

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE QUINUA  
(*Chenopodium quinoa*) CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIHIPERTENSIVA”**

Presentado por:

**MILUSKA ALEXANDRA CISNEROS YUPANQUI**

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

Lima-Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA”**

Presentado por:

**MILUSKA ALEXANDRA CISNEROS YUPANQUI**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

---

Mg. Sc. Gloria Jesús Pascual Chagman

**PRESIDENTE**

---

Dra. Patricia Glorio Paulet

**MIEMBRO**

---

Dra. Rosana Sonia Chirinos Gallardo

**MIEMBRO**

---

Dr. David Carlos Campos Gutiérrez

**ASESOR**

---

Dra. Ana Consuelo Aguilar Galvez

**CO-ASESOR (A)**

Lima-Perú

2017

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Sonia y Walter, por su incondicional apoyo, amor y paciencia durante mi etapa escolar, universitaria y profesional.

A mi hermano Joel y su peculiar estilo para darme ánimos en los momentos difíciles.

A mi UNALM por tantos años de aprendizaje continuo, contribuyendo en mi formación profesional y, por permitirme ser parte de esta gran familia molinera.

## **AGRADECIMIENTO**

- A mi asesor, el Dr. David Campos por brindarme la oportunidad de iniciar mi línea de carrera en investigación, formando parte de la familia IBT. Muchas gracias por el apoyo, dedicación y, sobre todo, paciencia, en el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo.
- A mi co-asesora, la Dra. Ana Aguilar por todo el apoyo brindado durante el proceso de redacción. Gracias por darse el tiempo para revisar al mínimo cada ítem del presente documento, y por los consejos brindados en aras de mejorar la presentación del mismo.
- A Adelaida Pardo por siempre estar dispuesta a ayudar en lo que concierne a la parte experimental. Gracias por todo tu apoyo y por no perder el buen humor y paciencia con los tesisistas.
- A mis amigos del IBT: Karina, Katty, Diego, Rocío y Martín, por hacer más amena la convivencia en el laboratorio.
- A mis incondicionales amigos de toda la vida, tanto del colegio como de la universidad, por su apoyo durante toda esta etapa. Gracias por siempre darme ánimos y las palabras de aliento necesarias para seguir por este camino.
- Al Instituto de Biotecnología, área de Biotecnología Industrial, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1.	QUINUA.....	3
2.1.1.	GENERALIDADES.....	3
2.1.2.	PROTEÍNA .....	4
2.2.	PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	7
2.2.1.	DEFINICIÓN .....	7
2.2.2.	PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	7
2.2.3.	APLICACIONES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	8
2.2.4.	PROPIEDADES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	8
2.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DE LOS PÉPTIDOS.....	19
2.3.1.	ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	19
2.3.2.	ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	20
2.4.	SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	21
2.4.1.	ULTRAFILTRACIÓN.....	21
2.4.2.	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	23
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	32
3.2.	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	32
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	32
3.3.1.	MATERIALES.....	32
3.3.2.	EQUIPOS .....	32
3.3.3.	REACTIVOS.....	33
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	34
3.4.1.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS .....	34
3.4.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL .....	35
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE .....	35
3.4.4.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS .....	36
3.4.5.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA .....	36

3.4.6.	DETERMINACIÓN DEL IC <sub>50</sub> .....	37
3.5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	38
3.5.1.	EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA QUINUA .....	38
3.5.2.	OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA QUINUA .....	40
3.5.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	41
3.5.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
4.1.	PREPARACIÓN DEL CONCENTRADO E HIDROLIZADO PROTEICO DE QUINUA.....	44
4.2.	PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS .....	48
4.2.1.	FRACCIONAMIENTO DEL HIDROLIZADO DE QUINUA POR ULTRAFILTRACIÓN.....	48
4.2.2.	CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN (CA).....	53
4.2.3.	CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL (CFSG) .....	58
4.3.	RELACIÓN ENTRE CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE.....	63
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Cuadro 1: Contenido de aminoácidos esenciales de diversos vegetales (mg aminoácido/g proteína) .....</b>	<b>5</b>
<b>Cuadro 2: Razón de eficiencia proteica (PER) y digestibilidad aparente de diversos granos.....</b>	<b>6</b>
<b>Cuadro 3: Aplicaciones de péptidos bioactivos en la industria.....</b>	<b>8</b>
<b>Cuadro 4: Efecto de la composición de aminoácidos en péptidos antioxidantes.....</b>	<b>13</b>
<b>Cuadro 5: Clasificación de los métodos cromatográficos en columna .....</b>	<b>25</b>
<b>Cuadro 6: Características del concentrado proteico de quinua (CPQ) y el hidrolizado de quinua (HQ) .....</b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 7: Distribución de péptidos del hidrolizado de quinua (HQ) en las fracciones obtenidas por ultrafiltración .....</b>	<b>49</b>
<b>Cuadro 8: Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones separadas por ultrafiltración .....</b>	<b>52</b>
<b>Cuadro 9: Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones separadas por cromatografía de adsorción .....</b>	<b>57</b>
<b>Cuadro 10: Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones separadas por cromatografía de filtración sobre gel, previa o no cromatografía de adsorción (CA).....</b>	<b>61</b>
<b>Cuadro 11: Resumen del proceso de purificación de péptidos bioactivos .....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Mecanismo de acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)..</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2: Flujo de operaciones para la extracción de proteínas de quinua.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3: Diseño experimental para la purificación de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas por ultrafiltración.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 5: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) de los permeados obtenidos por ultrafiltración con un <i>cut off</i> de 10 y 3 kDa .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 6: Separación de la F-III mediante cromatografía de adsorción. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 7: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidos por cromatografía de adsorción. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 8: Inhibición de la ACE de los picos obtenidos por cromatografía de adsorción.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 9: Separación mediante cromatografía de filtración sobre gel de la fracción P3kDa (A) y el pico PII-CA (B).....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 10: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración sobre gel (CFSG), previa o no cromatografía de adsorción (CA).....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 11: Inhibición de la ACE de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración sobre gel (CFSG), previa o no cromatografía de adsorción (CA).....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE LEUCINA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRADO DE HIDRÓLISIS .....	80
ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	80
ANEXO 3: CURVA ESTÁNDAR DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS.....	81
ANEXO 4: FICHA TÉCNICA DE LA RESINA DA-201C.....	82
ANEXO 5: FICHA TÉCNICA DE GEL BIOGEL P-2 .....	83
ANEXO 6: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS EN EL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA (CPQ) Y EL HIDROLIZADO DE QUINUA (HQ).....	84
ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ( $\mu$ MOL TE/G PROTEÍNA) ABTS PARA EL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA Y EL HIDROLIZADO DE QUINUA .....	85
ANEXO 8: CÁLCULO DE VALOR IC <sub>50</sub> DEL HIDROLIZADO DE QUINUA .....	86
ANEXO 9: DISTRIBUCIÓN DE PÉPTIDOS DEL HIDROLIZADO DE QUINUA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN .....	86
ANEXO 10: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LAS FRACCIONES SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN .....	87
ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR ULTRAFILTRACIÓN.....	88
ANEXO 12: INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE) Y VALOR IC <sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN .....	89
ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE) EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR ULTRAFILTRACIÓN .....	89
ANEXO 14: CÁLCULO DE VALOR IC <sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN.....	90
ANEXO 15: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	91

ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.....	92
ANEXO 17: INHIBICIÓN DE LA ACE Y VALOR IC <sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.....	93
ANEXO 18: CÁLCULO DEL VALOR IC <sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.....	94
ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE ACE EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	95
ANEXO 20: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	95
ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.....	97
ANEXO 22: INHIBICIÓN DE LA ACE Y VALOR IC <sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	98
ANEXO 23: CÁLCULO DE VALOR IC <sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	99
ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ACE EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN .....	102
ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS LUEGO DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN.....	103
ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ACE (%) LUEGO DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN.....	104
ANEXO 27: PRUEBA DE CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) Y LA INHIBICIÓN DE LA ACE .....	105

## RESUMEN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un grano andino conocido por su calidad proteica. En la presente investigación se realizó la purificación de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante y antihipertensiva, mediante ultrafiltración y cromatografía. Dichos péptidos fueron obtenidos a partir de un concentrado proteico de quinua, mediante hidrólisis con Neutrasa, por un período de 120 minutos. Se encontró que dicho hidrolizado presentó una capacidad antioxidante (CAO) de  $1,667.4 \pm 9.6$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína y un valor  $\text{IC}_{50}$  de  $300.7$   $\mu\text{g/mL}$  para inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ACE). El permeado obtenido de la ultrafiltración en una membrana, cuyo *cut off* fue de 3 kDa, permitió obtener una mayor CAO y antihipertensiva que el hidrolizado de quinua. Dicho permeado fue sometido a purificación mediante cromatografía. Se evaluó la cromatografía de adsorción en la resina DA-201 C y cromatografía de filtración sobre gel en Biogel P-2. Cuando se emplearon ambas técnicas (adsorción y filtración sobre gel, en ese orden), se encontró una mayor CAO y antihipertensiva que cuando solo se realizó cromatografía de filtración sobre gel. La CAO y antihipertensiva aumentaron en 2.3 y 7.7 veces, respectivamente, en relación con el hidrolizado inicial; alcanzándose el máximo valor de CAO de  $3,784.9 \pm 17.1$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína y una máxima inhibición de la ACE mediante un  $\text{IC}_{50}$  de  $39.1 \pm 0.01$   $\mu\text{g/mL}$ . También se halló una correlación de 82.1 por ciento entre la CAO y antihipertensiva, demostrando que ambas propiedades funcionales están relacionadas entre sí.

**Palabras clave:** quinua, péptidos antioxidantes, péptidos antihipertensivos, purificación, separación cromatográfica, ultrafiltración

## SUMMARY

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is a pseudo Andean cereal known for its protein quality. The aim of this work was to purify bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive capacity, through ultrafiltration and chromatography. These peptides were obtained from quinoa protein concentrate by Neutrase, for a period of 120 minutes. It was found an antioxidant capacity of  $1,667.4 \pm 9.6$   $\mu\text{mol TE/g protein}$  and  $300.7$   $\mu\text{g/mL}$  of  $\text{IC}_{50}$  value to inhibit the angiotensin converting enzyme (ACE) by quinoa peptides. The permeated obtained from a 3 kDa cut off, got higher both, antioxidant and antihypertensive capacity, than the quinoa hydrolyzate. So, the permeated obtained was further purified by chromatographic techniques. Adsorption and gel filtration chromatography were evaluated in DA-201 C resin and Biogel P-2, respectively. It was detected that when both (adsorption and gel filtration, in that order) separation techniques were used, a higher antioxidant and antihypertensive capacity were obtained, in comparison to only apply gel filtration chromatography. The antioxidant and antihypertensive capacity exhibited 2.27 and 7.69-fold higher than the hydrolyzate, respectively, and it was reached the highest antioxidant  $3,784.9 \pm 17.1$   $\mu\text{mol TE/g protein}$  value and the highest inhibition of ACE with a  $\text{IC}_{50}$  value of  $39.1 \pm 0.01$   $\mu\text{g/mL}$ . On the other hand, it was found 82.1 percent of correlation between antioxidant and antihypertensive capacity, showing that both functional properties are related to each other.

**Keywords:** quinoa, antioxidant peptides, antihypertensive peptides, purification, chromatographic separation, ultrafiltration

## I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cereal andino reconocido por muchos autores como el grano del siglo XXI. Las proteínas presentes en él tienen alto valor nutricional debido a su nivel elevado de lisina comparado con cereales como el arroz y trigo, además de su cómputo aminoacídico (Asao y Watanabe 2010).

En la actualidad hay una tendencia creciente e interés en el uso de péptidos derivados de proteína de alimentos como agentes de intervención contra las enfermedades humanas crónicas y para el mantenimiento del bienestar general. Estos péptidos pueden ser producidos por hidrólisis enzimática de proteínas de los alimentos para liberar la secuencia aminoacídica. Dicha secuencia podría presentar propiedades farmacológicas benéficas, más allá de su beneficio nutricional, tales como la capacidad antioxidante y antihipertensiva (Udenigwe y Aluko 2012).

Los radicales libres son moléculas que están en formación continua en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades. Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres. Así, el estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, y se identificó una cantidad apreciable que presenta dicha actividad. Los péptidos actúan impidiendo que los radicales libres se unan al oxígeno, debido a que reaccionan e interactúan más rápido con éstos que con el resto de las moléculas presentes en un determinado ambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Mulero *et al.* 2011).

Por otro lado, la hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados, donde ocasiona el 35 por ciento de mortalidad. Debido a esto, los

alimentos que presentan péptidos con actividad antihipertensiva son de gran interés, siendo la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) el mecanismo antihipertensivo más estudiado. La ACE cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido), el cual es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora (Mulero *et al.* 2011). Actualmente, se usan inhibidores sintéticos de la ACE (tales como captopril, enalapril y lisinopril); sin embargo, se ha reportado el uso de péptidos provenientes de fuentes alimenticias que cumplen la misma actividad, basándose tanto en la composición y secuencia de sus aminoácidos (Du *et al.* 2013).

Diversos autores reportan que la función más conocida y extendida hasta ahora de los péptidos bioactivos es la inhibición de la ACE. Además, dichos péptidos pueden contrarrestar la acción de los radicales libres, es decir, cumplen una función antioxidante (Vioque *et al.* 2000, Ruiz *et al.* 2011). Sin embargo, se menciona que tanto la actividad antioxidante como antihipertensiva de los péptidos no es apreciable sino hasta después de un proceso de purificación (Aluko y Monu 2003, Soares de Castro y Sato 2015). En este contexto, se reporta que las técnicas más comunes en la purificación de proteínas y péptidos bioactivos son la cromatografía y la ultrafiltración (separación por membrana) (Cui 2005). Es así que, en vista a lo anterior mencionado, este trabajo busca dar a conocer si se logra incrementar o no la capacidad tanto antioxidante como antihipertensiva de los péptidos bioactivos de quinua, luego de ser sometidos a un proceso de purificación, mediante ultrafiltración y cromatografía de baja presión (adsorción y filtración sobre gel). Esto ampliaría el conocimiento por parte de la población de los beneficios de la quinua como portador de péptidos bioactivos, contribuyendo así en la obtención de una mejor calidad de vida.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. QUINUA**

#### **2.1.1. GENERALIDADES**

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un pseudo cereal cultivado en los Andes Sudamericanos desde tiempos ancestrales, y se ha difundido especialmente en Bolivia, Perú y Ecuador, siendo estos países los principales productores a nivel mundial (Reyes 2006). El Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) dio a conocer que, durante el año 2013 el volumen exportado de quinua totalizó 18.3 mil toneladas, cifra superior en 71.0 por ciento respecto al año 2012 (INEI 2014). Por su parte, Bolivia, quien es el principal competidor pasó de exportar 79.8 mil toneladas el año 2012 a 153.26 toneladas el año 2013, mostrando un crecimiento de 92.1 por ciento (INE 2014).

En los últimos años, la quinua ha logrado un reconocimiento debido a su importancia alimenticia, por ejemplo, el 2013 fue declarado “Año Internacional de la Quinua” por las Naciones Unidas y su cotización reportó una elevación generando mayor contribución de divisas. Esto debido a que se está valorando su calidad nutricional. El valor exportado de quinua sumó US\$ 78.3 millones el año 2013, y representó un incremento de 150.8 por ciento respecto al año anterior y un crecimiento promedio anual de 65.6 por ciento en los últimos once años. Se sabe que Puno concentra el 79.5 por ciento de la producción de quinua a nivel nacional, seguido de Cusco, Junín y Ayacucho (Abugoch 2009, INEI 2014).

La quinua tiene la siguiente clasificación taxonómica (Gandarillas 1979):

Reino : Vegetal  
División : *Angiospermophyla*  
Clase : *Dicotyledonea*  
Sub clase : *Archichlamydeae*  
Orden : *Centrospermales*  
Familia : *Chenopodaceae*  
Género : *Chenopodium*  
Especie : *Chenopodium quinoa* Willd.

### 2.1.2. PROTEÍNA

Desde hace varios años se ha fortalecido el interés en investigar a los granos andinos, entre ellos la quinua, por su alto valor nutricional relacionado particularmente con el contenido y calidad de sus proteínas (por la presencia de aminoácidos esenciales). El contenido proteico de la quinua varía en un rango de 12 a 18 por ciento (depende del cultivo), siendo comparable o en algunos casos, mayor que los cereales (7.5 por ciento en arroz, 13.4 por ciento en maíz y 15.4 por ciento en trigo) y algunas legumbres. Se han reportado entre 16 y 18 aminoácidos en la quinua, entre ellos: glutamato (E), arginina (R), cisteína (C), isoleucina (I), leucina (L), lisina (K), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y), metionina (M) y valina (V), siendo el E aquel que se presenta en mayor concentración (Abugoch 2009, Escuredo *et al.* 2014, Repo-Carrasco 1992).

El Cuadro 1 muestra la composición aminoacídica de diversos cereales y leguminosas en comparación con la quinua, además, se muestran los requerimientos de la *Food and Agriculture Organization* (FAO) para los aminoácidos esenciales. Se observa el mejor perfil de aminoácidos en la quinua cocida, debido a que no presenta aminoácidos limitantes y, en la mayoría casos, la cantidad de éstos supera a lo recomendado por la FAO. En tanto, la semilla y grano de quinua son limitantes en L en niños entre uno a dos años. Los granos andinos presentan una composición más rica en K y aminoácidos azufrados, que algunos cereales (arroz, cebada y trigo) y leguminosas (soya) para el consumo humano (Gross *et al.* 1989, Repo-Carrasco 1992; Abugoch 2009, Hager *et al.* 2012).

**Cuadro 1: Contenido de aminoácidos esenciales de diversos vegetales (mg aminoácido/g proteína)**

Amino-ácidos	Símbolo	Repo-Carrasco (1992)		Gross <i>et al.</i> (1989)	Abugoch (2009)				Requerimientos FAO/WHO/UNU (2007)			
		Arroz	Grano de quinua	Quinua cocida	Semilla de quinua	Cebada perlada	Soya cruda	Trigo duro	1-2 años	3-10 años	11-18 años	Adultos
Histidina	H	22	27	N.D	28.8	22.5	26.7	23.5	18	16	16	15
Isoleucina	I	35	34	41	35.7	36.5	44.5	43.2	37	30	30	30
Leucina	L	75	61	76	59.5	98.2	72	82.8	63	61	60	59
Lisina	K	32	56	67	54.2	37.2	57.8	36.2	52	48	48	45
Metionina+ Cisteína	M+C	61	48	41	36.2	41.3	22.7	44	25	23	23	22
Fenilalanina+ Tirosina	F+Y	74	62	76	60.9	84.8	85.4	86.9	46	41	41	38
Treonina	T	32	34	45	29.8	34	38.6	35.8	27	25	25	23
Triptófano	W	11	11	10	11.8	16.6	12.2	11.5	7	6.6	6.5	6
Valina	V	51	42	53	42.1	49	47.6	61.1	44	40	40	39

N.D: No determinado

Las proteínas de almacenamiento de la quinua pueden ser clasificadas como albúminas y globulinas. Así, contiene albúmina 2S, la cual representa el 35 por ciento del total de la proteína y cuyo peso molecular es 9 kDa. Esta fracción es rica en C, pero no en M, y también presenta R e H. En la proteína de quinua también se observa una globulina llamada Chenopodina 11S, que representa el 37 por ciento de la proteína total y está formada por polipéptidos de peso molecular entre 22-33 kDa y 32-39 kDa. Esta Chenopodina se caracteriza por su bajo contenido de M y C con relación a las otras proteínas de la quinua. Las dos fracciones proteicas mencionadas difieren en su solubilidad a pH 5, debido a que la mayor parte de proteína 11S precipita a este pH, mientras que la 2S permanece soluble (Abugoch *et al.* 2009, Brinegar y Goundan 1993).

La calidad de proteínas es un factor determinante para saber su valor nutricional. Sin embargo, esta característica no se determina solo con el perfil de aminoácidos, sino que también toma en cuenta la digestibilidad y la influencia de factores antinutricionales (saponina, en el caso de la quinua). El Cuadro 2 muestra la razón de eficiencia proteica (PER) y digestibilidad aparente de diversos granos andinos y de la caseína, reportados en ratas. Se observa que el PER de los granos de quinua es igual al de la caseína. Este valor aumenta en 30 por ciento cuando el grano está cocido. También presenta una elevada digestibilidad, la cual se puede incrementar si se elimina la saponina presente (Gross *et al.* 1989, Abugoch 2009).

**Cuadro 2: Razón de eficiencia proteica (PER) y digestibilidad aparente de diversos granos**

<b>Granos</b>	<b>PER</b>	<b>Digestibilidad aparente (%)</b>
Quinua <sup>a</sup>	3.09 ± 0.09	84.1 ± 2.25
Kiwicha <sup>b</sup>	2.59 ± 0.13	72.6 ± 3.80
Tarwi <sup>a</sup>	1.53 ± 0.18	80.4 ± 2.35
Caseína	3.10 ± 0.09	87.5 ± 1.60

<sup>a</sup> Hervido, lixiviado y seco

<sup>b</sup> Lixiviado y seco

FUENTE: Tomado de Gross *et al.* 1989

## **2.2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

### **2.2.1. DEFINICIÓN**

Tradicionalmente, las proteínas de la dieta han sido relacionadas como una fuente de energía y de aminoácidos esenciales, los cuales son necesarios para el crecimiento y mantenimiento de las funciones fisiológicas. Sin embargo, recientemente se está inclinando el interés hacia la identificación y caracterización de péptidos bioactivos provenientes de fuentes alimenticias vegetales y animales (Sarmadi e Ismail 2010).

Los péptidos bioactivos son regiones de proteínas (entre 2-20 aminoácidos y una masa molecular menor a 6000 Da), cuya secuencia de aminoácidos tienen, además de su valor nutricional, una actividad biológica. Dicha actividad no se presenta dentro de la proteína intacta, sino al ser liberados, ya sea por el proceso de digestión o mediante hidrólisis enzimática de la proteína de origen (Vioque *et al.* 2000, Català-Clariana *et al.* 2010, Soares de Castro y Sato 2015, Mine *et al.* 2010). Su ingesta, posterior absorción y paso al tracto sanguíneo tienen influencia sobre el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, dependiendo de la secuencia de aminoácidos involucrada (Erdmann *et al.* 2008, Korhonen y Pihlanto 2006).

Sarmadi e Ismail (2010) indican que los péptidos con una cadena entre dos y seis aminoácidos son digeridos y, por tanto, absorbidos más rápido que las proteínas y los aminoácidos libres. En tanto, a medida que se va incrementando el número de aminoácidos en los péptidos, disminuye su capacidad de atravesar el lumen intestinal.

### **2.2.2. PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Los péptidos bioactivos pueden encontrarse en los alimentos sin la necesidad de una hidrólisis previa, tal es el caso de aquellos encontrados en la leche (glutación y colistrina, la cual es una mezcla de péptidos hallada en la leche materna). También se presentan en tejidos musculares de algunos animales, por ejemplo la carnosina ( $\beta$ -Alanina (A)-H), anserina y ophidine (García *et al.* 2013, Samaranayaka y Li-Chan 2011, Aranceta y Gil 2010).

