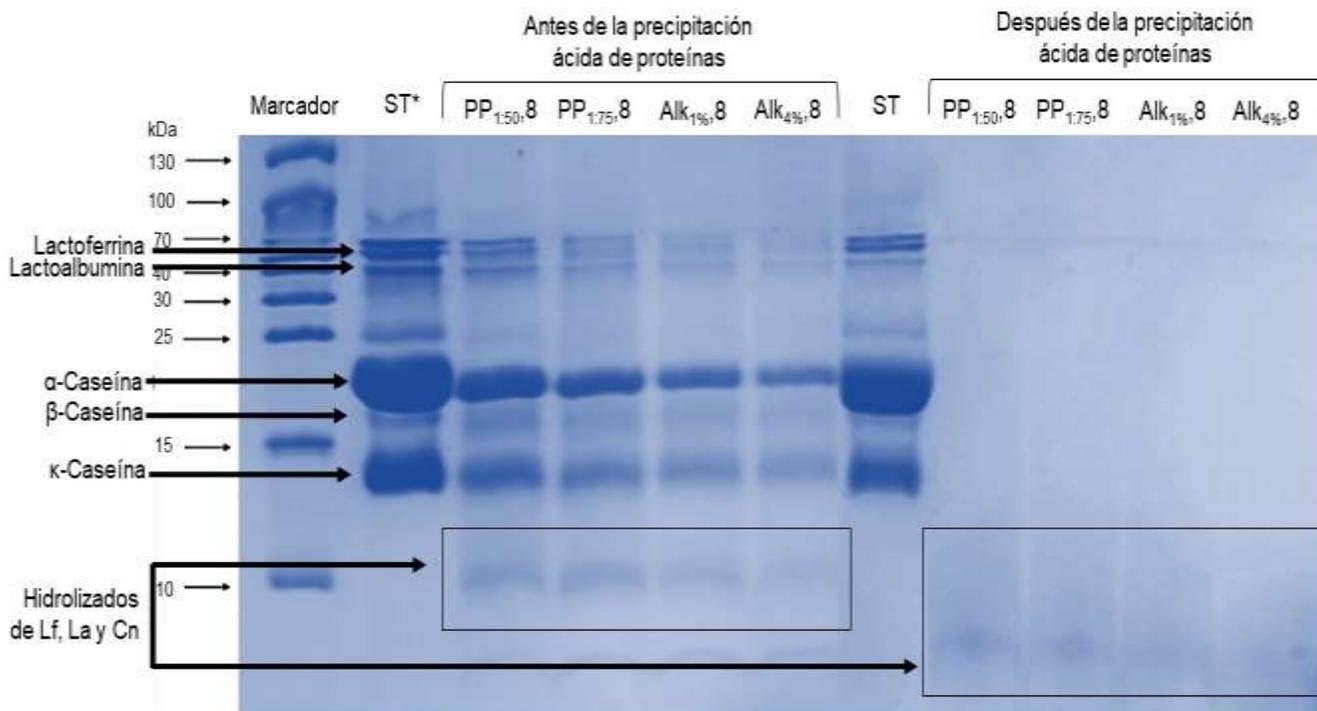
**Tabla 1.** Resultados del análisis de varianza  $2^3$  para el grado de hidrólisis según método de obtención

<i>Factor</i>	<i>Descripción</i>	<i>Valor-P</i>
X <sub>1</sub>	pH	0.0024
X <sub>2</sub>	Relación Enzima/Sustrato	0.0115
X <sub>3</sub>	Enzima	0.2203

**Tabla 2.** Grado de hidrólisis promedio para cada nivel y factor

<i>Factor</i>	<i>Descripción</i>	<i>Grado de hidrólisis (%)</i>
X <sub>1</sub>	<b>pH</b>	
	-1 (4.0)	14.68
	1 (8.0)	21.09
X <sub>2</sub>	<b>Relación Enzima/Sustrato</b>	
	-1 PP (1:50 p/p), Alk (1 %)	15.38
	1 PP (1:75 p/p), Alk (4 %)	20.39
X <sub>3</sub>	<b>Enzima</b>	
	-1 (PP)	16.80
	1 (Alk)	18.97

Por otro lado, en la Figura 1 se observan la imagen en negativo de la SDS-PAGE para la identificación de los componentes proteínicos del suero de leche y los péptidos hidrolizados de la lactoferrina, lactoalbumina y los diferentes morfotipos de la caseína.

**Figura 1.** Electroforesis de los hidrolizados del suero de leche

\*ST: Sin tratamiento, suero de leche al 6 % (p/v), Lf: Lactoferrina, La: Lactoalbúmina, Cn: Caseína

La Figura 1, muestra que en los carriles donde se corrió el control sin tratamiento (ST) no se observa la presencia de fragmentos péptidos en el espacio próximo a los 10 kDa, sin embargo, (en el recuadro de la izquierda) en los diferentes tratamientos para hidrólisis enzimática se observa la existencia de péptidos hidrolizados que presumiblemente son fragmentos de lactoferrina, lactoalbúmina y cualquiera de los morfotipos de caseína. En el recuadro de la derecha se puede apreciar que tras la precipitación ácida de las proteínas totales se pudieron recuperar péptidos de tamaño  $\leq 10$  kDa. Estos fragmentos son los primordiales para que se encuentren en abundancia en los suplementos alimenticios para pacientes post-cirugía bariátrica, debido a que por la falta del trayecto por el estómago por la modificación realizada en la cirugía

la hidrólisis previa de proteínas en el suplemento es esencial para su tratamiento.

### Conclusiones

Se logró identificar dos opciones de métodos de hidrólisis con los cuales obtenemos una cantidad significativa de péptidos hidrolizados los cuales podrían ser utilizados posteriormente en la formulación del suplemento alimenticio para pacientes post bariátricos, sin embargo aún es necesario realizar estudios complementarios como la determinación del rendimiento real, coeficiente de solubilidad y tamaño de partícula tras su pulverización mediante el secado por aspersión. Este estudio corresponde a la primera parte en la caracterización de insumos para la formulación del suplemento alimenticio antes mencionado.

### Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a la Maestrante Adriana Padilla Frausto. Agradecemos al Biol. Omar Hernández Tapia por su apoyo y asistencia técnica.

### Referencias:

1. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2020). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. (Consultado: 14/09/2020).
2. Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. 2018. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge.
3. Shankar, P., Boylan, M., & Sriram, K. 2010. Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. *Nutrition*, **26**(11-12), 1031-1037.
4. Lafarga, T., & Hayes, M. 2017. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. *Food Reviews International*, **33**(3), 217-246.
5. Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, **42**(2), 227-236.
6. AOAC, Association of Official Agricultural Chemists. 1995. Official Methods of Analysis of the AOAC. 15th ed. Washington, DC, USA.
7. Pardo, M. F., & Natalucci, C. L. 2002. Electrophoretic analysis (Tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **21**(1), 57-60.