Asimismo, pueden ser liberados por hidrólisis controlada con enzimas comerciales (Neutrasa, Alcalasa y Flavourzyme), hidrólisis mediante enzimas gastrointestinales (pepsina, tripsina, quimiotripsina) y fermentación de proteínas por microorganismos. En este último método se pueden hallar moléculas que ejercen funciones biológicas adicionales a la de los péptidos bioactivos liberados durante la fermentación; tal es el caso de las bacteriocinas, células bacterianas vivas o muertas y exopolisacáridos. Como consecuencia del interés por la obtención de péptidos bioactivos provenientes de alimentos, se está generando su síntesis en alimentos transgénicos, expresando genes que los producen en altos niveles. Además, la modificación química por sustitución de aminoácidos o la introducción de fragmentos bioactivos en una secuencia de éstos, son una alternativa para aumentar la producción de péptidos bioactivos (Agyei *et al.* 2016, Mora *et al.* 2016, García *et al.* 2013).

### **2.2.3. APLICACIONES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Los péptidos bioactivos presentan numerosas aplicaciones potenciales en diversas industrias, tal como se muestra en el Cuadro 3.

La industria alimentaria es un sector importante donde *starters* proteolíticos y/o enzimas gastrointestinales son usados para hidrolizar proteínas y dar lugar a los péptidos bioactivos. Asimismo, estos péptidos pueden ser usados en la fortificación de productos, comercializándose así como alimentos funcionales o nutracéuticos. También, en la industria cosmética son usados para promover la salud de la piel, es decir con fines dermatológicos (Agyei *et al.* 2016).

### **2.2.4. PROPIEDADES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Los péptidos bioactivos pueden ser antioxidantes, antihipertensivos, hipocolesterolémicos, antitrombóticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, inmunomoduladores. Además, se pueden unir a ciertos minerales (Soares de Castro y Sato 2015). Esto dependerá de la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) y secundaria que presenten. Por ejemplo, los aminoácidos P y V juegan un rol importante en la mayoría de péptidos antihipertensivos, en tanto los grupos sulfhidrilo hidrofóbicos y el aminoácido H imparten

**Cuadro 3: Aplicaciones de péptidos bioactivos en la industria**

<b>Industria</b>	<b>Propiedad funcional o bioactiva</b>	<b>Posible área de aplicación</b>
Alimentaria	Antimicrobiano	Preservantes naturales para mantener la calidad e inocuidad de alimentos
	Antioxidante	
	Emulsificante	Emulsificantes de fuente alimenticia
	Antihipertensivo	Promoción de alimentos basados en <i>claims</i> para la salud
	Inmunomoduladorio	
Alimentos funcionales y nutracéuticos	Antihipertensivo	Fortificación de alimentos y medicinas
	Inmunomoduladorio	Inmunonutrición
Farmacéutica y salud	Antitrombótico, opioide	Producción de productos basados en péptidos terapéuticos
	Antihipertensivo	
	Ansiolítico	Productos para el tratamiento de ansiedad
	Antimicrobiano	Conservante natural de productos cosméticos
	Antidiabético	Mejora de transporte de glucosa
Cosmética	Antimicrobiano	Preservante natural en productos cosméticos
	Emulsificante	Ingrediente en productos cosméticos

FUENTE: Tomado de Agyei *et al.* 2016

propiedades antioxidantes (Agyei *et al.* 2016). Algunos péptidos bioactivos, clasificados como multifuncionales, son capaces de cumplir más de una actividad fisiológica bajo dos condiciones: si tienen una única estructura primaria capaz de resistir la digestión y/o si están formados por una o más secuencias traslapadas, desencadenando cada una en diferentes respuestas biológicas (Agyei *et al.* 2016, Giri y Ohshima 2012). Se cuenta con pocos estudios que evidencian el potencial de la quinua como portador de péptidos bioactivos. A la fecha, los péptidos bioactivos de este cereal andino han sido estudiados por su capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y por sus propiedades antioxidantes (Nongonierma *et al.* 2015).

## a. PÉPTIDOS BIOACTIVOS ANTIOXIDANTES

Una de las consecuencias inevitables de la respiración en organismos aeróbicos es la creación de radicales libres, tales como el superóxido ( $O_2^-$ ) y el hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Estos radicales son muy inestables y reaccionan rápidamente con otros grupos de sustancias en el organismo, causando así, daño celular y tisular. Asimismo, también pueden dañar proteínas, causar mutaciones en el ADN, oxidar la membrana fosfolipídica y modificar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Sarmadi e Ismail 2010, Soares de Castro y Sato 2015).

Sin embargo, hasta cierta medida los radicales libres son favorables, debido a que ejercen funciones de señalización y defensa ante las infecciones. El cuerpo humano está diseñado para contrarrestar las consecuencias de la formación de éstos mediante mecanismos de defensa (acción de las enzimas endógenas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa). No obstante, cuando la producción de radicales libres supera su inhibición o ésta se da de manera inadecuada, los mecanismos de defensa no se dan abasto, generando lo que se conoce como estrés oxidativo. Esta condición es la que promueve la aparición de enfermedades crónicas. El estrés oxidativo puede contribuir a la diabetes tipo II, debido a que la generación incontrolada de radicales libres favorece el aumento de la resistencia a la insulina o daño en la secreción de la misma. Asimismo, el estrés oxidativo tiene una función importante en la iniciación o progreso de complicaciones cardiovasculares (ateroesclerosis y alteraciones en el metabolismo de lípidos) en pacientes con síndrome metabólico, además de ser uno de los mayores causantes del desarrollo de cáncer. Dada la estrecha relación entre el estrés oxidativo y la incidencia de enfermedad, el control del primero parece ser uno de los pasos cruciales para controlar el progreso de estas enfermedades o prevenir sus complicaciones (Escudero 2012, Sarmadi e Ismail 2010).

Así, los antioxidantes provenientes de la dieta son importantes debido a que captan dichos radicales libres o inhiben/activan ciertas enzimas pro/antioxidativas, respectivamente. La ingesta de éstos se relaciona con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y de ciertos tipos de cáncer. En este sentido, un extenso número de antioxidantes han sido aislados e identificados de fuentes naturales con el objeto de estudiar su efecto *in vivo*. Entre ellos se tienen a la vitamina C y E, polifenoles, flavonoides, carotenoides y selenio (además de antioxidante es cofactor de la enzima glutatión peroxidasa). Por su parte, los

péptidos con propiedades antioxidantes también han sido el foco de investigaciones recientes; por ejemplo, se ha investigado la obtención de péptidos bioactivos antioxidantes de fuentes como pescado, soya, leguminosas, cereales, etc. Una de las características de los antioxidantes derivados de péptidos es que además de ser capaces de estabilizar radicales libres, pueden presentar otras propiedades bioactivas tales como actividad antihipertensiva, inmunomodulatoria, opioide, etc. (Escudero 2012, Mine *et al.* 2010, Mora *et al.* 2016, Sarmadi e Ismail 2010).

Por otro lado, los compuestos antioxidantes derivados de alimentos son de gran interés también por su relación con las propiedades organolépticas alimenticias, debido a que la oxidación lipídica mediada por radicales libres genera sabores rancios, decoloración y compuestos tóxicos indeseables, disminuyendo la calidad y el tiempo de vida útil. Ante esto, la adición de antioxidantes sintéticos en el procesamiento de alimentos es una práctica común para evitar los problemas mencionados; sin embargo, su uso es limitado debido a la carcinogenicidad y los peligros para la salud que podrían ocasionar (García *et al.* 2013, Halim *et al.* 2016).

Los péptidos bioactivos antioxidantes contienen entre 5 y 16 residuos de aminoácidos y son considerados compuestos seguros y saludables de bajo costo, elevada actividad y fácil absorción (hasta 5-6 residuos de aminoácidos). Presentan ventajas en comparación con los antioxidantes sintéticos, debido a que tienen una estructura más simple, mayor estabilidad en diferentes situaciones y no dan reacciones inmunes peligrosas ni presentan tantos efectos secundarios como éstos. Además, presentan propiedades funcionales y nutricionales en adición a su capacidad antioxidante (Escudero 2012, Sarmadi e Ismail 2010).

El mecanismo de acción de los antioxidantes provenientes de péptidos bioactivos no está entendido por completo; sin embargo, éstos son capaces de inhibir la peroxidación de lípidos, atrapar radicales libres, quelar iones metálicos, donar protones y eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Las propiedades antioxidantes de los péptidos bioactivos se deben a su composición y secuencia de aminoácidos, peso molecular, especificidad de la proteasa involucrada en la hidrólisis, concentración del péptido y al grado de hidrólisis. Esto último dependerá de la naturaleza de la proteína precursora y del peso molecular de los péptidos originados (Ajibola *et al.* 2013, Udenigwe

y Aluko 2012). La actividad antioxidante de péptidos de peso molecular entre 500-1500 Da es más elevada que la de péptidos por encima de 1500 Da (Li *et al.* 2008, citados por Escudero 2012). Mine *et al.* (2010) reportan que los péptidos con peso molecular menor a 5 kDa ricos en H y residuos de aminoácidos hidrofóbicos, presentan una elevada capacidad antioxidante. La presencia de Y, W, M, C y P también influye en ésta. Cabe mencionar que la hidrofobicidad en péptidos antioxidantes se propicia mediante su obtención por hidrólisis enzimática, debido a que se despliegan las cadenas peptídicas. El Cuadro 4 muestra el efecto de la composición de aminoácidos y su correcta posición en la cadena peptídica para presentar capacidad antioxidante.

Se reporta que los aminoácidos hidrofóbicos son importantes para la mejora de las propiedades antioxidantes, debido a que incrementan la accesibilidad de los péptidos hacia dianas celulares de naturaleza hidrofóbica. Su presencia en el extremo N-terminal contribuye a que se inhiba la peroxidación lipídica porque se incrementa la solubilidad del péptido en lípidos, facilitando de este modo la interacción de éstos con las especies radicales. Se dice que la hidrofobicidad de un aminoácido en el extremo N-terminal juega un papel más importante en la capacidad antioxidante que el mismo aminoácido en la posición central de la cadena. Por otro lado, también se toma en cuenta la presencia del aminoácido adyacente al extremo C-terminal por su capacidad para formar enlaces de hidrógeno (para poder formar este enlace, el aminoácido tiene que presentar baja hidrofobicidad) y la presencia de un residuo de aminoácido donador de electrones (generalmente aromáticos) en el mismo extremo C-terminal. Estos últimos presentan capacidad antioxidante al estabilizar las ROS transfiriéndoles electrones (Li *et al.* 2011, mencionados por Giri y Ohshima 2012, Soares de Castro y Sato 2015).

El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años. La adición de los aminoácidos hidrofóbicos P y L al extremo N-terminal del dipéptido HH mejora las propiedades antioxidantes de los péptidos. Por su parte, la presencia de aminoácidos Y, W, M, K y C representa un importante factor en la actividad antioxidante de los péptidos, especialmente por su capacidad de reducir al  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y por quelar iones de  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  (Mine *et al.* 2010, Soares de Castro y Sato 2015). Asimismo, la presencia y cantidad de H, P y aminoácidos aromáticos ha sido reportada como contribuyente de actividad antioxidante en los péptidos alimenticios. La actividad antioxidante de los péptidos de quinua ha sido atribuida a péptidos cortos (menor a 11 ami-

**Cuadro 4: Efecto de la composición de aminoácidos en péptidos antioxidantes**

Amino-ácidos	Mecanismo de acción	Ejemplos
Aromáticos	Convierten a los radicales en moléculas estables donando electrones y manteniendo su propia estabilidad a través de la estructura de resonancia. Mejoran la propiedad de captar radicales de los residuos de aminoácidos	H en extremo N-terminal que la iones metálicos
		H en extremo C-terminal atrapa radicales
		Tripéptidos con W o Y en extremo C-terminal presentan gran poder para atrapar radicales (pero no peroxinitritos)
Hidrofóbicos	Aumentan la solubilidad del péptido en lípidos, facilitando su accesibilidad a especies radicales hidrofóbicas y ácidos grasos poliinsaturados hidrofóbicos (PUFA's). La glicina (G) actúa como donador de hidrógeno	V o L en extremo N-terminal y P, H e Y en la secuencia
		Alta reactividad de grupos alifáticos en A, V y L en los PUFAs hidrofóbicos
		A o L al final de la cadena, Glutamina (Q) y un residuo de P en la secuencia de péptidos del gluten
Básicos y ácidos	Presentan grupos carboxil y amino en cadenas laterales que donan hidrógeno y quelan iones metálicos	Residuos de Aspartato (D) e H en péptido purificado de salsa fermentada de mejillón
Cisteína	El grupo SH capta radicales, protegiendo el tejido de estrés oxidativo y mejorando la actividad del glutatión	Tripéptidos con C actúan radicales peroxinitrito
		Proteínas de hojas de curri con grupos SH junto con otros grupos funcionales involucrados en la capacidad antioxidante

FUENTE: Tomado de Escudero 2012

noácidos) que contienen residuos hidrófobos como P, H, Y e W o residuos sulfurados (C y M) (Nongonierma *et al.* 2015). Por su parte, Giri y Ohshima (2012) mencionan que los aminoácidos W, Y e M presentan la capacidad antioxidante más alta, seguidos de C, H y F, no encontrándose dicha capacidad en el resto de aminoácidos no nombrados.

## **b. PÉPTIDOS BIOACTIVOS ANTIHIPERTENSIVOS**

La hipertensión se define como un aumento persistente de la presión arterial (fuerza ejercida por unidad de área sobre las paredes de las arterias), y para ser considerada como tal, la presión arterial sistólica (PAS), o presión de la sangre durante la fase de contracción del ciclo cardíaco, tiene que ser de 140 mm Hg o superior; y la presión arterial diastólica (PAD), o presión durante la fase de relajación del ciclo cardíaco, tiene que ser de 90 mm Hg o superior. La lectura se expresa como 140/90 mm Hg. El individuo normotenso tiene una PAS inferior a 120 y una PAD inferior a 80 mm Hg, lo que se expresa como 120/80 mm Hg (Couch y Krummel 2008).

Actualmente, la hipertensión arterial afecta aproximadamente a un 25 por ciento de la población adulta en el mundo y se predice que alcanzará al 29 por ciento para el año 2025. A pesar de ser una enfermedad controlable, la hipertensión se asocia con enfermedades, tales como la aterosclerosis, infarto al miocardio y accidentes cerebro vasculares (ACV) (Soares de Castro y Sato 2015). Asimismo, la hipertensión no tratada conduce a enfermedades degenerativas como insuficiencia cardíaca, enfermedad renal en fase terminal y enfermedad vascular periférica. Se le conoce como el asesino silente, debido a que las personas que la padecen pueden permanecer asintomáticas durante años y después sufrir un ataque cardíaco mortal (Couch y Krummel 2008).

La influencia de los factores dietéticos sobre los niveles de presión arterial ha sido reconocida desde hace muchos años. Existe una clara relación entre el consumo de sal, ingesta de alcohol excesiva y sobrepeso con la presión arterial. Por ejemplo, en sociedades donde se añade sal a los alimentos, las presiones son mayores que en las que no lo hacen (a cualquier edad que se considere). Asimismo, se ha observado una relación inversa entre la ingesta de calcio y potasio con los niveles de presión arterial. Se reporta que dos poblaciones con similar ingesta de sodio presentaron diferencias en la presión arterial, siendo menor en aquella donde adicionalmente se consumía una mayor cantidad de potasio

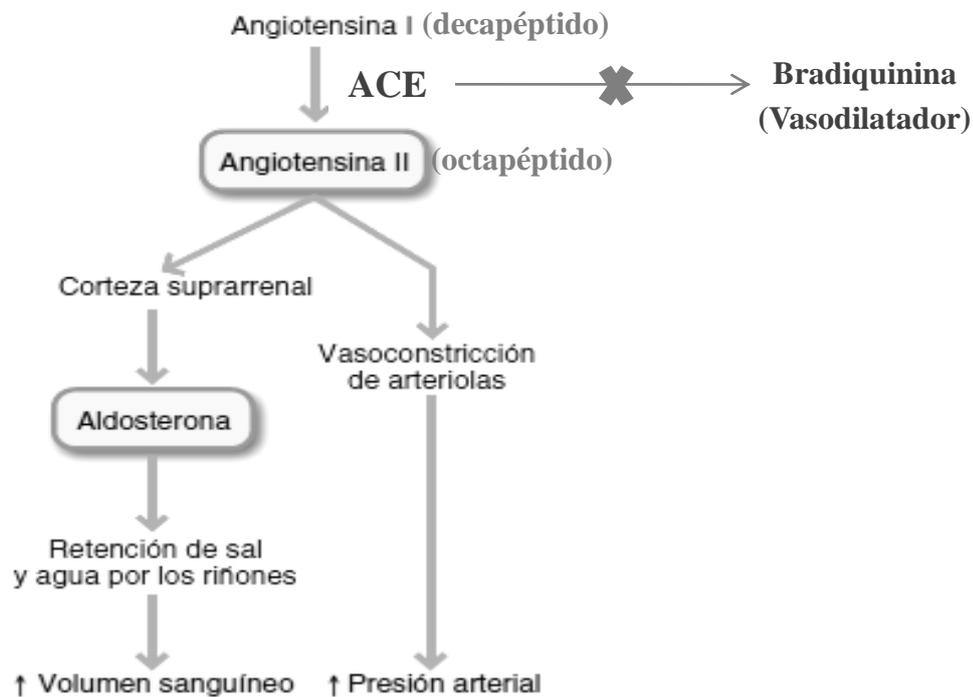
(Hernández y Sastre 1999). En relación al sobrepeso, el mismo autor señala que la reducción de éste es la principal medida no farmacológica en el tratamiento del paciente hipertenso.

Los fármacos antihipertensivos actúan a través de mecanismos de acción muy variados, lo que les otorga un perfil de efectos adversos y utilidad terapéutica a cada uno de ellos. En muchas ocasiones se usan de forma combinada, con la finalidad de minimizar las reacciones adversas que puedan aparecer. El tratamiento farmacológico para la hipertensión incluye diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes, inhibidores de la ACE, antagonistas del calcio y bloqueantes de los receptores  $\alpha$ . La decisión de iniciar tratamiento farmacológico va a depender siempre de la respuesta a las modificaciones dietéticas (disminución de consumo de sal, aumento del consumo de frutas y verduras) y a los cambios en el estilo de vida (aumento de actividad física), así como de los valores de presión arterial y de la presencia de otras enfermedades (Couch y Krummel 2008, Mestres y Duran 2012).

Los inhibidores de la ACE constituyen una de las primeras opciones para el tratamiento de la hipertensión, debido a su buena tolerabilidad y eficacia, especialmente si existe insuficiencia cardíaca u otros trastornos cardiovasculares. Al inhibir la ACE, se impide la síntesis de angiotensina-II y, por tanto, su acción hipertensiva directa y la secreción de aldosterona. Los fármacos más representativos son enalapril, lisonopril y captopril ((S)-1-(3-mercapto-2-metil-1-oxopropil)-L-prolina), siendo este último el más empleado en el control de la hipertensión. Sin embargo, estos inhibidores sintéticos pueden causar efectos adversos como alergias y angioedemas. Su efecto adverso más relevante es la tos, la cual suele ser muy molesta y resistente al tratamiento farmacológico habitual (Erdmann *et al.* 2008, Halim *et al.* 2016, Mestres y Duran 2012, Mulero *et al.* 2011, Soares de Castro y Sato 2015).

La ACE (EC 3.4.15.1) es una Zn-metalopeptidasa y pertenece al grupo de proteasas de Zn, necesitando de este metal y cloruro para poder realizar su actividad. Además, actúa como una exopeptidasa que escinde dipéptidos a partir del extremo C-terminal del decapeptido angiotensina-I (DRVYIHPFHL) para producir el potente octapéptido vasoconstrictor angiotensina-II (DRVYIHPF). Además, esta enzima inactiva la bradiquinina (un vasodilatador) originando un incremento de la presión arterial y volumen

sanguíneo (por la secreción de aldosterona) (Couch y Krummel 2008, Korhonen y Pihlanto 2006). La Figura 1 muestra el mecanismo de acción de la esta enzima.



**Figura 1: Mecanismo de acción de la ACE**

FUENTE: Adaptado de Couch y Krummel 2008

La ACE se encuentra localizada en múltiples zonas del organismo como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino y, en el ser humano, se aprecian dos isoformas. La primera ha sido denominada ACE somática (sACE), la cual presenta un peso molecular entre 150-180 kDa, con una secuencia de aproximadamente 1277 aminoácidos y se localiza en las zonas antes descritas. La otra isoforma, denominada ACE germinativa o testicular (tACE), es una enzima más pequeña con un peso entre 90-100 kDa y solamente se localiza en células germinativas en el testículo. Su acción está relacionada con la maduración del esperma en varones. El sitio catalítico de la sACE consiste en tres sub sitios, los cuales tienen afinidad con los tres aminoácidos hidrofóbicos de la angiotensina-I, contados desde el extremo C-terminal (Domínguez 2009, Korhonen y Pihlanto 2006, Zhang *et al.* 2009).

Se reporta que la función más conocida y extendida de los péptidos bioactivos aislados encontrados en vegetales es la inhibición de la ACE. Los péptidos bioactivos representan

un menor costo para el cuidado de la salud, debido a que no presentan los efectos adversos de los inhibidores sintéticos, presentan mayor afinidad por el tejido y están sujetos a una eliminación más lenta que los inhibidores sintéticos, es decir, permanecen durante más tiempo en el organismo. Estas dos últimas características, junto con una posible modificación del péptido en el intestino, parecen ser las razones por las cuales ciertos péptidos muestran poca actividad inhibidora *in vitro*, pero un significativo descenso de la presión sanguínea sistólica *in vivo*. Cabe recordar que los péptidos bioactivos deben ser absorbidos fácilmente por el intestino y además ser resistentes a la degradación por parte de peptidasas plasmáticas para alcanzar los sitios diana y ejercer su efecto antihipertensivo (Du *et al.* 2013, García *et al.* 2013, Korhonen y Pihlanto 2006, Vermeirssen *et al.* 2004).

La funcionalidad *in vitro* de los péptidos bioactivos no siempre implica un efecto *in vivo*, por ejemplo, una alteración antes de alcanzar la diana de la enzima en el sistema circulatorio puede ocasionar que el péptido demuestre pobre actividad antihipertensiva *in vivo*, a pesar de presentarla *in vitro* (Escudero 2012, Vermeirssen *et al.* 2004). Se reporta que los péptidos sometidos a purificación inhiben mejor la ACE luego de una digestión gastrointestinal. Adicionalmente, estos péptidos inhibidores de la ACE podrían tener influencia en la disminución de la presión arterial al liberar sustancias vasodilatadoras como prostaglandina, óxido nítrico (NO) o monóxido de carbono (CO). Sin embargo, algunos de los péptidos que han sido identificados como inhibidores de la ACE presentan poco o ningún efecto en la presión sanguínea de personas normotensas, sugiriendo de esta forma que no ejercen efectos hipotensivos agudos. Así, los péptidos bioactivos inhibidores de la ACE pueden ser aplicados como un tratamiento inicial en individuos con hipertensión leve o como uno complementario. Además, podrían representar un tratamiento alternativo y de bajo costo para la hipertensión (Erdmann *et al.* 2008, García *et al.* 2013).

El mecanismo de inhibición de la ACE que presentan los péptidos de proteínas derivadas de alimentos es de vía competitiva. Sin embargo, algunos pueden inhibir la ACE de forma no competitiva (por ejemplo, LW e IY) y acompetitiva (por ejemplo IW y FY) (Udenigwe y Aluko 2012). En la inhibición competitiva se compete con el sustrato por el centro activo de la enzima. Así, un aumento en la concentración de éste da lugar a una disminución de la capacidad de competencia del inhibidor. Los inhibidores no competitivos y acompetitivos se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo, causando su deformación e

impidiendo la unión con el sustrato. Estos tipos de inhibición son independientes de la concentración de sustrato (Vioque *et al.* 2000).

La mayoría de los péptidos inhibidores de la ACE presentan una secuencia entre 2 y 12 aminoácidos, siendo más eficaces los di y tripéptidos (García *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2009). Los residuos de aminoácidos hidrofílicos pueden interrumpir el acceso del péptido a los sitios activos de la ACE, debido a que son incompatibles con éstos, mientras que los aminoácidos con carga positiva (R y K) contribuyen a la inhibición de la ACE si están presente en el extremo C-terminal de los péptidos, debido a que posiblemente interactúan con una unión alostérica aniónica en un lugar distinto al sitio activo de la ACE (Udenigwe y Aluko 2012, Li *et al.* 2004, mencionados por Soares de Castro y Sato 2015).

Por otro lado, se ha sugerido que el factor que controla si los péptidos presentan o no capacidad de inhibición de la ACE son los tres aminoácidos situados en el extremo C-terminal de dichos péptidos. Normalmente, deben contener residuos de aminoácidos hidrofóbicos (por ejemplo, P, F e Y) para que se puedan unir con los 3 sub sitios activos de la ACE. Esta unión se ve favorecida con los aminoácidos aromáticos (W, Y, y F), la P y los alifáticos (I, A, V, L y M). Estos dos últimos también son preferidos en las penúltimas posiciones junto con los aminoácidos básicos (R) (Escudero 2012, Halim *et al.* 2016).

En el caso de péptidos con más de tres aminoácidos, se menciona que la presencia de hidroxiprolina es importante para que el péptido se una a la ACE. Otra característica de los péptidos inhibidores de esta enzima es su naturaleza hidrofóbica en el extremo N-terminal, debido a que se unirán al sitio catalítico de la ACE ubicado en esa posición además del ubicado en el extremo C-terminal, favoreciendo el bloqueo de la formación de angiotensina II (Vermeirssen *et al.* 2004).

Se ha identificado numerosos péptidos como potentes cadenas inhibidoras de ACE, tales como AHIII (IC<sub>50</sub>: 37,1 µM), YN (IC<sub>50</sub>: 51 µM) proveniente de almejas, PGPLGLTGP (IC<sub>50</sub>: 95 µM) proveniente de raya, MIFPGAGGPEL (IC<sub>50</sub>: 22.1 µM) proveniente de *Limanda aspera*, LVQGS (IC<sub>50</sub>: 43.7 µM) proveniente de soya fermentada y AIYK (IC<sub>50</sub>: 213 µM) (Ko *et al.* 2012). También se han encontrado péptidos de quinua con un IC<sub>50</sub> menor al de la proteína de quinua aislada (880 ± 0.05 µg/mL) (Nongonierma *et al.* 2015). Asimismo, se han reportado estudios donde los péptidos con actividad inhibitoria de la

ACE también presentan actividad antioxidante en productos fermentados y en péptidos de quinua. Cabe recordar que se conoce como valor  $IC_{50}$  a la concentración requerida de péptido (en  $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de lograr una inhibición del 50 por ciento de la ACE (Mulero *et al.* 2011, Udenigwe y Aluko 2012).

## **2.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA DE LOS PÉPTIDOS**

### **2.3.1. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA**

La medida de la reducción en la formación de angiotensina II *in vitro* es un análisis muy común para evaluar la inhibición de la ACE ejercida por diferentes medicamentos y péptidos procedentes de alimentos. El valor  $IC_{50}$  se emplea para comparar la efectividad de diferentes péptidos inhibidores de la ACE y una vez establecido, representará una aproximación del posible efecto antihipertensivo de estos compuestos (Escudero 2012).

Uno de los métodos más comunes usados en la medición de la habilidad de los péptidos para inhibir la ACE emplea el compuesto hipuril-histidil-leucina (HHL) como sustrato de la ACE, el cual libera el dipéptido HL y ácido hipúrico. La cantidad de ácido hipúrico se cuantifica espectrofotométricamente a 228 nm una vez que ha sido extraído con etil acetato. Sin embargo, éste es un proceso tedioso que puede sobreestimar la actividad de la ACE si el HHL no hidrolizado que también presenta absorbancia a esa longitud de onda es extraído. Es por ello que se propuso un método donde el ácido hipúrico sintetizado reacciona con cloruro de benceno sulfonilo en presencia de quinolina, para recién ser cuantificado. Este problema también puede evitarse mediante la separación del HHL y la determinación cuantitativa por HPLC (Wu *et al.* 2002, García *et al.* 2013).

Además, existen otros métodos espectrofotométricos que han sido optimizados y validados. Tal es el caso del método basado en la liberación del dipéptido GG cuando la enzima reacciona con el sustrato furanacriloil-Fe-GG. Este método fue posteriormente evaluado y se recomendó detallar el número de unidades de enzima utilizadas e incluir en el estudio un patrón de inhibidor de la ACE, como el captopril. Posteriormente, se desarrolló un ensayo de fluorescencia que emplea *o*-aminobenzoilglicil-*p*-nitrofenilalanilprolina como sustrato de la ACE. La fluorescencia generada mediante la

liberación del grupo *o*-aminobenzoilglicil es leída en un fluorímetro (Vermeirssen *et al.* 2005, Escudero 2012).

Respecto a la determinación de la actividad antihipertensiva de los péptidos *in vivo*, se han realizado algunos estudios utilizando modelos con animales para determinar los efectos antihipertensivos de los péptidos tras tratamientos a corto y largo plazo, usándose generalmente ratas inducidas a hipertensión, debido a que los principios básicos asociados con el comienzo de la hipertensión en estos animales son sorprendentemente similares a los presentados en humanos (Escudero 2012, Vermeirssen *et al.* 2004).

Existen diferencias en relación a la estructura del intestino, su función y microflora, entre roedores y humanos. Ello implica la necesidad de llevar a cabo, posterior a los ensayos con animales de experimentación, estudios clínicos en humanos para demostrar la eficiencia de los péptidos antihipertensivos y garantizar su seguridad. Sin embargo, existen pocos estudios clínicos realizados en este sentido. Algunos sugieren la posibilidad de utilizar hidrolizados y péptidos procedentes de proteínas de alimentos como ingredientes en alimentos funcionales (preparados nutraceuticos y farmaceuticos) que reducirían el riesgo de hipertensión y por tanto mejorarían la salud. Esta utilidad sería particularmente indicada en sujetos pre-hipertensos que aún no necesitan medicación antihipertensiva y que pueden controlar su presión arterial a través de la dieta. También podría ser útil en pacientes hipertensos que no han respondido bien a los tratamientos farmacológicos (Korhonen y Pihlanto 2006).

### **2.3.2. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Los métodos *in vitro* son los más comunes para medir la actividad antioxidante de las proteínas hidrolizadas, teniendo así entre los más conocidos a los siguientes:

- DPPH: Tiene como mecanismo la captura del radical DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), el cual reacciona con el antioxidante donador de hidrógeno. Se mezcla el péptido con etanol o metanol para luego incubarse en oscuridad y temperatura ambiente. Su medida se da por absorbancia a 517 nm (Soares de Castro y Sato 2015).

- ORAC: Tiene como mecanismo la captura del radical peroxil. Este se genera por la ruptura de AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro] en presencia de oxígeno atmosférico. El radical peroxil reacciona con un indicador fluorescente para formar un producto no fluorescente. Cabe mencionar que cuando hay presencia de antioxidantes, la fluorescencia se mantiene. La medida se da por reducción en fluorescencia (excitación a 485 nm y emisión a 520 nm). Asimismo, es el único que combina tanto el grado como el tiempo de inhibición en un mismo resultado (Prior *et al.* 2003).
  
- ABTS: Tiene como mecanismo la captura de ABTS [2,2 azinobis (3-Ethylbenzothiazolino 6-Sulfonato)] el cual es estabilizado en la presencia de radicales libres donadores de hidrógeno. La medida se realiza por reducción en la absorbancia a 734 nm. Este método es más sensible que el DPPH para la medida de actividad antioxidante de proteínas hidrosolubles y péptidos en solución acuosa (Sanlidere y Öner 2011). Sin embargo, tiene dos limitaciones importantes. Por un lado, la capacidad antioxidante medida como trolox equivalente (valor TEAC) caracteriza la capacidad de la muestra para reaccionar con el radical ABTS<sup>•+</sup> en lugar de inhibir el proceso oxidativo. Por otro lado, el radical ABTS utilizado en el ensayo TEAC tiene una naturaleza diferente a la de los radicales que se encuentran en los sistemas biológicos (Escudero 2012).

En lo que se refiere al análisis *in vivo*, éstos se usan para confirmar la biodisponibilidad y la función biológica deseada, debido a que los métodos *in vitro* no evalúan la biodisponibilidad, la estabilidad *in vivo*, la retención del antioxidante en los tejidos y la de reactividad *in situ*. En este sentido, varios biomarcadores se usan para medir la habilidad antioxidantes de la dieta para proteger lípidos, proteínas y ADN de daños oxidativos (Escudero 2012).

## **2.4. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

### **2.4.1. ULTRAFILTRACIÓN**

La ultrafiltración fue originalmente desarrollada como una técnica de fraccionamiento en

la década de los '60 y desde ese momento, ha ido desarrollándose continuamente. Su aplicación abarca diversos campos, desde la recuperación de químicos, uso médico, concentración de jugos, industria láctea, etc. (Shi *et al.* 2014). Esta tecnología se ha venido usando para la refinación y aislamiento de péptidos bioactivos, separación de péptidos pequeños de otros residuos de mayor peso molecular y de enzimas presentes (Soares de Castro y Sato 2015). Presenta ventajas en cuanto a su alto rendimiento y a sus condiciones de operación, tales como bajas temperaturas y presiones, la no adición de aditivos químicos; asegurando así un menor riesgo de desnaturalización (en el caso de proteínas) y degradación de productos lábiles (Cui 2005).

La separación se da no solo mediante exclusión por tamaño molecular, sino también por un diferencial en la concentración de la muestra (alimentación), donde las moléculas más grandes que el diámetro del poro de la membrana no la atraviesan, denominándose a esta fracción, retentado. En tanto, las moléculas que sí logran atravesar dicho poro, se denominan permeado o percolado (Tavares y Malcata 2016). Por otro lado, se reporta que, incluso si el diámetro del poro es más grande que el de la molécula de alimentación, ésta podría no atravesarlo. Esto debido a que la fuerza impulsora de las moléculas de alimentación proviene de la diferencia de presión transmembrana, lo que genera la convección del permeado. La resistencia está conformada por la repulsión electrostática, aparte del obstáculo estereo-espacial. Entonces, para que las moléculas logren pasar el diámetro del poro, la fuerza convectiva debe superar la repulsión electrostática y, además, deben presentar menor tamaño que dicho diámetro. Asimismo, se debe tener en cuenta el pH de la solución, la fuerza iónica, y las interacciones proteína-proteína. Adicionalmente, se reporta que cuando el tamaño de los poros es amplio, la ultrafiltración dependerá solo del tamaño molecular; en tanto, si los poros de la membrana se van tornando más angostos, la separación estará conducida en términos de la solubilidad de los componentes de la alimentación, la hidrofobicidad y la resistencia a la polaridad (Cui 2005, Galanakis 2014).

El tamaño del poro de la membrana de ultrafiltración fluctúa entre 5-100 nm, y retiene moléculas con un peso molecular entre 1 kDa - 100 kDa, motivo por el cual es idealmente usada en macromoléculas como proteínas (Cui 2005, Tavares y Malcata 2016).

La ultrafiltración se suele emplear para incrementar la actividad biológica de los péptidos; por ejemplo la capacidad antioxidante y antihipertensiva (Galanakis 2014, Power *et al.*

2014). Es así que, se ha utilizado para incrementar el poder que presentan los péptidos derivados de suero de leche de inhibir la ACE, debido a que separa impurezas de alto peso molecular (Vermeirssen *et al.* 2005). Además, la actividad antioxidante de los péptidos, de acuerdo a algunos autores solo se manifiesta luego de un proceso de fraccionamiento por ultrafiltración, debido a la obtención de péptidos de menor tamaño molecular (Aluko y Monu 2003, Segura *et al.* 2010).

Sin embargo, la elección de la membrana, el modo de aplicación y las condiciones de operación no son tan específicos para el péptido y sus propiedades de interés, por lo que la ultrafiltración no es una barrera absoluta en la separación de macro y micromoléculas. Es por ello que es importante una posterior purificación mediante técnicas cromatográficas. Además, esto ocasionará una continua disminución del valor  $IC_{50}$  (lo que demuestra un aumento en la actividad antihipertensiva) (Arroume *et al.* 2016, Du *et al.* 2013, Galanakis 2014, Ko *et al.* 2012, Ruiz *et al.* 2011).

#### **2.4.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

La cromatografía es un método analítico para la purificación y separación de sustancias orgánicas e inorgánicas que resulta de particular utilidad en el fraccionamiento de mezclas complejas, aislamiento de sustancias inestables y separación de compuestos de estructuras muy semejantes. Este método tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia (Lederer y Lederer 1960, Skoog *et al.* 2008).

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, la cual puede ser un gas, líquido o fluido supercrítico. Esta fase se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan en distinto grado entre la fase móvil y estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil; sin embargo, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa (Skoog *et al.* 2008). La diferencia entre la cromatografía analítica y la preparativa es que, mientras la primera (para fines de separación, identificación y

determinación de componentes) no se ocupa de la recuperación de la muestra, la segunda involucra procesos de purificación y pretende el aislamiento de sustancias puras de una mezcla (Hostettmann *et al.* 1998).

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos maneras, siendo la primera basada en los medios por los cuales las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto; así podemos encontrar, cromatografía en columna y cromatografía plana (Skoog *et al.* 2008).

Las columnas cromatográficas están constituida por un tubo relleno con un sólido inerte, que mantiene a la fase estacionaria uniformemente distribuida. Por otro lado, la fase móvil ocupa los espacios libres entre las partículas del material de empaque (Abbott y Andrews 1970, Skoog *et al.* 2008). De las dimensiones de la columna depende la cantidad de muestra a separar y viceversa. Entre los parámetros de la columna de vital importancia para una mejor separación se tiene a la selectividad ( $\alpha$ ) y al factor de selectividad ( $k'$ ), los cuales influyen mayormente en la resolución ( $R_s$ ), mientras que el efecto de la eficiencia no influye mucho en ésta. La resolución es la medida de la separación relativa lograda entre dos materiales cromatográficamente distintos, y un máximo valor de ésta es el objetivo de cualquier paso de purificación. Para una buena separación es esencial maximizar el valor de  $\alpha$ , el cual es el parámetro más usado para obtener la mayor resolución (Hostettmann *et al.* 1998, Wrolstad *et al.* 2005). Se reporta que para la cromatografía con fines analíticos se emplea columnas largas con diámetro estrecho, mientras que en la cromatografía preparativa se usa columnas con un diámetro más ancho, pues esto permitirá una mayor carga, con lo que se conseguirá una mejor separación (Harris 2007).

Una particularidad de la cromatografía en columna es el uso de un gradiente de elución, el cual cambia las condiciones que determinan los valores del factor de retención o selectividad mientras tiene lugar la separación. A menudo, este procedimiento conduce a separaciones satisfactorias para todos los componentes de una mezcla en un tiempo mínimo. El gradiente de elución consiste en variar la composición de la fase móvil durante la separación, mientras que la elución con una composición constante de la fase móvil se denomina elución isocrática (Skoog *et al.* 2008).

El segundo tipo de clasificación se basa en la fase móvil y estacionaria empleada, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases. Se

presentan tres categorías generales de cromatografía: cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida (CL) y cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), siendo las fases móviles gases, líquidos y fluidos supercríticos, respectivamente (Skoog *et al.* 2008). El Cuadro 5 muestra una mayor explicación sobre este tipo de clasificación de los métodos cromatográficos:

**Cuadro 5: Clasificación de los métodos cromatográficos en columna**

<b>Clasificación general</b>	<b>Método específico</b>	<b>Fase estacionaria</b>	<b>Tipo de equilibrio</b>
Cromatografía de gases (CG)	Gas-líquido	Líquido unido a una superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía líquida (CL)	Líquido-líquido o reparto	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución y exclusión
	Afinidad	Líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido móvil y la superficie
Cromatografía de fluidos supercríticos		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

FUENTE: Adaptado de Skoog *et al.* 2008

#### **a. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO – LÍQUIDO O DE REPARTO**

Esta cromatografía está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el

reparto existente entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria (líquido), soportada en un sólido adecuado. Las técnicas más generales de la separación líquido-líquido se llevan a cabo sobre celulosa o gel de sílice húmedo, pudiendo realizarse en forma de tira de papel, capa fina o columna. Estos medios actúan como soporte del agua, por lo que este tipo de cromatografía se emplea fundamentalmente para la separación de sustancias solubles en la misma (Abbott y Andrews 1970).

Al principio, en la cromatografía de reparto se utilizaban columnas del tipo líquido-líquido; en la actualidad, éstas han sido reemplazadas por columnas de fase líquida unida. Mientras que en la cromatografía líquido- líquido, la columna se mantiene en su lugar mediante adsorción física, en la cromatografía de fase unida, están ligados por medio de un enlace iónico, lo que da por resultado rellenos muy estables e insolubles en la fase móvil (Skoog *et al.* 2008).

#### **b. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDO/SÓLIDO O DE ADSORCIÓN**

La adsorción es un fenómeno de superficie que se manifiesta por un aumento de concentración en la interfase que rodea el medio estacionario. No se le debe confundir con la absorción. Esta consiste en la penetración de una sustancia en el seno de un sólido.

Las diferencias de comportamiento en la adsorción-desorción de sustancias contenidas en un disolvente móvil (líquido o gas) sobre un sólido estacionario se utilizan para conseguir la separación de los componentes de una mezcla (Abbott y Andrews 1970).

Muchos de los sólidos empleados como adsorbentes en cromatografía de columna o de capa fina son óxidos metálicos, óxidos hidratados y sales. Los más populares son el gel de sílice y la alúmina. En determinados casos también se emplean otros adsorbentes especiales como el carbón activado y el polvo de poliamida (nilón). En cromatografía, el término adsorción se limita a las interacciones que implican enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas, mientras que cuando las interacciones son iónicas, el proceso se denomina intercambio iónico. La cromatografía de adsorción es la ideal para separar muestras no iónicas e hidrofóbicas de peso molecular intermedio (Abbott y Andrews 1970, Synder 1968).

Los centros adsorbentes o activos, provienen principalmente de los defectos de la red cristalina, donde las fuerzas electrostáticas están proyectadas parcialmente hacia el exterior. La adsorción es debida justamente a la interacción de estas fuerzas con las interacciones del soluto. Cuanto mayor sea la el momento dipolar del soluto, mayor será la adsorción (Abbott y Andrews 1970, Lederer y Lederer 1960).

En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables independientes, el adsorbente (fase estacionaria), disolvente (fase móvil) y la muestra. Las separaciones sobre adsorbentes dependen de la existencia del equilibrio entre las moléculas adsorbidas en la fase estacionaria y las que están libres en el disolvente, moviéndose las moléculas individuales entre las dos fases. Si las moléculas de un componente particular tienen una elevada afinidad por el adsorbente pasarán muy lentamente, mientras que otro componente con menos afinidad lo hará más rápido. Asimismo, se prefiere elegir una resina con polaridad similar entre el disolvente y la muestra a emplear y en la mayoría de casos se elige adsorbentes activos (no polares) para sustancias no polares y adsorbentes con menos actividad para sustancias más polares (Abbott y Andrews 1970).

La cantidad de muestra en la cromatografía de adsorción es muy importante, puesto que el poder adsorbente de la superficie disminuye considerablemente con el incremento de ésta, debido a que primero se ocupan los sitios más activos. El resultado es la aparición de colas en dirección al origen. Los mejores resultados se obtienen al aumentar tanto como se pueda la relación adsorbente:muestra. En cromatografía en columna esta relación puede ser de 100:1, e incluso de 10:1, obteniéndose separaciones más deficientes con esta última (Abbott y Andrews 1970). Además, muchas sustancias se desplazan mejor y más rápido a elevadas que a bajas concentraciones (Lederer y Lederer 1960).

### **c. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica de separación capaz de lograr tanto la identificación a una escala analítica como el fraccionamiento a una escala preparativa. Las separaciones de intercambio iónico se llevan a cabo con materiales especiales de estructura porosa e insoluble (Abbott y Andrews 1970, Harscoat *et al.* 2010). Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una

solución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido o gel de elevada masa molecular e insoluble (Skoog *et al.* 2008).

Es la técnica más usada para la separación de biomoléculas. En el caso de proteínas, su carácter anfotérico significa que pueden estar en formas catiónicas o aniónicas, dependiendo del pH. El punto isoeléctrico determina el pH del medio y la elección del tipo de cambiador iónico. La fuerza de unión está determinada por el número de grupos iónicos efectivos en la proteína, la densidad de carga del intercambiador de iones y la fuerza iónica de la fase móvil. De este modo, la elución de las proteínas se puede realizar con un gradiente de fuerza iónica presente, un gradiente de pH o una combinación de ambos. Hay un amplio rango de posibilidades que influyen en la retención y la selectividad (Hostettmann *et al.* 1998).

Generalmente, se emplean tres tipos de materiales, resinas, geles y celulosas de intercambio iónico. La diferencia entre ellos se debe a la naturaleza de los grupos cambiadores incorporados a cada uno y principalmente a la microestructura (Abbott y Andrews 1970). La cromatografía de intercambio iónico separa a las proteínas por carga bajo condiciones fisiológicas y de no-desnaturalización y, generalmente, las resinas tienen una alta capacidad de carga. La capacidad de una columna de intercambio iónico depende de la capacidad de intercambio de la resina y ésta puede ser tan alta como 5 mL equivalentes/g (Hostettmann *et al.* 1998).

Cuando las proteínas tienen una carga predominantemente negativa a valores de pH fisiológicos, se usa la cromatografía de intercambio aniónico, donde éstas eluyen de la columna por un gradiente creciente de sal (NaCl, por ejemplo). A mayor densidad de carga de la molécula a separar, se requiere mayor fuerza iónica del eluyente. Para la purificación de proteínas usando este tipo de cromatografía, se prefiere emplear intercambiadores aniónicos. Esto debido a que la mayoría de las proteínas se encuentran cargadas negativamente a un pH neutro. La cromatografía de intercambio aniónico retiene aniones usando grupos funcionales cargados positivamente, como un catión de amonio cuaternario o una amina. Sin embargo, el problema de dicha cromatografía es que se realiza a pH alto, y este aspecto puede afectar la estabilidad de los soportes basados en sílice. Esta complicación se elimina con resinas de intercambio iónico copoliméricas, como las columnas Vydac (Escudero 2012, Hostettmann *et al.* 1998). Otro inconveniente de esta

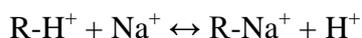
cromatografía es que se obtienen mejores resultados utilizando sales no volátiles como el NaCl, lo que presenta un gran inconveniente cuando se requiere una posterior identificación por espectrometría de masas. Para superar este problema, la separación por intercambio iónico suele ir seguida de una cromatografía en fase reversa o de interacción hidrofílica con el fin de eliminar la sal de los péptidos de interés, antes de analizarlos por espectrometría de masas (Escudero 2012). Es por este motivo que la literatura menciona que se requiere de pasos complementarios para la separación de las fracciones peptídicas (Bouhallab y Boschetti 1996 y Ortiz-Martinez *et al.* 2014, citados por Soares de Castro y Sato 2015).

La reacción entre la resina aniónica R-OH<sup>-</sup> y el ión cloruro sería:



Por otro lado, si el péptido o proteína de interés es básico, el método de elección es la cromatografía de intercambio catiónico. En ésta se pueden probar tampones de fosfato, formiato y acetato. La cromatografía de intercambio catiónico retiene cationes cargados positivamente debido a que la fase estacionaria muestra un grupo funcional con carga negativa, como un ácido sulfónico o carboxílico (Escudero 2012, Hostettmann *et al.* 1998).

La reacción entre resina catiónica R-H<sup>+</sup> y los iones sodio sería:



Asimismo, la carga neta de la proteína dependerá del pH. Así, será positiva a un pH bajo, negativa a un pH elevado y presentará carga cero cuando se encuentre en el punto isoeléctrico. Generalmente, las proteínas se encuentran estables entre un pH de 6.0 a 9.0. (Wrolstad *et al.* 2005).

#### **d. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO**

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es el término más preciso para esta técnica, la cual se conoce a menudo como cromatografía de filtración en gel (GFC) o cromatografía de permeación en gel (GPC) (Hostettmann *et al.* 1998). Es un tipo particular

de cromatografía líquido-líquido que se utiliza en la separación de sustancias que poseen distinta forma y peso molecular (Abbott y Andrews 1970, Voet *et al.* 2009). Anteriormente, si la separación se basaba en rellenos hidrófilos se llamaba GFC, mientras que la basada en rellenos hidrófobos se denominaba GPC. Sin embargo, en la actualidad ambas técnicas están comprendidas en la SEC indistintamente (Skoog *et al.* 2008).

Los solutos se separan selectivamente por orden decreciente de tamaño molecular en los materiales de soporte hidrofílicos porosos (geles poliméricos o gel de sílices modificados), cuyos diámetros oscilan entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ . La SEC depende de dos efectos: diferentes proporciones de difusión para partículas disueltas, en función de su tamaño y forma, y el efecto de escala conseguido en función del tamaño de poro del material de relleno. Las moléculas de soluto en la mezcla que sobrepasen el límite de exclusión (moléculas de mayor tamaño que los poros del soporte de material) son excluidas (es decir, no son retenidas) y migran con el eluyente. Sin embargo, las moléculas cuyos diámetros son significativamente menores que los poros pueden penetrar a través de ellos y así pasan mucho tiempo atrapadas, siendo las últimas en ser eluidas. Entre estos dos extremos están las moléculas de tamaño intermedio, cuya penetración media en los poros depende de su diámetro, así como de las dimensiones y forma de la molécula. El método permite que se realicen altas recuperaciones de soluto. Esta cromatografía es compatible con un amplio rango de fases móviles (por ejemplo agua o una disolución tampón), además de presentar baja capacidad de carga. No existe una interacción química o física entre el analito y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones debido a que originan una baja efectividad de la columna (Hostettmann *et al.* 1998, Abbott y Andrews 1970, Skoog *et al.* 2008).

Los materiales que más se usan son dextranos con enlaces reticulados o agarosa (Sephadex /Sepharse), cuentas de poliacrilamida de enlaces entrecruzados (Bio-Gel), derivados de dextrano (Sephacryl) y partículas de sílice (Hostettmann *et al.* 1998). Las partículas de sílice tienen la ventaja de ser de gran rigidez, lo que facilita el relleno y permite la aplicación de presiones más elevadas, mayor estabilidad. Esto favorece el uso de una gran variedad de solventes, un equilibrio más rápido al cambiar de solvente y una buena estabilidad a altas temperaturas. Los inconvenientes que presenta se deben a su tendencia a retener solutos por adsorción y su capacidad para catalizar la degradación de las moléculas de soluto (Skoog *et al.* 2008).

El método habitual para caracterizar los diversos tipos de geles se denomina valores de recuperación de agua. Este valor representa la cantidad (en mL) de agua embebida por un gramo de gel seco. Los números del tipo Sephadex y del Bio-gel son diez veces la cantidad de recuperación de agua, por ejemplo, el Sephadex G-10 tiene un valor de recuperación de agua igual a uno y el G-200 igual a veinte. Estos valores no incluyen el agua de entre las partículas. En los tipos que tienen el valor de recuperación bajo, el tamaño del poro es pequeño, utilizándose para el fraccionamiento de moléculas pequeñas, mientras que los que poseen un valor alto se utilizan para compuestos con elevado peso molecular (Abbott y Andrews 1970).

Otra aplicación importante de SEC es la determinación del peso molecular en los grandes polímeros o en los productos naturales, debido a que, además del fraccionamiento de la muestra, los volúmenes de elución de proteínas globulares sobre el G-100 y el G-200 están determinados por su peso molecular. Así, se puede dibujar una curva de calibración de proteínas de peso molecular conocido y calcular el peso molecular de proteínas desconocidas de una muestra problema. Asimismo, no se recomienda el uso de columnas pequeñas para este tipo de cromatografía, debido a que la velocidad elevada de flujo y la regularidad de las esferillas conducen a separaciones pobres (Abbott y Andrews 1970, Skoog *et al.* 2008).

Las ventajas más importantes de la SEC son tiempos cortos de separación, bandas estrechas, la no pérdida de muestra porque los solutos generalmente no interactúan con la fase estacionaria y, finalmente, la columna se puede reutilizar. Entre las desventajas se tiene, que la escala de tiempo del cromatograma es corta, por lo que solo se puede acomodar una cantidad limitada de bandas y la inaplicabilidad con muestras de dimensiones similares, como los isómeros. Se requiere una diferencia de 10 por ciento en las masas moleculares para conseguir una resolución razonable (Skoog *et al.* 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

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

- Quinoa blanca de Huallhuas, adquirida del Programa de Cereales de la UNALM.
- Enzima Neutrasa® 5.0 BG (5 UA/g de proteína), proveniente de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (Novozyme).

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

##### **3.3.1. MATERIALES**

- Columna de vidrio para cromatografía de filtración sobre gel (CFSG) (1.5 cm x 100 cm)
- Columna de vidrio para cromatografía de adsorción (CA) (2cm x 15cm)
- Columna analítica de fase reversa (RP) para cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) Kinetex C<sub>18</sub> (2.1 mm x 30 mm)
- Materiales de vidrio diversos: Embudo Büchner, beakers, matraces, fioles, pipetas, etc.)
- Micropipetas (20-200µL, 100-1000 µL y 0.5-5 mL) (Brand, Alemania)

##### **3.3.2. EQUIPOS**

- Agitador magnético (Cat<sup>®</sup>, Modelo M6, Alemania)
- Agitador Vortex (VELP<sup>®</sup> scientific, modelo F202A0175, Alemania)

- Balanza analítica (OHAUS<sup>®</sup>, modelo AR2140, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS<sup>®</sup>, modelo Scout, China) Baño maría con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand<sup>®</sup>. Modelo ME2C, Alemania) Bomba peristáltica (Cole Parmer Instrument Co. Masterflex LIS, USA)
- Cabina de secado con flujo de aire recirculado (Fravil<sup>®</sup>, Perú)
- Cassette Pellicon XL 10 kDa (Merck Millipore<sup>®</sup>, USA)
- Cassette Pellicon XL 3 kDa (Merck Millipore<sup>®</sup>, USA)
- Centrífuga (Hettich<sup>®</sup>. Modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa<sup>®</sup>, Perú)
- Colector de fracciones universal (Eldex<sup>®</sup> Laboratories, USA)
- Congelador (Electrolux<sup>®</sup>, modelo GLFC1326FW1, Canadá)
- Cromatógrafo HPLC (Waters Associates<sup>®</sup>, modelo 2996, USA) con detector de arreglo de diodos (Waters Associates<sup>®</sup>, modelo 2996, USA)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Genesys 10 UV, USA)
- Liofilizador (Labconco<sup>®</sup>, modelo 245ER, USA)
- Molino (IKA<sup>®</sup>, modelo A11 Basic, USA)
- Potenciómetro digital (Thermo Orion<sup>®</sup>, modelo 410, USA)
- Refrigeradora (LG<sup>®</sup>, modelo GR-482BEF, Corea)

### 3.3.3. REACTIVOS

- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma Aldrich, USA)
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (Sigma Aldrich, India)
- Acetonitrilo grado HPLC (Fermont, México)
- Ácido clorhídrico 37% (J.T. Baker, México)
- Ácido hipúrico 98% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido picrilsulfónico 5% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Aldrich, India)
- Azida sódica (Sigma Aldrich, India)
- Bio-Gel P-2 (Rango de separación entre 100 y 1800 Da) (Bio-Rad, USA)

- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de potasio (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich, USA) Éter de petróleo (J.T. Baker, USA)
- Enzima convertidora de angiotensina (ACE) (1 U/mL) (Sigma Aldrich, USA)
- Folin-Ciocalteu 2N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker, México)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratado 98% (Sigma Aldrich, India)
- Resina de adsorción macroporosa (DA-201 C), cuya separación se basa en la no polaridad del analito (Suqing Chemistry, China)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99% (Sigma Aldrich, USA)

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

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

Se determinó mediante el método reportado por Adler – Nissen (1979) con ligeras modificaciones usadas en la presente investigación. La reacción se describe a continuación, en un tubo de ensayo se agregó 0.5 mL de buffer borato 0.2 M (pH 8.2), 0.63 mL de la muestra proteica hidrolizada disuelta en SDS al 1 por ciento y 0.5 mL de una solución de ácido picrilsulfónico (TNBS, 1mg/mL). El conjunto protegido de luz se agitó e incubó a 50 °C durante 60 minutos en un baño María. La reacción se detiene agregando 1 mL de HCl 0.1N y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se agrega 2 mL de agua destilada y se deja reposar por 10 minutos más, antes de leer la absorbancia a 340 nm. Los resultados se determinaron con la ayuda de una curva estándar utilizando una solución de L-leucina en SDS al 1 por ciento en un rango de concentración de 0.5 – 3.0 mM (Anexo 1). Se preparó el blanco sustituyendo la muestra por 0.63 mL de solución de SDS al 1 por ciento en agua. Los valores del grado de hidrólisis (DH) fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$DH (\%) = 100 \left( \frac{AN_2 - AN_1}{Npb} \right)$$

Donde:

DH: grado de hidrólisis

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

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

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

### **3.4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL**

Para la determinación de proteína total en el concentrado proteico de quinua se utilizó la metodología Kjeldahl, según el método 984.13 (AOAC 1995). Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el cual se destila recibiendo en ácido sulfúrico, donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o en ácido bórico, formándose borato de amonio, el cual se valora con ácido clorhídrico. El factor de conversión de proteína usado fue de 5.85.

### **3.4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE**

Las proteínas solubles se determinaron bajo la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951). Este es un método colorimétrico donde las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin – Ciocalteu, el cual es reducido por los restos de tirosina y triptófano presentes en un complejo cuproproteico para dar otro complejo de color azul violáceo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de aminoácidos aromáticos presentes y cambiará según la clase de proteínas.

Este análisis se realizó mezclando 400 µL de la muestra hidrolizada con 2 mL de la

solución de reacción 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. A esta mezcla se le añadió 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin Ciocalteau 1N y el conjunto se agitó e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. 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 (Anexo 2) y fueron expresados en mg/mL. El blanco se preparó sustituyendo la muestra hidrolizada por 400  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de cloruro de sodio al 0.9 por ciento.

#### **3.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS**

Se utilizó el método reportado por Torruco *et al.* (2009) y Re *et al.* (1999) adaptado para hidrolizados proteicos de la presente investigación. Este ensayo se realizó preparando la solución A: 7 mM de ABTS y la solución B: 25.4 mM de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , ambas diluidas en agua desionizada. Estas fueron mezcladas en una proporción de 9:1 y se almacenaron por 12 – 16 horas en oscuridad antes de su uso. A esta solución se le denominó solución madre.

Luego del tiempo transcurrido, se preparó la solución diluida de  $\text{ABTS}^+$  en buffer fosfato salino (PBS), el cual está compuesto por 8.18 g/L de NaCl, 0.27 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.42 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y 0.15 g/L de KCl disueltos en agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7.4 (usando NaOH 1M). Luego, la solución diluida de ABTS y el PBS fueron mezclados en una proporción 1:50, respectivamente, hasta alcanzar una absorbancia de  $0.70 \pm 0.03$  a 734 nm. Para la medición de la actividad antioxidante se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de la muestra hidrolizada previamente diluida en PBS y se mezcló con 4 ml de la solución diluida de ABTS. Después de una hora de reacción (en oscuridad) se determinó la absorbancia a 734 nm. Los resultados se determinaron mediante una curva estándar utilizando una solución de trolox en un rango de concentración de 0.5-2.0 mM (Anexo 3) y fueron expresados en  $\mu\text{mol}$  de trolox equivalente (TE)/g de proteína. Asimismo, se preparó el blanco usando PBS en reemplazo de la muestra.

#### **3.4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA**

Se determinó por el método de Wu *et al.* (2002). El sustrato Hipuril-histidil-leucina (HHL)

2.17 mM se preparó en buffer borato salino (BBS) 0.2 M (pH 8.3), el cual contiene 300 mM de NaCl. La ACE fue disuelta en 0.5 mL de BBS. La reacción se realizó mezclando en tubos de reacción de 250  $\mu$ L, 50  $\mu$ L de solución de HHL 2.17 mM, 10  $\mu$ L de muestra de hidrolizado proteico a analizar (1mg de proteína/mL) y 10  $\mu$ L de solución de ACE. Se incubó con agitación durante 30 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida con la adición de 80  $\mu$ L de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco. El control consiste en la determinación de la actividad absoluta de ACE sobre el sustrato HHL, que resulta en la formación de ácido hipúrico (HA), para lo cual se reemplazaron los 10  $\mu$ L de muestra proteica hidrolizada por 10  $\mu$ L de BBS y la reacción se realizó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para la preparación del blanco se usó la ACE previamente inactivada con HCl 1N y se siguió el mismo procedimiento usado para la muestra. Todas las muestras fueron filtradas empleando filtros Millipore® de 0.22  $\mu$ M y analizadas mediante UPLC, usando una columna Kinetex C<sub>18</sub> en RP. Se inyectaron 10  $\mu$ L y la corrida se realizó a 40 °C, a un flujo de 1 mL/min, en un gradiente de solvente A (0.05 por ciento de TFA en agua) y solvente B (0.05 por ciento de TFA en acetonitrilo). El tiempo de corrida fue de 7 minutos.

La actividad inhibitoria ACE fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria ACE (\%)} = \frac{(Ac - As)}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Donde:

Ac: concentración de ácido hipúrico (HA) en el control

As: concentración de HA de la muestra

Ab: concentración HA del blanco

#### **3.4.6. DETERMINACIÓN DEL IC<sub>50</sub>**

Se determinó según lo propuesto por Barbana y Boye (2011). El valor de IC<sub>50</sub> se define como la concentración de inhibidor requerida para reducir 50 por ciento de la actividad de la ACE. Se evaluaron concentraciones de péptido en un rango de 0.1 a 1 mg/mL. Los resultados se expresaron en  $\mu$ g/mL y se obtienen plotando la inhibición de la ACE (en porcentaje) versus el log de la concentración proteica (mg/mL).

### 3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.5.1. EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA QUINUA

Para la extracción de la proteína a partir de quinua blanca de Huallhuas se siguió la metodología propuesta por Fritz *et al.* (2011) para proteínas de semillas de amaranto, con ligeras modificaciones. En la Figura 2 se muestra el flujo de operaciones indicando los factores que fueron estudiados:

**Limpieza y lavado:** Se extrajo todo material extraño como hojas, piedras, pajas, etc.

**Molienda y Tamizado:** El grano de quinua se molió en un molino de laboratorio. Luego se procedió a tamizar con la ayuda de un tamiz Tyler N° 35 (500 µm), eliminando las partículas de mayor tamaño.

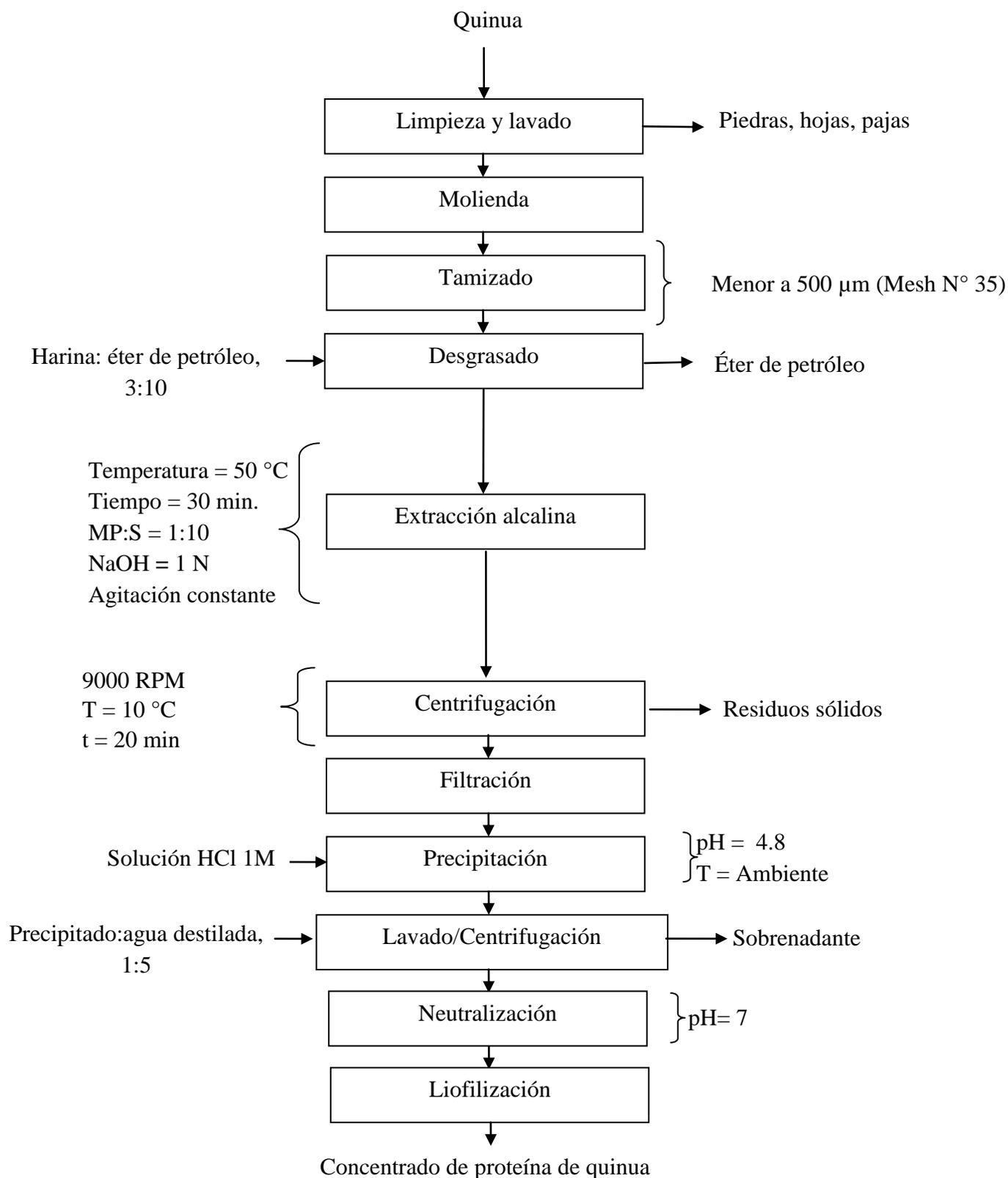
**Desgrasado:** Se procedió a desgrasar la harina obtenida después del tamizado en una relación de 300 g de harina con 1000 mL de éter de petróleo, bajo agitación durante 16 horas a temperatura de refrigeración. Luego, se filtró y eliminó el solvente residual de la torta en la cabina de secado con flujo de aire recirculado a 50°C por 1 hora.

**Extracción Alcalina:** La extracción de proteína se realizó con una relación materia prima/solvente 1:10, pH 10 (usando NaOH 1 N), 50°C y un tiempo de 30 minutos en un baño maría con agitación.

**Centrifugación:** Luego de la extracción alcalina se procedió a centrifugar la solución a 9000 RPM por 20 minutos a temperatura de 10 °C, conservándose el sobrenadante. Se realizó una segunda extracción con la torta restante, bajo las mismas condiciones.

**Filtración:** Los sobrenadantes de ambas extracciones fueron filtrados con bomba de vacío usando papel Whatman N°1 y luego se procedió a la precipitación.

**Precipitación isoeléctrica:** Se ajustó el pH a 4.8 (usando HCl 1N), bajo agitación durante 5 minutos y temperatura ambiente. Se conservó el precipitado obtenido, el cual fue separado del sobrenadante.



**Figura 2: Flujo de operaciones para la extracción de proteínas de quinua**

**Lavado/ Centrifugación:** Al precipitado se le realizaron dos lavados con agua destilada en una relación concentrado/solvente de 1:5, seguido de una centrifugación a 9000 RPM por 20 minutos y a una temperatura de 5 °C, recuperándose el precipitado.

**Neutralización:** El precipitado lavado se resuspendió en agua destilada y se reguló el pH a 7.

**Liofilización:** El concentrado se procedió a secar por liofilización y se almacenó en bolsas de polietileno a -20 °C para su posterior determinación del contenido de proteína total.

### **3.5.2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA QUINUA**

Se tomó como referencia lo propuesto por Guerrero - Ochoa *et al.* (2015), trabajándose con la enzima de grado alimentario Neutrasa® (termolisina, metaloproteasa) a una concentración de 0.385 UA/g de proteína, un pH inicial de 7 y temperatura de 50 °C.

La reacción se realizó en erlenmeyers de 250 mL, conteniendo 100 mL de solución a una concentración de 2.5 por ciento de proteína disuelta en buffer fosfato 0.2 M a un pH 7.0, añadiéndose la cantidad de enzima requerida. La hidrólisis proteica se realizó durante 120 minutos, bajo agitación constante. La reacción fue detenida por inactivación térmica a 85 °C durante 10 minutos, seguido de centrifugación a 10 000 RPM durante 10 min, recuperándose los péptidos contenidos en el sobrenadante. La cantidad de enzima a añadir fue calculada con la siguiente fórmula, de acuerdo con Wrolstad *et al.* (2005)

$$Me = Mp \times \frac{A}{E}$$

Donde:

Me: Cantidad de enzima a añadir

Mp: Cantidad de proteína presente en la solución (2.5 g)

A: Unidades enzimáticas requeridas (0.385 UA/g de proteína)

E: Unidades enzimáticas especificadas en el empaque (5 UA/g de proteína)

El sobrenadante fue analizado para determinar el grado de hidrólisis, el contenido de proteína soluble, la actividad antioxidante ABTS, la actividad antihipertensiva y el valor IC<sub>50</sub>.

### **3.5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental que se siguió se muestra en la Figura 3. La purificación y caracterización de los péptidos provenientes de hidrolizados de proteínas de quinua se realizó en tres etapas que se detallan a continuación:

#### **a. SEPARACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN**

En esta etapa se procedió a pasar el hidrolizado proteico de quinua (acápite 3.5.2.) por un sistema de ultrafiltración considerando membranas de tamaño de corte (*cut off*) de 10 y 3 kDa. Así, se pasó por la membrana de 10 kDa donde se obtuvieron dos fracciones: el retentado y el permeado; a ambas fracciones se le determinó la actividad antioxidante y contenido de proteína soluble; y solo al permeado actividad inhibitoria ACE. Luego, el permeado (donde se encuentran los péptidos de menor tamaño) fue sometido a una segunda ultrafiltración con una membrana de 3 kDa, y nuevamente al permeado y al retentado se le determinó la actividad antioxidante y el contenido de proteína soluble; y adicionalmente al nuevo permeado, la actividad inhibitoria ACE. La fracción del permeado obtenido prosiguió con la siguiente etapa.

#### **b. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN**

La cromatografía de baja presión se realizó mediante dos técnicas *i*) cromatografía de adsorción (CA) y *ii*) cromatografía de filtración sobre gel (CFSG).

La CA se realizó sobre el permeado obtenido en la ultrafiltración con la membrana de 3 kDa, empleando una columna empacada con la resina de adsorción macroporosa DA-201C (Suqing Chemistry) (Anexo 4). La columna empacada fue equilibrada con agua Milli-Q y la elución se realizó con agua Milli-Q y etanol a tres concentraciones acuosas de 25, 50 y

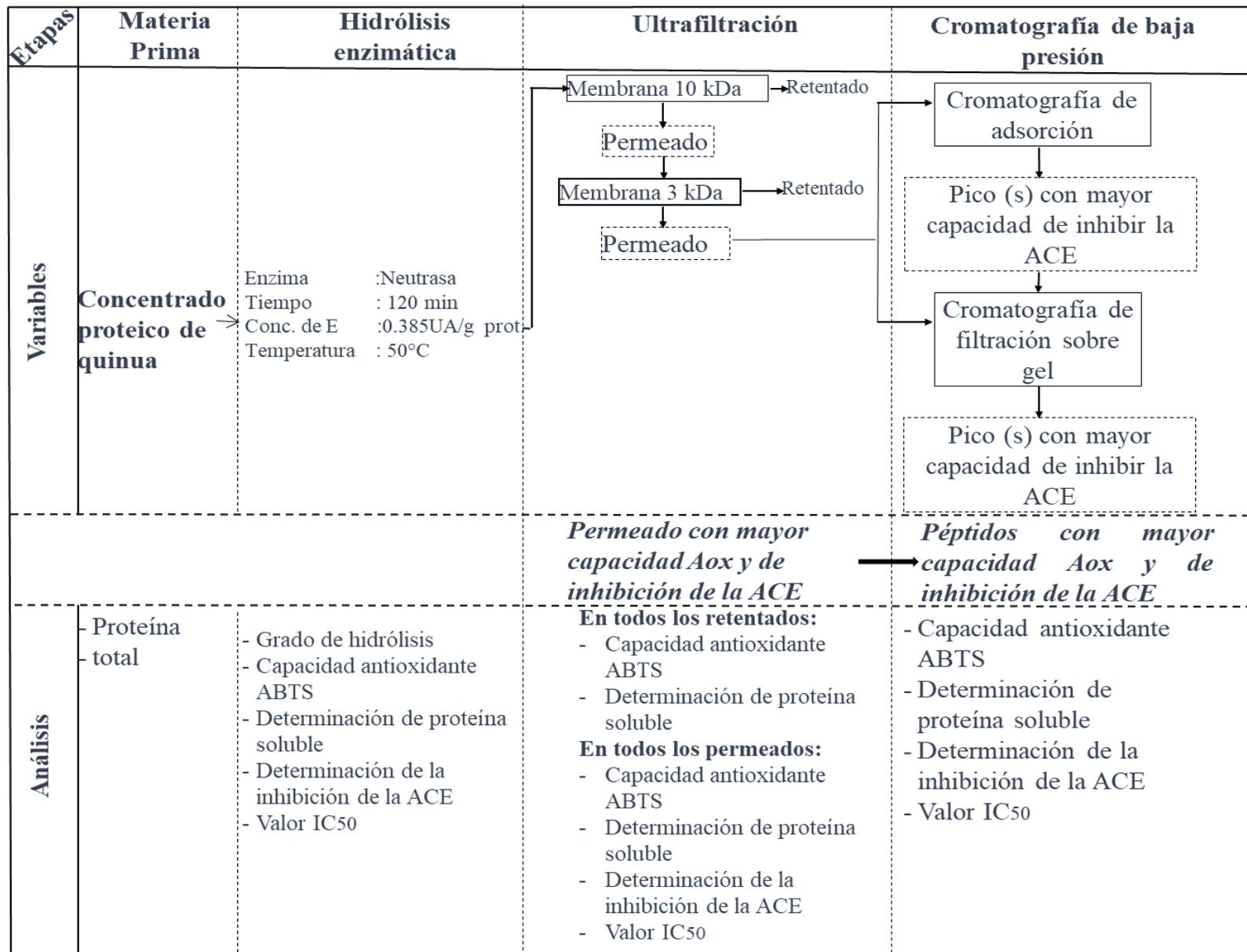


Figura 3: Diseño experimental para la purificación de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva

75 por ciento, a un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 2 mL y la detección se realizó a 220 nm. Para cada una de las fracciones obtenidas se determinó la actividad ACE y capacidad antioxidante. En los picos con alta actividad ACE se determinó el IC<sub>50</sub> y se seleccionó la fracción con mayor capacidad antioxidante y antihipertensiva.

La fracción elegida en la etapa anterior, así como el permeado obtenido de la membrana de 3 kDa (acápite 3.5.3.1) fueron sometidos a una CFSG. Se empleó el gel Biogel® P-2 (rango de fraccionamiento 100-1800 Da) (Anexo 5) y se equilibró con azida de sodio al 5 por ciento en agua. Se inyectó 1 mL de solución de péptidos (a una concentración proteica de 50 mg/mL, disuelto en agua) y la elución se realizó a temperatura ambiente con un flujo constante de 12 mL/h. Se colectaron fracciones de 2 mL y la detección se hizo a 214 nm. Para cada una de las fracciones obtenidas se determinó la actividad ACE y capacidad antioxidante. En los picos con alta actividad ACE se determinó el IC<sub>50</sub>. Estas fracciones fueron liofilizadas para su posterior caracterización.

#### **3.5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y la prueba de Kruskal – Wallis para poder analizar el efecto de la purificación del hidrolizado de la proteína de la quinua (ultrafiltración, CA y CFSG) sobre: la actividad inhibitoria de la ACE y la actividad antioxidante, respectivamente. Todos los ensayos y/o tratamientos fueron realizados por triplicado.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PREPARACIÓN DEL CONCENTRADO E HIDROLIZADO PROTEICO DE QUINUA

Se partió de grano de quinua blanca de Huallhuas, y se obtuvo el concentrado proteico de quinua (CPQ), siguiendo lo descrito en el acápite 3.5.1. Se obtuvo 73.24 por ciento de proteína (usándose un factor de conversión de 5.85). Obtenido el CPQ, se llevó a cabo la hidrólisis con la enzima Neutrasa por un período de 120 minutos y el producto obtenido se denominó hidrolizado de quinua (HQ).

El Cuadro 6 muestra diversas características tanto del CPQ como del HQ, donde se destaca la capacidad antioxidante y la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

**Cuadro 6: Características del concentrado proteico de quinua (CPQ) y el hidrolizado de quinua (HQ)**

Características	CPQ	HQ
Proteína total (%)	73,24	ND
Grado de hidrólisis (%)	ND	26,00 ± 0.01
Capacidad antioxidante (µmol TE/g proteína)*	1,353.58 <sup>b</sup> ± 33.37	1,667,38 <sup>a</sup> ± 9.55
Inhibición de la ACE (%)**	ND	59.08 ± 2.71
Valor IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ND	300.7 ± 0.01

\*promedio de tres repeticiones ± DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). \*\*A una concentración proteica de 0.5 mg/mL. ND: No determinado

El valor de proteína total del CPQ (73.24 por ciento) está dentro del rango reportado por Abugoch *et al.* (2009), el cual es de 72.2 – 83.5 por ciento y supera al mencionado por Aluko y Monu (2003) (65.5 por ciento). Las proteínas de quinua corresponden mayormente a albúminas y globulinas (44 - 77 por ciento de la proteína total), una pequeña fracción de prolaminas (0.5 - 7 por ciento) y, es considerada libre de gluten justamente por su escaso contenido de prolaminas (Valencia-Chamorro 2016). Este cereal andino presenta un buen balance aminoacídico y es rico en aminoácidos azufrados y lisina (K), contrariamente a las leguminosas y cereales, respectivamente (Varli y Sanlier 2016).

Por otro lado, se aprecia que el HQ obtuvo un grado de hidrólisis (GH) promedio de  $26 \pm 0.01$  por ciento (Anexo 6). Las condiciones empleadas en la hidrólisis, tales como el tiempo, temperatura y pH, así como la relación enzima/sustrato presentan gran influencia en este parámetro. Así, Guerrero-Ochoa *et al.* (2015) reportaron un valor de aproximadamente 30 por ciento durante el mismo tiempo empleado en este estudio (120 minutos). En la presente investigación se usó la enzima Neutrasa, la cual es una metaloproteasa proveniente de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* y presenta como sitio de acción catalítica a los aminoácidos leucina (L), valina (V) y al metal hierro. Además, su uso en la hidrólisis permite la liberación de aminoácidos hidrofóbicos (Benitez *et al.* 2008). Como la mayoría de metaloproteasas, empieza a actuar desde el extremo de la proteína (ejerciendo el rol de exopeptidasa) y, a su vez, actúa sobre las moléculas del interior (acción endoproteasa). Cabe mencionar que estas moléculas del interior se vuelven más accesibles a la enzima solo después de la progresiva acción de ésta desde el exterior, lo cual se ve favorecido por la acción exoproteasa de la Neutrasa (Damrongsakkul *et al.* 2008). Por su parte, Kammoun y Ellouz (2003) indican que presenta una especificidad mayor que la endoproteasa Alcalasa, la cual también es muy empleada en la obtención de hidrolizados proteicos. Por su lado, Badui (2006) indica que cuando se emplean enzimas proteolíticas se logra una mejor hidrólisis, debido a que presentan una mejor especificidad respecto a los enlaces que fragmentan. En el caso de la Alcalasa, ésta actúa a partir del aminoácido serina (S). Además, Segura *et al.* (2013), citados por Cian *et al.* (2015), mencionan que cuando se emplean dichas endoproteasas, se alcanzan valores de GH no mayores a 20-25 por ciento, demostrándose que la Neutrasa permite obtener un valor más alto, de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 6.

En relación con la capacidad antioxidante (CAO), ésta aumentó de  $1,353.58 \pm 33.37$   $\mu\text{mol}$ -

TE/g proteína en el CPQ a  $1,667.38 \pm 9.55$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína en el HQ, presentándose diferencia significativa en ambos resultados (Anexo 7). Se reporta que las proteínas por sí solas, en su forma nativa, presentan CAO debido a que inactivan las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), atrapan radicales libres y quelan metales de oxidación prooxidativos. Esto debido a la presencia y secuencia de aminoácidos específicos que presentan dicha propiedad, reportando como ejemplos a las proteínas caseína,  $\beta$ -lactoglobulina y lactoferrina. Es por ello que, el CPQ obtenido también presentó CAO; sin embargo, debido al alto peso molecular que las proteínas presentan, no pueden atravesar la membrana celular, siendo incapaces de actuar biológicamente, por lo que tienen que pasar por un proceso de hidrólisis, ya sea por la digestión gastrointestinal o mediante enzimas (Samaranayaka y Li-Chan 2011). Por otro lado, también es importante mencionar que la cantidad de péptidos obtenidos mediante digestión gastrointestinal de proteínas no son suficientes para producir los efectos biológicos deseados, por lo que se hace necesario complementar la dieta con péptidos bioactivos obtenidos mediante procesos tecnológicos, donde se destaca la hidrólisis controlada mediante enzimas comerciales (Mora *et al.* 2016). En base al ensayo ABTS, el aminoácido cisteína (C) es el más activo, seguido de triptófano (W), tirosina (Y) e histidina (H), por lo que los péptidos que los contengan serán los responsables de presentar una mayor CAO. Los aminoácidos metionina (M), K y fenilalanina (F) muestran una actividad ABTS baja; mientras que los demás no muestran ninguna actividad (Intarasiriwasat *et al.* 2012 y Zheng *et al.* 2016). Por su parte, Mine *et al.* (2010) indicaron que la Y y M presentes en los péptidos ejercen mayor rol en la CAO de éste. Además, reportaron como aminoácidos antioxidantes endógenos a la H, C, M y, por último, a la Y.

De acuerdo a la metodología empleada en el presente trabajo, el tiempo de incubación en el ensayo ABTS y el pH de la reacción fueron de una hora y  $7.4 \pm 0.02$ , respectivamente. Al respecto, Zheng *et al.* (2016) sugieren por lo menos 30 minutos de incubación para obtener valores más confiables de la CAO medida como equivalentes trolox equivalente (TEAC), trabajando a un pH de 7.4.

Asimismo, se ha reportado una relación entre la CAO y el GH. Por ejemplo, Sila *et al.* (2016) indican que este último es un parámetro importante para la determinación de las propiedades biológicas y funcionales de los hidrolizados proteicos, demostrándose que la CAO se vio incrementada luego de la hidrólisis con determinadas enzimas. Por su lado,

Agyei *et al.* (2016) mencionan que un GH mayor a 10 por ciento permite la obtención de péptidos bioactivos para aplicaciones médicas y alimentarias. Sin embargo, una sobre hidrólisis podría causar degradación enzimática, lo que generaría una pérdida de dichas propiedades bioactivas.

Respecto a la actividad de la ACE, se reporta que conduce a un aumento de la presión sanguínea mediante la producción del péptido vasoconstrictor angiotensina II y la degradación del péptido vasodilatador bradiquinina. Por lo tanto, se utilizan a los inhibidores de la ACE como agentes terapéuticos contra la hipertensión. Se sabe que los péptidos derivados de proteínas de los alimentos presentan actividad inhibidora de la ACE y se considera que son más seguros en comparación a las drogas sintéticas (Hartman y Meisel 2007). En este sentido, de acuerdo al Cuadro 6, el HQ presentó un  $59.1 \pm 2.71$  por ciento de inhibición de la ACE a una concentración proteica de 0.5 mg/mL. Guerrero-Ochoa *et al.* (2015) reportaron una inhibición de 85 por ciento en péptidos de quinua y Gangopadhyay *et al.* (2016) encontraron una inhibición de  $47.23 \pm 2.62$  por ciento en péptidos de cebada (ambos estudios se realizaron a una concentración proteica de 1 mg/mL). Los últimos autores indicaron, además, que el captopril (el inhibidor sintético de la ACE más empleado en la industria farmacéutica) presenta  $87.46 \pm 1.71$  por ciento de inhibición. Por su parte, Gomes *et al.* (2016) reportan que la quinua presenta mayor inhibición de la ACE que la kiwicha, el trigo sarraceno y diversos cereales.

Cabe mencionar que la capacidad de inhibición de la ACE, no guarda una relación directa con el GH como la CAO, de acuerdo con Wu *et al.* (2016). Estos autores obtuvieron un GH ideal de 19 por ciento en proteína de sorgo, para posteriores procesos de purificación, logrando un aumento de la capacidad de inhibición de la ACE de 20 a 85 por ciento. Sin embargo, cuando el GH superó este valor, no existió un aumento significativo de esta característica. Asimismo, Fritz *et al.* (2011) reportan que el incremento de la capacidad de inhibición de la ACE se da en presencia de GH's moderados.

Finalmente, el valor  $IC_{50}$  se define como la concentración de péptido ( $\mu\text{g/mL}$ ) requerida para producir una inhibición del 50 por ciento de la ACE. Este valor se determina mediante un análisis de regresión de la inhibición de ACE (%) frente al log de la concentración de péptidos. El HQ presenta un  $IC_{50}$  de  $300.7 \pm 0.01$   $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 8), el cual es menor al reportado por Nongonierma *et al.* (2015), quienes obtuvieron 880  $\mu\text{g/mL}$  (en proteína de

quinua hidrolizada con papaína). Esto indica que el valor del presente trabajo tiene un mayor efecto en la capacidad de inhibir la ACE. Estos mismos autores reportan que se puede considerar una potente actividad de inhibición de la ACE con valores menores a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Asimismo, Hong *et al.* (2005) mencionados por Ruiz *et al.* (2011), reportan valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 200-246.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para hidrolizados provenientes de diferentes fuentes proteicas antes de ser sometidos a un proceso de purificación. El valor reportado en el Cuadro 6 se encuentra muy cercano a este rango. Fritz *et al.* (2011) indican que los péptidos derivados de proteínas alimentarias presentan un valor  $\text{IC}_{50}$  entre 80-1080  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , encontrándose el valor del HQ dentro de estos valores. Estos mismos autores reportan a los hidrolizados derivados de proteínas de leche como máximos inhibidores de la ACE, obteniendo un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por su parte, Mirzaei *et al.* (2015) hallaron un  $\text{IC}_{50}$  entre 800 y 2240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en hidrolizados de levadura de cerveza, mientras que Connolly *et al.* (2014) indican un valor de 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en péptidos de granos cerveceros. Este último se encuentra muy cercano al reportado en el Cuadro 6.

## **4.2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS**

### **4.2.1. FRACCIONAMIENTO DEL HIDROLIZADO DE QUINUA POR ULTRAFILTRACIÓN**

La ultrafiltración es una tecnología de separación no destructiva basada en el peso molecular, la cual se suele emplear para incrementar la actividad biológica de los péptidos; por ejemplo la capacidad antioxidante y antihipertensiva (Galanakis 2014, Power *et al.* 2014). Es por esta razón que el HQ obtenido en la etapa anterior fue sometido a un proceso de ultrafiltración, mediante membranas de *cut off* 10 y 3 kDa.

Cuando se usan membranas con *cut off* de poro ancho, la separación se basa solo en el mecanismo de tamizado (de acuerdo al peso molecular), donde se destaca la separación entre macro y micromoléculas. Sin embargo, cuando el *cut off* se va haciendo más estrecho, la separación se vuelve más restrictiva, tomando en cuenta la solubilidad de los componentes de la alimentación, la hidrofobicidad y resistencia a la polaridad de la membrana (Cui 2005, Tsagaraki y Lazarides 2011).

El Cuadro 7 (Anexo 9) presenta la distribución de los péptidos obtenidos, expresados como

el rendimiento proteico respecto al HQ. Se obtuvieron tres fracciones (F-I, F-II y F-III), donde F-I representa la fracción de peso molecular mayor a 10 kDa (retentado de *cut off* 10 kDa), F-II a la fracción de peso molecular entre 3-10 kDa (permeado de *cut off* 10 kDa y retentado de *cut off* 3 kDa) y F-III representa a la fracción de peso molecular menor a 3 kDa (permeado de *cut off* 3 kDa).

**Cuadro 7: Distribución de péptidos del hidrolizado de quinua (HQ) en las fracciones obtenidas por ultrafiltración**

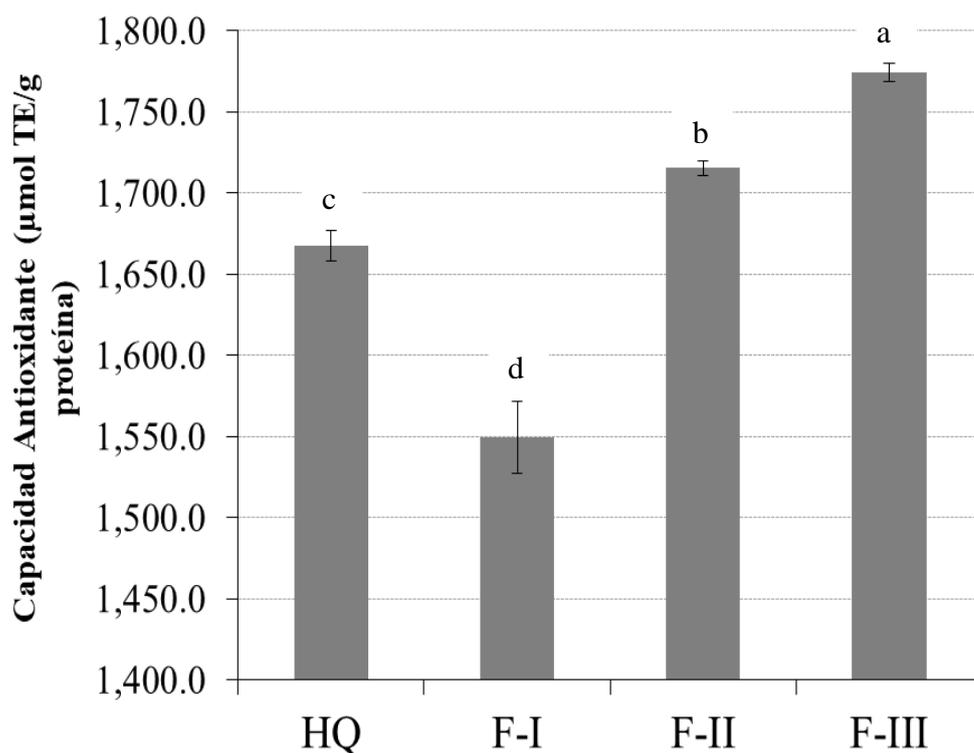
Fracción	Distribución de péptidos del HQ (%)
F-I	12 ± 0.01
F-II	24 ± 0.01
F-III	47 ± 0.01

Los valores están expresados como un promedio de tres repeticiones ± DS

De acuerdo al Cuadro 7, la mayor cantidad de péptidos del HQ se encuentran en la F-III, con un promedio de 47 por ciento, lo que indica que el HQ contiene mayormente péptidos de bajo peso molecular; concordando con lo mencionado por González-García *et al.* (2015), quienes también trabajaron con un *cut off* de 3 kDa. Por su lado, He *et al.* (2013) reportaron que el rendimiento de péptidos provenientes de colza con peso molecular menor a 3 kDa fue casi el doble comparado con aquellos de mayor tamaño (5 y 10 kDa). Asimismo, Jang *et al.* (2016) encontraron 44 por ciento de péptidos con peso molecular menor a 3 kDa en el hidrolizado proteico de pescado, siendo este resultado próximo a lo reportado en el Cuadro 7.

Los resultados de la CAO tanto del HQ como de las fracciones obtenidas durante la ultrafiltración, se muestran en la Figura 4, donde se observa que las fracciones F-I, F-II y F-III presentan  $1,549.55 \pm 22.385$ ,  $1,715.35 \pm 4.27$  y  $1,774.32 \pm 5.99$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína, respectivamente (Anexo 10).

La Figura 4 indica que la F-III es la que posee mayor CAO, respecto a las otras fracciones y al HQ, además, todas éstas presentan diferencia significativa (Anexo 11). Esto coincide con lo reportado por Chale *et al.* (2014), quienes obtuvieron valores más altos de CAO en las fracciones de menor peso molecular. De acuerdo a Power *et al.* (2014) y Mirzaei *et al.*



**Figura 4: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas por ultrafiltración (HQ: Hidrolizado de quinua, F-I: > 10 kDa, F-II: 3-10 kDa y F-III: < 3 kDa)**

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

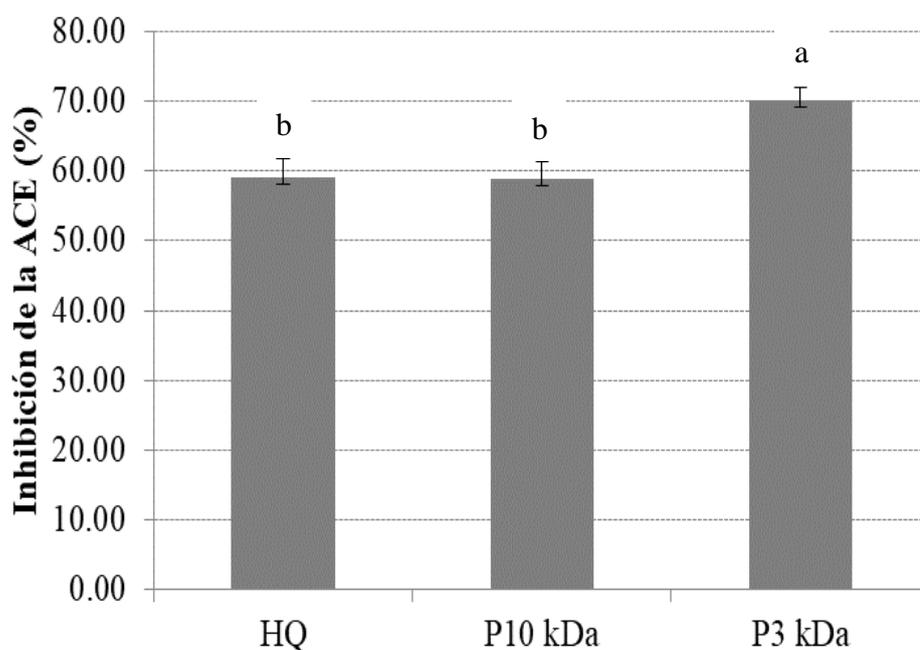
(2015), cada fracción obtenida por ultrafiltración posee actividad antioxidante, siendo este valor dependiente del *cut off* por la que se somete el hidrolizado. Además, Sila *et al.* (2016) mencionan que generalmente las moléculas con un peso molecular entre 1-5 kDa son las que presentan una actividad antioxidante más potente. Asimismo, Jang *et al.* (2016) y You *et al.* (2010) obtuvieron una CAO mayor en péptidos menores a 3 kDa que en sus respectivos hidrolizados, concordando con la Figura 4. Esto fue atribuido a que la accesibilidad del sistema oxidante-antioxidante es mayor en péptidos pequeños y aminoácidos que en proteínas y péptidos de elevado peso molecular.

Sin embargo, en el presente trabajo se observa que la fracción separada por ultrafiltración con mayor peso molecular (F-I) presenta una CAO incluso más baja que el HQ. Asimismo, González-García *et al.* (2015), quienes trabajaron con proteína de semillas de ciruela, reportaron una CAO ABTS menor en las fracciones de menor peso molecular en

comparación con el hidrolizado. Este comportamiento es usual dentro de los compuestos antioxidantes debido a que luego de su acción contra los radicales libres se regeneran unos a otros (para recuperar su forma reducida y reducir su reactividad), trabajando de forma sinérgica. Escudero (2012) y García *et al.* (2013) justifican este comportamiento, indicando que la actividad antioxidante se encuentra presente en toda la proteína y no está restringida solo a los péptidos; presentando el hidrolizado, adicionalmente, oligopéptidos y aminoácidos, los cuales aumentarían la reacción con el radical ABTS.

Asimismo, la Figura 5 y el Cuadro 8 muestran el porcentaje de inhibición de la ACE y los valores  $IC_{50}$  de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, respectivamente. Además se indica la comparación con el HQ. Se observa que los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa presentan mayores valores de inhibición de la ACE (Anexo 12), presentando diferencia significativa con el permeado obtenido con el *cut off* de 10 kDa y con el HQ (Anexo 13). Lafarga *et al.* (2016) obtuvieron valores mayores a 70 por ciento en el mismo tamaño de fracción. Esto se explica, debido a que usualmente los péptidos inhibidores de la ACE están compuestos por aminoácidos de cadena corta. Por su parte, Du *et al.* (2013), reportaron una inhibición de la ACE de 74.6 por ciento en péptidos de un invertebrado marino; y Gangopadhyay *et al.* (2016), valores de 70 por ciento de inhibición. Ambos autores reportaron sus resultados en fracciones de peso molecular menor a 3 kDa y, el último presentó un valor de inhibición de 57 por ciento en fracciones sometidas a un *cut off* de 10 kDa. Dichos valores se encuentran muy cercanos a los obtenidos en el Cuadro 8, demostrando que la ultrafiltración ayuda a enriquecer la capacidad de inhibición de la ACE, debido a que remueve moléculas grandes de proteína, péptidos agregados y moléculas de enzima desactivadas que podrían estar presentes en el hidrolizado. Segura *et al.* (2011) también reportaron mejores resultados, tanto de inhibición de la ACE como de  $IC_{50}$  en péptidos luego de ser sometidos a ultrafiltración. Por último, Aluko y Monu (2003) reportaron una mayor capacidad de inhibición de la ACE en péptidos de quinua sometidos a un *cut off* de 5 kDa, en comparación con aquellos sometidos a uno de 10 kDa y al hidrolizado inicial.

En el Cuadro 8 también se aprecia un  $IC_{50}$  de 132.0  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 14) en péptidos con peso molecular menor a 3 kDa. Este valor es menor al reportado por Zhao *et al.* (2009), el cual fue 615  $\mu\text{g/mL}$  en péptidos de *Acaudina molpadioidea*, sometidos a un *cut off* de 2



**Figura 5: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) de los permeados obtenidos por ultrafiltración con un *cut off* de 10 y 3 kDa**

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

**Cuadro 8: Valores de  $IC_{50}$  de las fracciones separadas por ultrafiltración\***

Fracciones	Inhibición de la ACE (%)**	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
HQ	59.08 <sup>b</sup> ± 2.71	300.7 ± 0.01
P10kDa	58.90 <sup>b</sup> ± 2.54	194.1 ± 0.08
P3kDa	70.07 <sup>a</sup> ± 1.95	132.0 ± 0.00

\*promedio de dos repeticiones ± DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). \*\*A una concentración proteica de 0.5 mg/mL

kDa; también al reportado por Chen *et al.* (2013) en péptidos de arroz (280  $\mu\text{g/mL}$ ) e indicado por Mirzaei *et al.* (2015) en péptidos de levadura de cerveza (320  $\mu\text{g/mL}$ ; en ambos casos, luego de someter los péptidos a un *cut off* de 3 kDa. Esto indica que los péptidos de quinua presentan mayor capacidad antihipertensiva.

Asimismo, Ji-Eun *et al.* (2010), mencionados por Segura *et al.* (2011), y Chen *et al.* (2012)

obtuvieron un  $IC_{50}$  de 500  $\mu\text{g/mL}$  y 308  $\mu\text{g/mL}$  en péptidos de proteína vegetal texturizada y del pez *grass carp*, respectivamente; luego de haberse sometido también a un *cut off* de 3 kDa. Por su parte, el valor obtenido en el Cuadro 8 se encuentra muy cercano al obtenido por Wu *et al.* (2016), quienes sometieron péptidos de sorgo a un *cut off* de 1 kDa ( $IC_{50} = 116 \mu\text{g/mL}$ ). Cabe mencionar que todos los  $IC_{50}$  reportados fueron menores a los obtenidos en el hidrolizado de sus respectivas proteínas antes de la ultrafiltración, por lo que este proceso incrementa la capacidad de inhibición de la ACE, tal como se vio con la CAO.

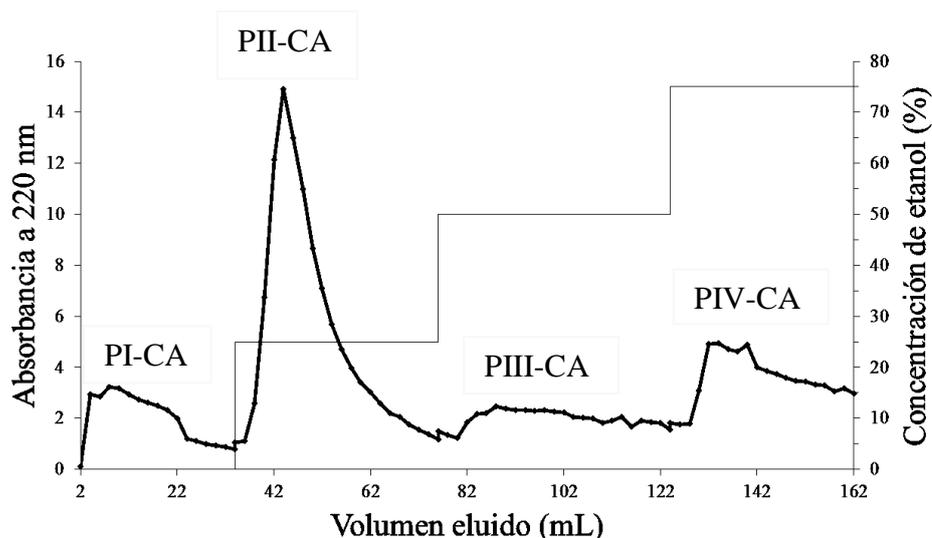
Con lo anterior descrito, se puede decir que la ultrafiltración es una técnica de separación confiable; sin embargo, la fabricación asimétrica de los poros de la membrana no siempre refleja un estrecho rango de umbral de peso molecular. El efecto de este último parámetro se atenúa cuando se toma en cuenta la solubilidad de los solutos y la hidrofobicidad de la superficie de la membrana. Así, la ultrafiltración, no es una barrera absoluta en la separación de macro y micromoléculas y, por ello, se opta por posteriores procesos de separación (Galanakis 2014).

Los péptidos de bajo peso molecular obtenidos por ultrafiltración se han usado con frecuencia para la purificación de péptidos antioxidantes (Je *et al.* 2007) y antihipertensivos (Chen *et al.* 2012). Es así que en este contexto, la fracción F-III, la cual representa a los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa, mayor CAO y mejores valores de inhibición de la ACE e  $IC_{50}$  se reservó para la siguiente etapa de purificación.

#### **4.2.2. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN (CA)**

De acuerdo a lo obtenido en la etapa anterior, se escogieron a los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa para continuar con el proceso de purificación. La Figura 6 muestra el cromatograma de separación de dichos péptidos, obtenidos por cromatografía de baja presión usando la resina DA-201C.

En esta cromatografía se empleó la resina DA-201C y de acuerdo a la Figura 6, se obtuvieron cuatro picos: PI-CA, PII-CA, PIII-CA y PIV-CA, los cuales fueron eluidos con una solución al 0, 25, 50 y 75 por ciento de etanol, respectivamente. Tal como se mencionó anteriormente, el peso molecular no es la única característica fisicoquímica que juega un



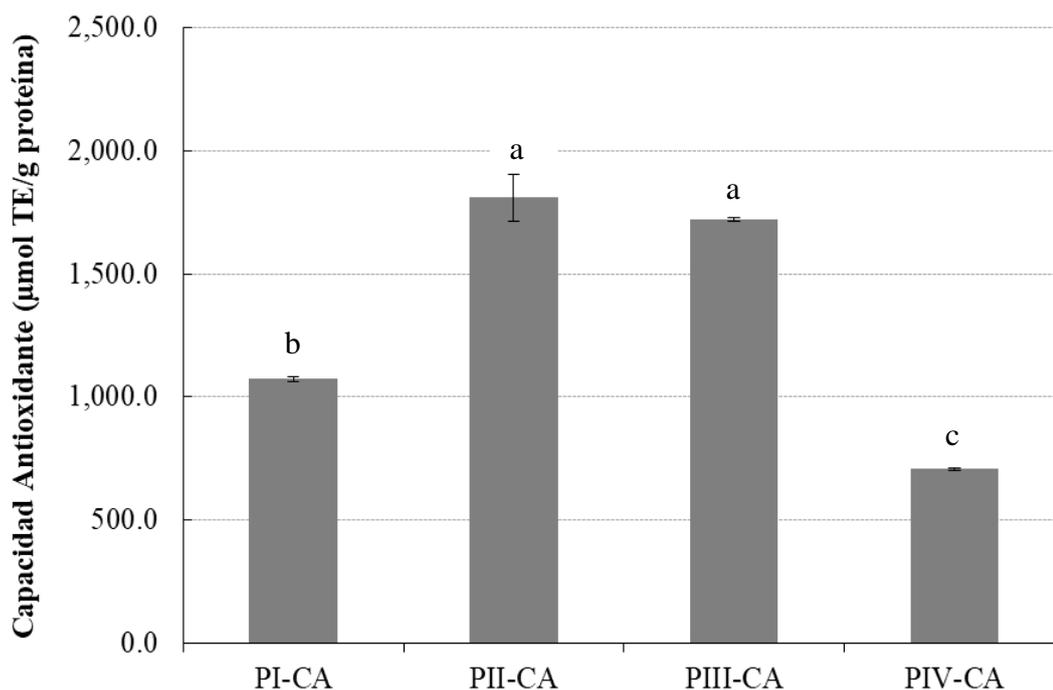
**Figura 6: Separación de la F-III (permeado del *cut off* 3 kDa) mediante cromatografía de adsorción.**

Flujo 1 mL/min. Volumen de cada fracción 2 mL

rol importante en la bioactividad de los péptidos, por lo que se hizo uso de la CA para separarlos de acuerdo a su hidrofobicidad.

Zhong *et al.* (2009), mencionan que la resina DA-201C separa los péptidos por su carácter hidrofóbico. En general, la CA se puede llevar a cabo en separaciones preparativas, lo cual es ideal, debido a que permite continuar con la purificación (Synder 1968). Así, Zhao *et al.* (2016) usaron dicha resina como parte de un proceso para separar péptidos antiinflamatorios por hidrofobicidad. Además, Aluko y Monu (2003) realizaron un análisis de hidrofobicidad en péptidos de quinua, los cuales fueron sometidos a previa ultrafiltración y, encontraron que las fracciones de bajo peso molecular y carácter hidrofóbico son las que presentan propiedades biológicas.

La Figura 7 muestra la CAO en los picos PI-CA, PII-CA, PIII-CA y PIV-CA obtenidos en la CA. Se observa que el PII-CA presenta la mayor CAO ( $1,810.06 \pm 95.72 \mu\text{mol TE/g}$  proteína), seguido del PIII-CA ( $1,719.97 \pm 5.63 \mu\text{mol TE/g}$  proteína), PI-CA ( $1,072.45 \pm 11.26 \mu\text{mol TE/g}$  proteína) y PIV-CA ( $706.46 \pm 5.63 \mu\text{mol TE/g}$  proteína) (Anexo 15); no encontrándose diferencia significativa entre el PII-CA y el PIII-CA (Anexo 16). Además, tal como se reportó en la Figura 4, el valor de la CAO de la fracción F-III fue de  $1,774.32 \pm 5.99 \mu\text{mol TE/g}$  proteína, viéndose un aumento solo en el PII-CA. Como consecuencia de



**Figura 7: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidos por cromatografía de adsorción. Dichas regiones se muestran en la Figura 6**

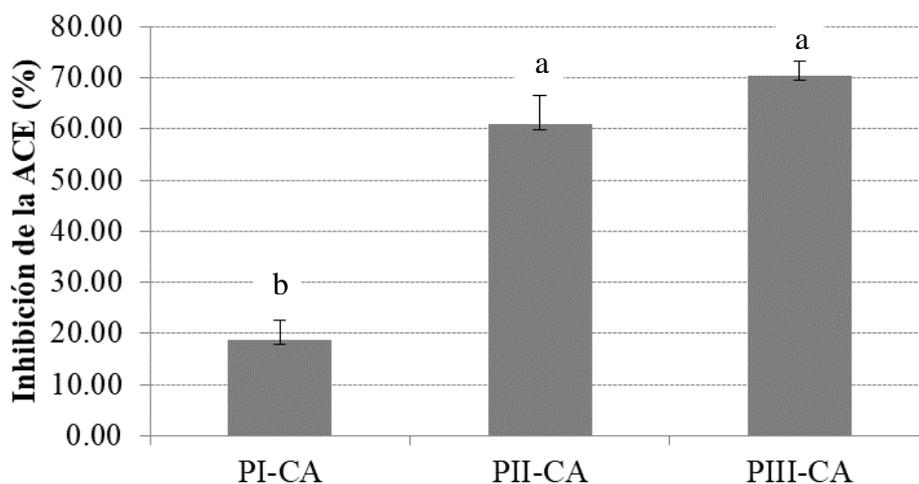
Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

estos resultados, se eligió tentativamente a este último pico para seguir con la siguiente etapa de purificación; previo a ello, se realizó el análisis de inhibición de la ACE.

De acuerdo con González-García *et al.* (2015) y He *et al.* (2013), citados por Wu *et al.* (2016), los péptidos que presentan CAO y antihipertensiva están compuestos por aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos. Asimismo, Agyei *et al.* (2016) indican que los grupos sulfhidrilo hidrofóbicos imparten propiedades antioxidantes a los péptidos. Por ejemplo, You *et al.* (2010) reportaron una alta CAO en la secuencia peptídica hidrofóbica Prolina (P) SYV y Nongonierma *et al.* (2015) atribuyeron la CAO de los péptidos de quinua a residuos hidrófobos como P, H, Y y W o residuos sulfurados (C y M). Cabe mencionar que según lo reportado por Repo-Carrasco (1992) y Gross *et al.* (1989), la quinua es rica tanto en aminoácidos aromáticos (F e Y) como en aminoácidos hidrofóbicos (L, V, isoleucina).

En lo que respecta a la capacidad antihipertensiva, Vermeirssen *et al.* (2004) mencionan que la hidrofobicidad del péptido es importante para poder ser inhibidores de la ACE, debido a que presentan gran afinidad por los sitios activos de esta enzima, a diferencia de los péptidos hidrofílicos. Esto último es respaldado por Connolly *et al.* (2014) quienes indican que los péptidos de carácter hidrofóbico presentan mejores probabilidades de inhibir dicha enzima. Sin embargo, Marco (2013) indica que la arginina (R), la cual es un aminoácido hidrofílico, es considerada como cardioprotector, debido a que previene eventos de hipertensión arterial.

En vista que los péptidos antioxidantes y antihipertensivos coinciden en estructura aminoacídica (hidrofóbicos y aromáticos), el análisis de la CAO fue determinante para seleccionar las fracciones a ser sometidas al análisis de inhibición de la ACE. Así, como solo la CAO de los picos PI-CA, PII-CA y PIII-CA resultaron comparables al de la F-III, éstos fueron los únicos sometidos al análisis de inhibición de la ACE y a la obtención de los valores IC<sub>50</sub>, cuyos resultados se aprecian en la Figura 8 y Cuadro 9, respectivamente.



**Figura 8: Inhibición de la ACE de los picos obtenidos por cromatografía de adsorción. Dichos picos se muestran en la Figura 6**

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

De acuerdo a la Figura 8 y el Cuadro 9, todos los picos presentan actividad antihipertensiva; sin embargo, el valor del PI-CA no es comparable al obtenido en el P3kDa, por lo que no fue considerado para el cálculo del IC<sub>50</sub> (Anexo 17 y Anexo 18).

Además, se puede apreciar en el Cuadro 9 que el PIII-CA (eluido con una solución al 50 por ciento de etanol) es el que presenta la mayor capacidad antihipertensiva ( $IC_{50} = 97.2 \mu\text{g/mL}$ ), siendo este valor menor al obtenido anteriormente en el P3kDa ( $132.0 \mu\text{g/mL}$ ).

**Cuadro 9: Valores de  $IC_{50}$  de las fracciones separadas por cromatografía de adsorción\***

Picos obtenidos	Inhibición de la ACE (%)**	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
PI-CA	$18.82^b \pm 3.80$	N.D
PII-CA	$60.86^a \pm 5.59$	$117.0 \pm 0.01$
PIII-CA	$70.51^a \pm 2.63$	$97.2 \pm 0.01$

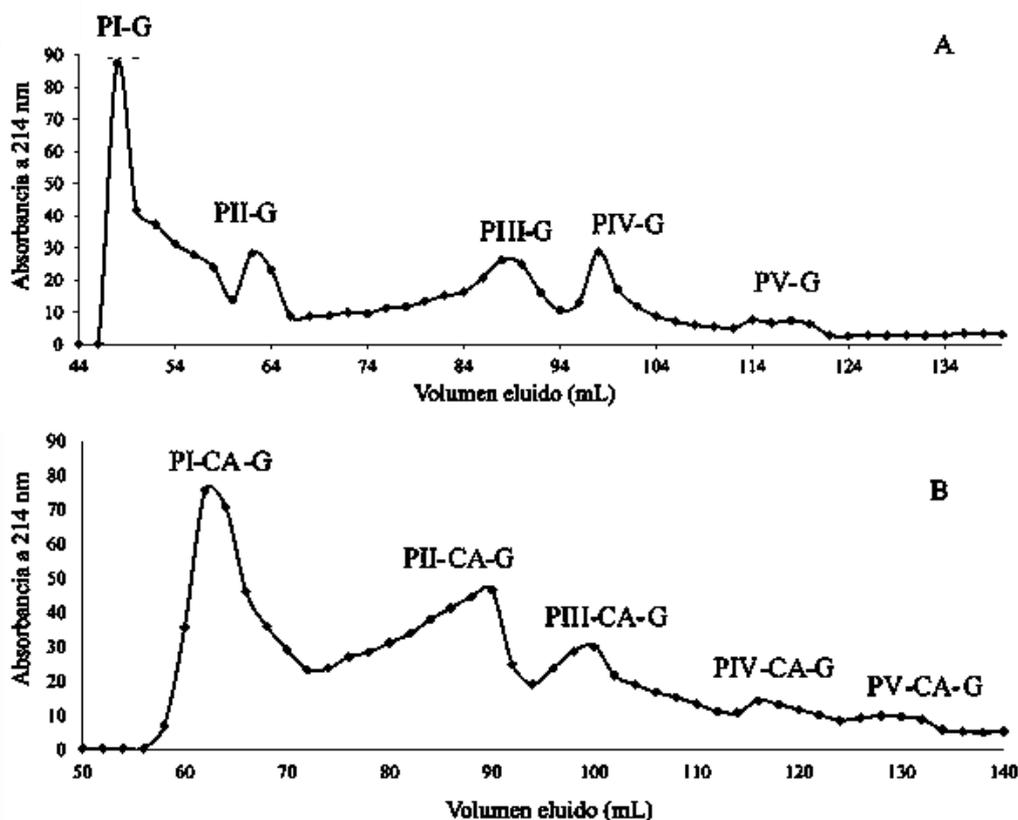
\*promedio de dos repeticiones  $\pm$  DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). \*\*A una concentración proteica de  $0.5 \text{ mg/mL}$ . N.D: No determinado

Así, se demuestra que la capacidad de inhibición de la ACE incrementa conforme se avanza en la purificación. Asimismo, el valor del Cuadro 9 es menor al reportado por Chen *et al.* (2012), quienes obtuvieron un  $IC_{50}$  de  $130 \mu\text{g/mL}$  en péptidos del pez *grass carp*, con una elución de 50 por ciento de etanol. También es muy cercano al  $IC_{50}$  obtenido por Wu *et al.* (2016) en péptidos de sorgo luego de ser purificados mediante ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico (CII), cuyo valor fue  $102.1 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, el valor obtenido en el PIII-CA no presenta diferencia significativa con el PII-CA (eluido con solución al 25 por ciento de etanol), tal como sucedió en la CAO (Anexo 16 y Anexo 19), por lo que se escoge a este último para seguir el proceso de purificación, debido a que es el que presenta mayor contenido proteico, según lo indicado en el cromatograma de la Figura 6.

Zhang *et al.* (2009) mencionan que los resultados en la dinámica de adsorción y el gradiente de desorción de la resina DA-201C se deben a la hidrofobicidad de ésta. Además, se consigue quitar sales a los péptidos y enriquecerlos de aminoácidos hidrofóbicos, los cuales tienen una alta capacidad de inhibición de la ACE, tal como se mencionó anteriormente. Estos autores trabajaron con péptidos de *Ctenopharyngodon idella*, obteniendo un  $IC_{50}$  de  $130 \mu\text{g/mL}$ , el cual es mayor al indicado en el PII-CA y PIII-CA, por lo que se aprecia que los péptidos de quinua poseen una mayor capacidad antihipertensiva.

### 4.2.3. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL (CFSG)

Los péptidos correspondientes a la P3kDa y PII-CA de los acápites 4.2.1 y 4.2.2, respectivamente, fueron escogidos para continuar con el proceso de purificación mediante CFSG. La Figura 9 muestra el cromatograma de separación de dichos péptidos, donde se observa que se obtuvieron cinco picos en ambos casos. Dicha separación se llevó a cabo usando el gel Biogel P-2, el cual está conformado por cuentas de poliacrilamida de enlaces entrecruzados y separan a los péptidos en un rango de 100-1800 Da. En general, los geles usados en CFSG se caracterizan por no interactuar química ni físicamente con la muestra. Esta característica hace que la separación solo se realice en términos del peso molecular (Skoog *et al.* 2008).



**Figura 9: Separación mediante cromatografía de filtración sobre gel de la fracción P3kDa (A) y el pico PII-CA (B).**

Flujo 0.2 mL/min. Volumen de cada fracción 2 mL

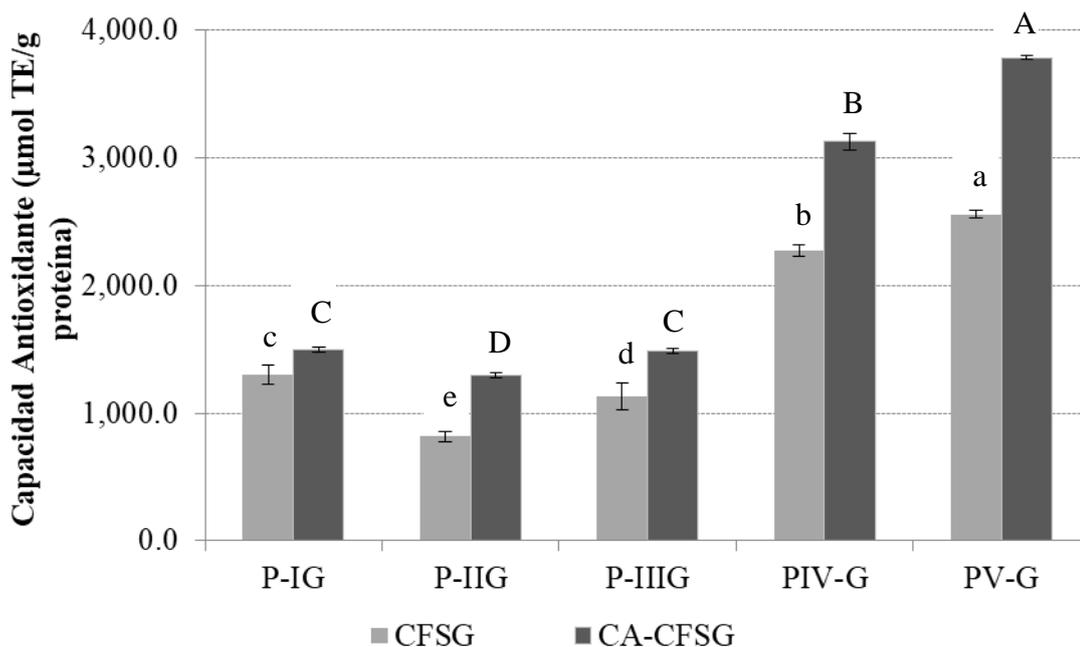
La CFSG es un tipo particular de cromatografía líquido-líquido que se utiliza en la separación de sustancias que poseen peso molecular diferente. Se caracteriza porque las

moléculas se separan de acuerdo con su forma y tamaño (Abbott y Andrews 1970, Voet *et al.* 2009). Sila *et al.* (2016) indican que la CFSG se ha usado para fraccionar péptidos provenientes de hidrolizados proteicos; sin embargo, casi siempre se usan acompañados de otros métodos de separación basados en diferentes principios, tales como: acidez, basicidad, carga, quelación de metales o hidrofobicidad; siendo este último el empleado en la presente investigación, tal como se explicó en el acápite anterior.

De acuerdo al cromatograma de la Figura 9A, se observa que el PI-G representa una cantidad importante de proteínas; mientras que la fracción PI-CA-G en la Figura 9B, una cantidad menor. Dicho pico PI-G estaría conformado por péptidos de peso molecular elevado y de carácter hidrofílico, que no fueron adsorbidos por la resina DA-201C, debido a que no fueron sometidos a CA.

Por otro lado, la Figura 10 muestra la CAO de los picos obtenidos en la CFSG, donde se observa una mayor actividad en aquellos sometidos a una previa CA (CA-G) (Anexo 20). Asimismo, las moléculas con menor peso molecular (PV-G) son las que presentan mayor CAO ( $3,784.85 \pm 17.06$  y  $2,556.24 \pm 30.16$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína, en los picos PV-CA-G y PV-G, respectivamente), presentando diferencia significativa con las demás fracciones (Anexo 21). Estos valores son superiores al obtenido en el PII-CA de la etapa de purificación anterior ( $1,810.06 \pm 95.72$   $\mu\text{mol TE/g}$  proteína), coincidiendo con Najafian y Salam (2015), quienes observaron que la CAO incrementaba cuando los péptidos fueron sometidos a CFSG previa purificación por CII. Por su parte, Mine *et al.* (2010) mencionan que los péptidos que presentan mayor CAO no poseen un grado de conformación mayor al de la secuencia de aminoácidos, es decir, la estructura primaria; debido a que tienden a ser conformados por moléculas de bajo peso molecular.

De acuerdo a Lapsongphon *et al.* (2013), la CAO no solo depende del peso molecular del péptido (a menor peso molecular, mayor CAO), sino también de la composición de aminoácidos, debido a que ésta juega un importante rol, incluso mayor que el peso molecular. Sin embargo, para Zhang *et al.* (2009), el peso molecular es el criterio más importante en un proceso de purificación.

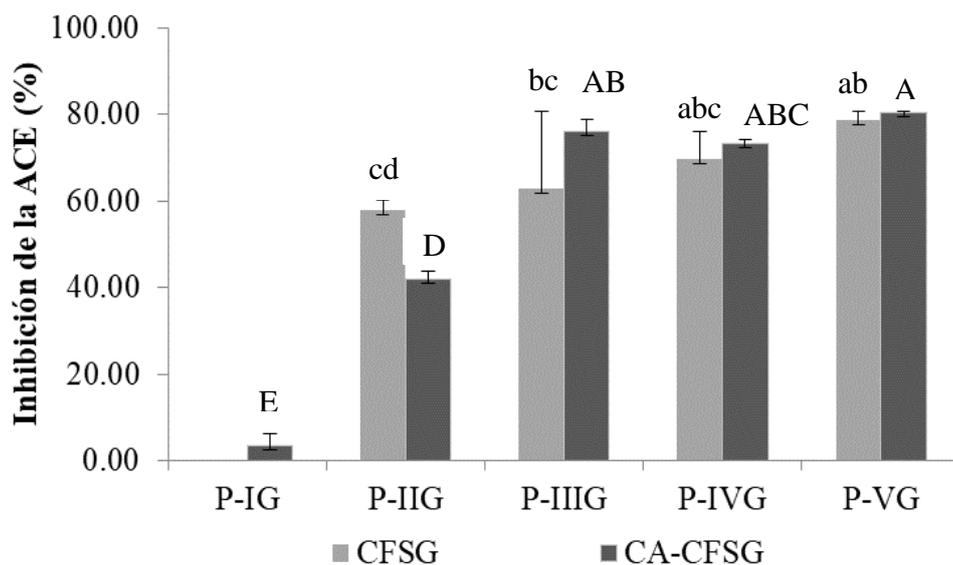


**Figura 10: Capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración sobre gel (CFSG), previa o no cromatografía de adsorción (CA). Dichos picos se muestran en la Figura 9**

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

Por su parte, Najafian y Salam (2015) indican que muchos de los péptidos antioxidantes contienen residuos hidrofóbicos, tales como V o L en la posición N-terminal y P, H, Y, W, M y K en sus secuencias. Entonces, los péptidos con mayor CAO observados en la Figura 10 son de bajo peso molecular y de naturaleza hidrofóbica, debido a que como se recuerda, la separación por CA en la resina DA-201C se basa en la hidrofobicidad presente en los péptidos (Zhong *et al.* 2009). De acuerdo a Mirzaei *et al.* (2015), los péptidos con aminoácidos de naturaleza hidrofóbica son los que tienden a presentar actividad antioxidante y antihipertensiva.

La Figura 11 y el Cuadro 10 muestran el porcentaje de inhibición de la ACE y los valores  $IC_{50}$  en los picos obtenidos por CFSG (con y sin previa CA), respectivamente. Se observa capacidad antihipertensiva en casi todos los picos (Anexo 22); sin embargo, solo algunos la presentan de forma significativa (comparable a la CA), siendo éstos a los que se les determinó el valor  $IC_{50}$  (Anexo 23). Tal como sucedió con la CAO, se observó variabilidad en la capacidad de inhibición de la ACE entre los péptidos sometidos o no a previa CA,



**Figura 11: Inhibición de la ACE de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración sobre gel (CFSG), previa o no cromatografía de adsorción (CA).**

Dichos picos se muestran en la Figura 9

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

**Cuadro 10: Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones separadas por cromatografía de filtración sobre gel, previa o no cromatografía de adsorción (CA)\***

Picos obtenidos	Inhibición de la ACE (%)*		IC <sub>50</sub> ( µg/mL )	
	Sin previa CA	Con previa CA	Sin previa CA	Con previa CA
PI-G	0	3.47 <sup>e</sup> ± 2.66	N.D	N.D
PII-G	57.91 <sup>cd</sup> ± 2.20	41.90 <sup>d</sup> ± 1.82	N.D	N.D
PIII-G	62.77 <sup>bc</sup> ± 17.93	76.02 <sup>ab</sup> ± 2.90	283.1 ± 0.02	154.3 ± 0.04
PIV-G	69.54 <sup>abc</sup> ± 6.46	73.19 <sup>abc</sup> ± 0.98	150.2 ± 0.02	109.6 ± 0.01
PV-G	78.67 <sup>ab</sup> ± 2.04	80.49 <sup>a</sup> ± 0.29	94.2 ± 0.01	39.1 ± 0.01

\*promedio de dos repeticiones ± DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). \*\*A una concentración proteica de 0.5 mg/mL. N.D: No determinado

siendo ésta mayor en los que sí pasaron por dicha etapa previa (Anexo 24), a excepción del

PII-G. Se obtuvo una máxima inhibición de 80,49 por ciento en el pico PV-CA-G, mientras que el pico PV-G obtuvo un 78.67 por ciento. Esta diferencia puede deberse a que la resina DA-201C, la cual fue usada en la CA, no solo separa a los péptidos por hidrofobicidad, sino que también elimina sales que pueden estar presentes en la muestra y podrían causar interferencia en las propiedades bioactivas (Zhong *et al.*, 2009). Además, Zhang *et al.* (2009) mencionan que la ACE tiene una alta afinidad por los sustratos o inhibidores que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos (tales como P, F y Y), por lo cual se puede atribuir a esta característica que los péptidos sometidos a previa CA presenten una mayor capacidad de inhibición de esta enzima.

Se observa en el Cuadro 10 que el menor valor  $IC_{50}$  corresponde al PV-CA-G (39.1  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo éste menor al obtenido en el PII-CA del acápite 4.2.2. Esto demuestra que la capacidad antihipertensiva sigue aumentando conforme se avanza en la purificación, tal como sucede con la CAO. Esta tendencia también se mostró en la investigación de Zhao *et al.* (2009), quienes reportaron una disminución del  $IC_{50}$  al someter péptidos de *Acaudina molpadioidea* a CFSG y CII (en esa secuencia), obteniendo un  $IC_{50}$  final 50  $\mu\text{g/mL}$ , siendo este valor mayor al obtenido en el Cuadro 10. Estos mismos autores obtuvieron un  $IC_{50}$  de 93.4  $\mu\text{g/mL}$  cuando sometieron a los péptidos solo a una CFSG, luego de ultrafiltración. Este resultado es muy similar al observado en el presente trabajo, donde se obtuvo un  $IC_{50}$  de 94.2  $\mu\text{g/mL}$  en el PV-G. Ko *et al.* (2012) obtuvieron un  $IC_{50}$  de 162  $\mu\text{g/mL}$  en *Styela clava*, mientras que Ji-Eun *et al.* (2010), mencionados por Segura *et al.* (2011), uno de 94  $\mu\text{g/mL}$  en péptidos de proteína vegetal texturizada y fermentada sometidos a CFSG, previa ultrafiltración. Por su parte, Du *et al.* (2013) reportaron una disminución del valor  $IC_{50}$ , obteniendo finalmente 165  $\mu\text{g/mL}$  al someter péptidos purificados de un invertebrado marino a CII, CFSG y cromatografía de fase reversa. Asimismo, Wu *et al.* (2016) obtuvieron un  $IC_{50}$  final de 31.6  $\mu\text{g/mL}$  en péptidos de sorgo luego de cuatro pasos de purificación mediante cromatografía. Incluso así, el péptido purificado de quinua (PV-CA-G) presenta una mejor capacidad de inhibición de la ACE por presentar un menor valor de  $IC_{50}$ , luego de la aplicación de solo dos técnicas cromatográficas.

El  $IC_{50}$  de los péptidos derivados de alimentos es 10-100 veces más alto que el del captopril, el cual es 0.3  $\mu\text{M}$ , según Gangopadhyay *et al.* (2016). Sin embargo, si este grupo de péptidos presenta un valor de  $IC_{50}$  en un rango de 100-500  $\mu\text{M}$ , pueden ser importantes desde el punto de vista nutricional y fisiológico, luego de ser administrados oralmente. Ko

*et al.* (2012), indican que la ventaja de usar péptidos derivados de alimentos es que no presentan efectos secundarios como es el caso de los inhibidores químicos. Además, Zhao *et al.* (2009) mencionan que si bien es cierto, la capacidad de inhibir la ACE *in vitro* es menor a la del captopril, cuando se compara con la capacidad de inhibición *in vivo* se puede apreciar solo una pequeña diferencia con el mencionado inhibidor químico, y también permanece más tiempo en el organismo que éste. La razón por la cual los péptidos tienen mayor actividad *in vivo* que *in vitro* se debe a que tienen mayor afinidad por los tejidos en el organismo.

#### 4.3. RELACIÓN ENTRE CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIOXIDANTE

A lo largo de la purificación de péptidos, se ha notado que la mayor CAO y antihipertensiva corresponde a la misma fracción (P3kDa, en el caso de la ultrafiltración) y al mismo pico (en las técnicas cromatográficas). Esto indicaría que son las mismas secuencia peptídica la que presenta ambas propiedades bioactivas. Para poder observar esta situación a mayor detalle, el Cuadro 11 muestra el resumen de la CAO y antihipertensiva a lo largo de la purificación realizada, desde el HQ hasta la CFSG (Anexo 25, Anexo 26).

**Cuadro 11: Resumen del proceso de purificación de péptidos bioactivos**

Fracción	Capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ )*	Inhibición de la ACE (%)**	Valor IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
HQ	1,667.38 <sup>d</sup> $\pm$ 9.55	59.08 <sup>c</sup> $\pm$ 2.71	300.7 $\pm$ 0.01
P3kDa	1,774.32 <sup>c</sup> $\pm$ 5.99	70.10 <sup>b</sup> $\pm$ 1.98	132.0 $\pm$ 0.00
P11-CA	1,810.06 <sup>c</sup> $\pm$ 95.72	60.85 <sup>c</sup> $\pm$ 5.59	117.0 $\pm$ 0.01
PV-G	2,556.24 <sup>b</sup> $\pm$ 30.16	78.67 <sup>a</sup> $\pm$ 2.04	94.2 $\pm$ 0.01
PV-CA-G	3,784.85 <sup>a</sup> $\pm$ 17.06	80.49 <sup>a</sup> $\pm$ 0.29	39.1 $\pm$ 0.01

\*promedio de tres repeticiones  $\pm$  DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ). \*\*A una concentración proteica de 0.5 mg/mL

Por otro lado, la relación entre ambas propiedades se corroboró realizándose una prueba de correlación entre ambas, resultando en un 82.1 por ciento (Anexo 27). Agyei *et al.* (2016)

y Giri y Ohshima (2012) denominan a esta secuencia de péptidos como multifuncionales. Al respecto, Mine *et al.* (2010) mencionaron que, contrariamente a lo que sucede con otros compuestos antioxidantes (vitaminas, carotenoides, flavonoides, etc), los péptidos que presentan dicha capacidad no son capaces de solo estabilizar radicales libres, sino que también tienden a ser multifuncionales, pudiendo ser antihipertensivos y antiinflamatorios. Por su parte, Power *et al.* (2014), encontraron péptidos de trigo que presentaban tanto CAO como antihipertensiva; al igual que Nongonierma *et al.* (2015), quienes reportaron que los péptidos de quinua presentan ambas propiedades.

La multifuncionalidad de los péptidos de quinua reportados en el presente trabajo resultaría importante, debido a que según lo reportado por Marco (2013), la hipertensión arterial puede ser controlada a partir de modificaciones en la dieta, donde se destaca la suplementación con antioxidantes porque promueven la síntesis de óxido nítrico (vasodilatador). Cabe mencionar que los radicales libres inactivan el óxido nítrico, generando la constricción de los vasos sanguíneos. Así, los antioxidantes ayudarían a controlar los radicales libres, mejorando de esta manera la síntesis de óxido nítrico. Además, Puchalska *et al.* (2014) indican que los péptidos que presentan tanto CAO y antihipertensiva son de gran interés, debido a que la producción de angiotensina-II a nivel tisular hace que aumente el estrés oxidativo. El incremento del éste produce disfunción endotelial, lo que origina vasoconstricción y la liberación de noradrenalina (Wagner-Grau 2010).

Por su parte, Camps *et al.* (2010) mencionan que en la hipertensión arterial se ha encontrado un aumento de la peroxidación lipídica (tanto en plasma como en las membranas celulares), así como una cantidad total de lípidos y una disminución de la CAO. Finalmente, Hsu (2010) menciona al respecto que los aminoácidos hidrofóbicos son importantes, justamente, en la inhibición de la peroxidación lipídica, mediante donación de protones. Este autor hace una especial mención a los aminoácidos L, Y, V y M.

Por otro lado, se extrae del Cuadro 11 que la CAO aumenta en 2.27 veces al final del proceso de purificación, siendo este valor similar al obtenido por Najafian y Salam (2015), quienes reportan un incremento de la CAO en 2.20 veces luego de someter péptidos provenientes de *Pangasius sutchi* (pez gato iridiscente) a CFSG. Asimismo, Power *et al.* (2014) lograron incrementarla 1.7 veces, luego del proceso de ultrafiltración. Dicho valor

se encuentra cercano al hallado en los péptidos de quinua de la presente investigación, donde se dio un aumento de 1.06, luego de este proceso.

Por otra parte, observa que el valor  $IC_{50}$  disminuye 7.69 veces desde el HQ hasta el PV-CA-G. Este valor es superior al obtenido por Zhao *et al.* (2007), quienes consiguen un valor 5.93 veces menor, al someter su hidrolizado a ultrafiltración, CII y CFSG, demostrando que los péptidos provenientes de quinua, en la presente investigación, presentan mejor capacidad antihipertensiva. El valor obtenido es también mayor al reportado por Mirzaei *et al.* (2015), quienes hallaron una disminución de 3 veces respecto al valor inicial. Además, Chen *et al.* (2013) lograron reducir el  $IC_{50}$  en 2.71 veces, luego de someter péptidos de arroz a ultrafiltración y CA. Este valor es similar al obtenido en el presente trabajo, donde luego de la ultrafiltración y CA (PII-CA) se observa una disminución del  $IC_{50}$  de 2.57 veces. Finalmente, Power *et al.* (2014) redujeron 3 veces el valor  $IC_{50}$  luego de la ultrafiltración de los péptidos de trigo. Este valor es similar al obtenido en quinua, donde se reduce 2.27 veces dicho valor, luego del proceso de ultrafiltración con *cut off* 3 kDa.

## V. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron péptidos de quinua por medio de hidrólisis enzimática. Dichos péptidos fueron sometidos a un proceso de purificación en etapas mediante ultrafiltración (membranas de *cut off* 10 y 3 kDa) y técnicas cromatográficas (adsorción y filtración sobre gel), evaluándose la capacidad antioxidante y antihipertensiva en cada una de éstas.
- En la ultrafiltración, se obtuvo una mayor capacidad antioxidante y antihipertensiva en el permeado obtenido con la membrana de *cut off* 3 kDa, comparado con la membrana de *cut off* 10 kDa y el hidrolizado inicial de quinua. Dicho permeado fue sometido a cromatografía de filtración sobre gel, previa o no cromatografía de adsorción.
- En la cromatografía de adsorción, se usó la resina DA-201 C, obteniéndose la mayor capacidad antioxidante y antihipertensiva en los péptidos eluidos con una solución al 25 por ciento de etanol. Dicho valor fue mayor al correspondiente al permeado de la membrana de *cut off* 3 kDa, resultante de la ultrafiltración, por lo que fue el elegido para continuar con la purificación.
- En la cromatografía de filtración sobre gel, se utilizó el gel Biogel P-2, alcanzándose una mayor capacidad antioxidante y antihipertensiva en los péptidos de menor peso molecular que fueron sometidos previamente a cromatografía de adsorción, con respecto a aquellos que fueron evaluados directamente desde el permeado de *cut off* 3 kDa.
- La capacidad antioxidante y antihipertensiva aumentó en 2.3 y 7.7 veces, respectivamente, desde el hidrolizado inicial de quinua hasta la fracción con menor peso molecular obtenida por cromatografía de filtración sobre gel, previa cromatografía de adsorción.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la estabilidad de los péptidos bioactivos purificados frente a condiciones de digestión, usando la prueba de digestibilidad *in vitro*.
- Determinar el peso molecular de la fracción purificada mediante electroforesis.
- Evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de los péptidos bioactivos purificados, mediante células humanas de colon Caco-2.
- Determinar la secuencia de péptidos involucrados en la capacidad antioxidante y antihipertensiva, mediante espectrometría de masa.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D; Andrews, R. 1970. An introduction to chromatography. Madrid, España, Alhambra. s.p.
- Abugoch James, L. 2009. Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Advances in Food and Nutrition Research 2009:1-31.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27(6):1256-1262.
- Agyei, D; Ongkudon, C; Wei, C; Chan, A; Danquah, M. 2016. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. Food and Bioprocess Processing 98:244-256.
- Ajibola, C; Fashakin, J; Fagbemi, T; Aluko, R. 2013. Renin and angiotensin converting enzyme inhibition with antioxidant properties of African yam bean protein hydrolysate and reverse-phase HPLC-separated peptide fractions. Food Research International 52(2):437-444.
- Aluko, R; Monu, E. 2003. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. Journal of Food Science 68(4):1254-1258.
- AOAC. 1995. The Association of Analytical Chemists: Official methods of analysis. Quinceava edición. Washington D.C, EE.UU. 1298p.
- Aranceta Bartrina, J; Gil, A. 2010. Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Madrid, España, Médica Panamericana. s.p.

- Arroume, N; Froidevaux, R; Kapel, R; Cudennec, B; Ravallec, R; Flahaut, C; Bazinet, L; Jacques, P; Dhulster, P. 2016. Food peptides: purification, identification and role in the metabolism. *Current Opinion in Food Science* 7:101-107.
- Asao, M; Watanabe, K. 2010. Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. *Food Science and Technology Research* 16(2):163-168.
- Badui, S. 2006. *Química de los Alimentos*. Cuarta edición. México DF, México, Pearson Educación. s.p.
- Barbana, C; Boye, J. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry* 127(1):94-101.
- Benitez, R; Ibarz, A; Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 42(2): 5-13
- Brinegar, C; Goundan, S. 1993. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:182-185.
- Camps, D; Ruffino, S; Majul, E; Joison, A. 2010. *Bioquímica del estrés oxidativo y de las especies reactivas del oxígeno*. Primera edición. Córdoba, Argentina, Lulú.
- Català-Clariana, S; Benavente, F; Giménez, E; Barbosa, J; Sanz, V. 2010. Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 683:119-125.
- Chale, F; Ruiz, J; Fernández, J; Ancona, D; Campos, M. 2014. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Macuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry* 49:1691-1698.

- Chen, J; Wang, Y; Zhong, Q; Wu, Y; Xia, W. 2012. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides* 33:52-58.
- Chen, J; Liu, S; Ye, R; Cai, G; Wu, Y. 2013. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of Functional Foods* 5:1684-1692.
- Cian, R; Garzón, A; Ancona, D; Guerrero, L; Drago, S. 2015. Hydrolysates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *Food Science and Technology* 64 (2):881-888.
- Connolly, A; O'keeffe, M; Piggott, C; Nongonierma, A; Fitzgerald, R. 2014. Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate. *Food Chemistry* 176(1): 64-71.
- Couch S; Krummel, D. 2008. *Krause Dietoterapia*. Doceava edición. Barcelona, España, Elsevier Masson. s.p.
- Cui, Z. 2005. Protein separation using ultrafiltration: An example of multi-scale complex systems. *China Particuology* 3(6):343-348.
- Damrongsakkul, S; Ratanathampan, K; Komolpis, K; Tanthapanichakoon, W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 14:202-206.
- Domínguez, M. 2009. Aislamiento de biopéptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina-I a partir de hidrolizados de *P. lunatus*. Tesis Ph.D. México D.F, México, Instituto Politécnico Nacional. s.p
- Du, L; Fang, M; Wu, H; Xie, J; Wu, Y; Li, P; Zhang, D; Huang, Z; Xia, Y; Zhou, L; Wei, D. 2013. A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from

*Phascolosoma esculenta* water-soluble protein hydrolysate. Journal of Functional Foods 5:465-483

Erdmann, K; Cheung, B; Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. Journal of Nutritional Biochemistry 19:643-654

Escudero, E. 2012. Estudios de pequeños péptidos (<1500 Da) con actividad antihipertensiva y antioxidante generados en el jamón curado. Tesis Ph.D. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. s.p

Escuredo, O; Inmaculada, M; Wells, G; Fischer, S; Hernández, J. 2014. Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. Journal of Cereal Science 60(1):1-8.

Food and Agriculture Organization (FAO); World Health Organization (WHO); United Nations University (UNU). 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition: WHO Technical Report Series. Suiza, FAO Food and Nutrition Paper. s.p

Fritz, M; Vecchi, B; Rinaldi, G; Añón, M. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. Journal of Food Chemistry 126(3):878-884.

Galanakis, C. 2014. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. A Review: Food Science and Technology 20:1-20

Gandarillas, H. 1979. Genética y origen de la quinua. Bogotá, Colombia, IICA. s.p

Gangopadhyay, N; Wynne, K; O'connor, P; Gallagher, E; Brunton, N; Rai, D; Hayes, M. 2016. *In silico* and *in vitro* analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates. Food Chemistry 203:367-374.

- García, M; Puchalska, P; Esteve, C; Marina, M. 2013. Vegetables foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta* 106:328-349.
- Giri, A; Ohshima, T. 2012. Bioactive marine peptides: Nutraceutical value and novel approaches. *Advances in Food and Nutrition Research* 65:1000-1043
- Gomes, A; Cardoso, C; Manólio, S. 2016. *Encyclopedia of Food and Health: Amaranth*. USA, Elsevier. s.p
- González-García, E. Puchalska, P; Marina, M; García, M. 2015. Fractionation and identification of antioxidant and angiotensin-converting- enzyme-inhibitory peptides obtained from plum (*Prunus domestica* L.) stones. *Journal of Functional Foods* 19:376-384.
- Gross, R; Koch, F; Malaga, I; Miranda, A; Schoeneberger, H; Trugo, L. 1989. Chemical Composition and Protein Quality of Some Local Andean Food Sources. *Food Chemistry* 34:25-34.
- Guerrero- Ochoa, M; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Science & Technology* 50(8):1815-1822.
- Hager, A; Wolter A., Jacob, F; Zannini, E; Arendt, E. 2012. Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours. *Journal of Cereal Science* 56:239-247.
- Halim, N; Yusof, H; Sarbon, N. 2016. Functional and Bioactive Properties of Fish Protein Hydrolysates and Peptides: A Comprehensive Review. *Trends in Food Science & Technology* 51:24-33.
- Harris, D. 2007. *Análisis químico cuantitativo*. Tercera edición. Barcelona, España, Reverté. s.p

- Harscoat, C; Raminosa, F; Ronat, E; Vanderesse, R; Marc, I. 2010. Modelling the separation of small peptides by cation-exchange chromatography. *Journal of Separation Science* 33:2447-2457.
- Hartman, R; Meisel, H. 2007. Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18:163–169.
- He, R; Girgih, A; Malomo, S; Ju, X; Aluko, R. 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods* 5:219-227.
- Hernández, R; Sastre, A. 1999. *Tratado de nutrición*. Madrid, España, Díaz de Santos. s.p.
- Hostettmann, K; Marston, A; Hostettmann, M. 1998. *Técnicas de cromatografía preparativa: Aplicaciones en el Aislamiento de productos naturales*. Segunda edición. Barcelona, España, Springer. s.p
- Hsu, K. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry* 122:42-48.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). 2014. Exportaciones de productos agropecuarios (en línea). La Paz, Bolivia. Consultado 18 may. 2016. Disponible en <http://www.ine.gob.bo/indice/general.aspx?codigo=50101>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2014. Volumen exportado de quinua creció 71.0 % (en línea). Lima, Perú. Consultado 16 nov. 2015. Disponible en <http://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/volumen-exportado-de-quinua-crecio-710-7455/>.
- Intarasirisawant, R; Benjakul, S; Visessanguan, W; Wu, J. 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry* 135:3039-3048.

- Jang, H; Liceaga, A; Young, K. 2016. Purification, characterization and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 20:433-442.
- Je, J; Qian, Z; Byun, H; Kim, S. 2007. Purification and characterization of an antioxidative peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 42:840-846.
- Kammoun, R; Ellouz, B. 2003. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrase. *Bioresource Technology* 90:249-254.
- Ko, S; Lee, J; Byun, H; Lee, S; Jeon, Y. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochemistry* 47:34-40.
- Korhonen, H; Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16:945-960.
- Lafarga, T; Aluko, R; Rai, D; O'connor, P; Hayes, M. 2016. Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International* 81:91-99.
- Lapsongphon, N; Yongsawatdigul, J. 2013. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. *Food Chemistry* 141:992-999.
- Lederer, E; Lederer, M. 1960. *Cromatografía: Revisión de sus principios y aplicaciones*. Segunda edición. París, Francia, Elsevier Publishing Company. s.p
- Lowry, O; Rosebough, N; Lewistarr, Y; Randall, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemical* 193:265 – 275.
- Marco, A. 2013. *Medicina Ortomolecular*. Alicante, España, Club Universitario. s.p

- Mestres, M; Duran, M. 2012. Farmacología en Nutrición. Madrid, España, Médica Panamericana. s.p
- Mine, Y ; Li-Chan, E ; Jiang, B. 2010. Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals. Iowa, USA, Blackwell Publishing. s.p
- Mirzaei, M; Mirdamadi, S; Reza, M; Aminlari, M; Hosseini, E. 2015. Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate. Journal of Functional Foods 19:259-268.
- Mora, L; Aristoy, M; Toldrá, F. 2016. Encyclopedia of Food and Health. USA, Elsevier. s.p
- Mulero, J; Zafrilla, P; Martínez, A; Leal, M; Abellán, J. 2011. Péptidos bioactivos. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis 23(5):219-227.
- Najafian, L; Salam, B; A. 2015. Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (*Pangasius stuchi*) myofibrillar protein hydrolysates. Food Science and Technology 60:452-461.
- Nongonierma, A; Le, M; 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.
- Power, O; Fernández, A; Norris, R; Riera, F; Fitzgerald, R. 2014. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of  $\beta$ -lactoglobulin. Journal of Functional Foods 9:38-47.
- Prior, R; Hoang, H; Gu, L; Wu, X; Bacchiocca, M; Howard, L; Hampsch, M; Huang, D; Ou, B; Jacob, R. 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (ORAC) of Plasma and Other Biological and Food Samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(11):3273-3279.

- Puchalska, P; García, M; Marina, M. 2014. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in commercial soybean based infant formulas using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chemistry* 157:62-69.
- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical and Biological Medicine* 26:1231–1237.
- Repo-Carrasco, R. 1992. Andean Crops and Infant Nourishment. Report B-25 Institute of Development Studies. Helsinki, Finland.
- Reyes, E. 2006. Componente nutricional de diferentes variedades de quinua de la región andina. *Avances Investigación en Ingeniería* 5:86-97.
- Ruiz, J; Dávila, G; Chel, L; Betancur, A. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and Antioxidant peptide fractions from hard-to-cook Bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry* 37(1):26-35.
- Samaranayaka, A ; Li-Chan, E. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods* 3:229-254.
- Sanlidere, A; Öner, Z. 2011. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science* 94:5305-5314.
- Sarmadi, B; Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31:1949-1956.
- Segura, C; Chel, A; Betancur, D. 2010. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:2512-2518.

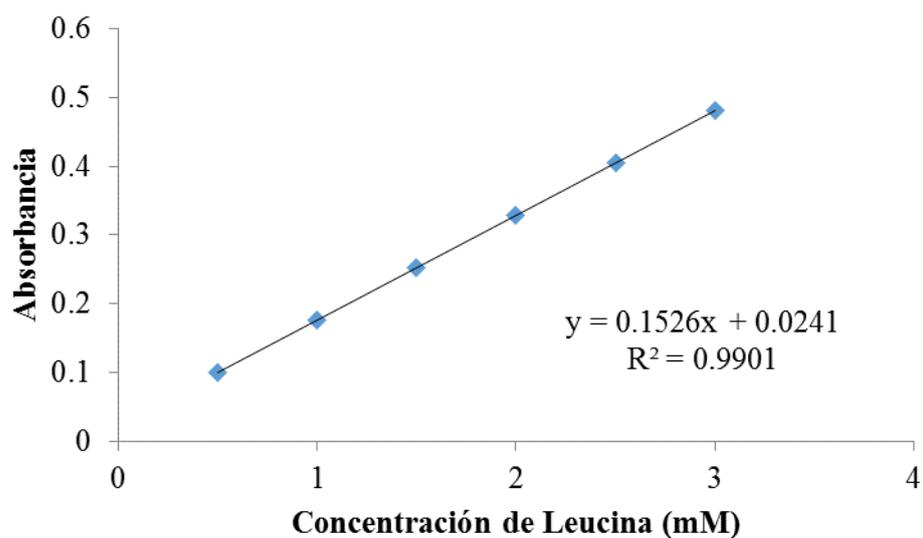
- Segura, M; Chel, L; Betancur, D. 2011. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry* 46:864-872.
- Shi, X; Tal, G; Hankins, N; Gitis, V. 2014. Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. *Journal of Water Process Engineering* 1:121-138.
- Sila, A; Bougatef, A. 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods* 21:10-26.
- Skoog, D; Holler, J; Crouch, S. 2008. *Principios de Análisis Instrumental*. Sexta edición. México, CENGAGE Learning. s.p
- Soares De Castro, R; Sato, H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification, identification, and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74:185-198.
- Snyder, L. 1968. *Principles of Adsorption Chromatography: The separation of Noionic Organic Compounds*. New York, USA, Marcel Dekker.
- Tavares, T; Malcata, F. 2016. *Encyclopedia of Food and Health: Whey, whey powders and Fermentation of Whey*. USA, Elsevier. s.p
- Torruco, J; Chel, L; Martínez, A; Dávila, G; Betancur, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Science and Technology* 42:1597-1604.
- Tsagaraki, V; Lazarides, N. 2011. Fouling analysis and performance of tubular ultrafiltration on pretreated olive mil wastewater. *Food and Bioprocess Technology* 5:584-592.

- Udenigwe, C; Aluko, E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science* 71(1):11-24.
- Valencia-Chamorro, S. 2016. Encyclopedia of Food Grains: Quinoa, Overview. Second Edition. Gran Bretaña, Elsevier. s.p
- Varli, S; Sanlier, N. 2016. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Cereal Science* 69:371-376.
- Vermeirssen, V; Camp, J; Verstraete, W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition* 92:357-366.
- Vermeirssen, V; Camp, J; Verstraete, W. 2005. Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:399-405.
- Vioque, J; Sánchez V; Clemente, A; Pedroche, J; Yust, M; Millán, F. 2000. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites* 51(5):361-365.
- Voet, D; Voet, J; Pratt, C. 2009. Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular. Segunda edición. Buenos Aires, Argentina, Médica Panamericana. s.p
- Wagner-Grau, P. 2010. Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina* 71:225-229.
- Wrolstad, R; Acree, T; Decker, E; Penner, M; Schwartz, S; Shoemaker, C; Smith, D; Sporns, P. 2005. Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates. Canada, Wiley-Interscience. s.p
- Wu, J; Aluko, R; Muir, A. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 15:125-130.

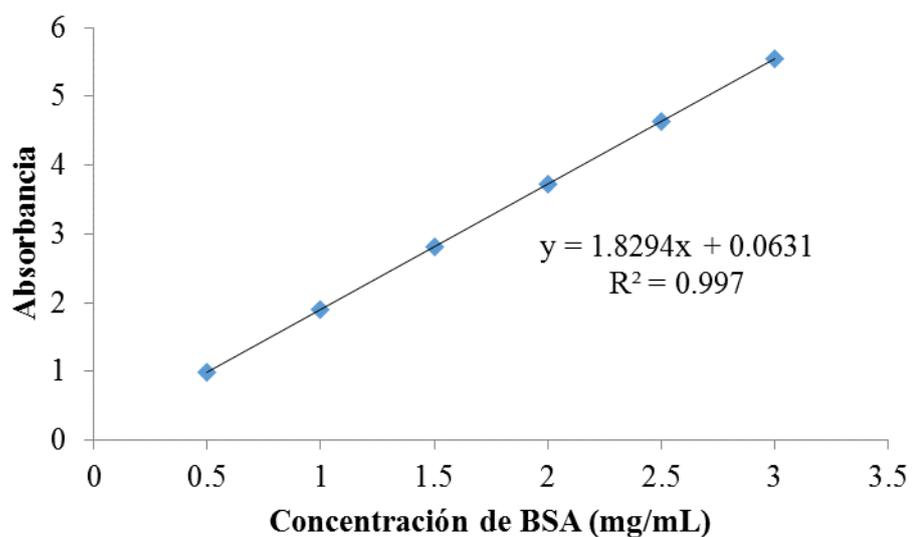
- Wu, Q; Du, J; Jia, J; Kuang, C. 2016. Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: Hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study. *Food Chemistry* 199:140-149.
- You, L; Zhao, M; Regenstein, J; Ren, J. 2010. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International* 43:1167-1173.
- Zhang, F; Wang, Z; Xu, S. 2009. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory. *Food Chemistry* 117:387-392.
- Zhao, Y; Li, B; Liu, Z; Dong, S; Zhao, X; Zeng, M. 2007. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry* 42:1586-1591.
- Zhao, Y; Li, B; Dong, S; Zhao, X; Liu, Z; Zeng, M; Wang, J. 2009. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides* 30:1028-1033.
- Zhao, L; Wang, X; Zhang, X; Xie, Q. 2016. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus* Linnaeus). *Journal of Food and Drug Analysis* 30:1-9.
- Zheng, L; Zhao, M; Xiao, C; Zhao, Q; Su, G. 2016. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry* 192:288-294.
- Zhong, F; Zhang, X; Ma, J; Shoemaker, C. 2009. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Research International* 40:756-762

## VIII. ANEXOS

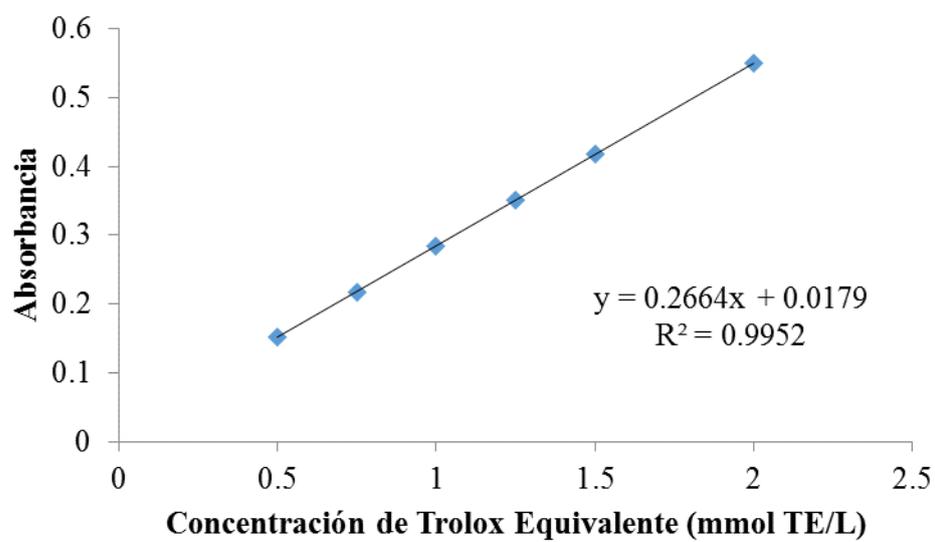
### ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE LEUCINA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRADO DE HIDRÓLISIS



### ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE



### ANEXO 3: CURVA ESTÁNDAR DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS



## ANEXO 4: FICHA TÉCNICA DE LA RESINA DA-201C

**JIANGSU SUQING WATER TREATMENT  
ENGINEERING GROUP CO., LTD.  
DA201-C ADSORBENT RESIN**

**1. Applicable Standard of Product: Q/320221 、 NAN05-90**

**2. Indexes of Physical and Chemical Properties:**

<b>Designation</b>	<b>DA201-C</b>
Water Retention %	50-55
Special Density g/ml	1.07-1.13
Bulk Density g/ml	0.72-0.78
Particle Size %	(0.4-1.25mm)≥95
Surface Area m <sup>2</sup> /g	900-1100
Average Pore Size A°	35-45
Pore Volume ml/g	1.0-1.1
Appearance	Reddish brown opaque spherical
Polarity	Non-polarity

**3. Reference Indexes for Operation:**

3.1 pH Range: 4-10

3.2 Max. Operating Temp (°C): ≤45°C

3.3 Concentration of Regenerate Solution %:

NaOH 1% +NaCl 5-10% ; Propanone or methanol 5-10%

3.4 Consumption of Regenerate: 40-60kg/m<sup>3</sup>

3.5 Flow Rate of Regenerate Solution: 4-6(m/hr)

3.6 Operating Flow Rate: 3-15(m/hr)

**4. Application:**

Mainly used for adsorption of phenol and other organic substances, decolorization, etc.

**5. Packing:**

Each PE lined with plastic bag, net weight: 25 L

## ANEXO 5: FICHA TÉCNICA DE GEL BIOGEL P-2

### Bio-Gel® Resins

#### At a Glance

Bio-Gel Size Exclusion Resins are engineered for gentle, high-resolution separation of sensitive compounds in aqueous or organic solutions. They are available in various mesh sizes to accommodate a wide range of applications. They can be stored at ambient temperatures and are available in various sizes to aid multiple scales of purification.

#### Bio-Gel P Technical Specifications

	Hydrated Bead Size, $\mu\text{m}$	Hydrated Bed Volume Mass Dry Gel, ml/g	Typical Flow Rate, cm/hr*	Molecular Weight Fractionation Range
Bio-Gel P-2, fine	45–90	3	5–10	100–1,800
Bio-Gel P-2, extra fine	<45		<10	
Bio-Gel P-4, medium	90–180	4	15–20	800–4,000
Bio-Gel P-4, fine	45–90		10–15	
Bio-Gel P-4, extra fine	<45		<10	
Bio-Gel P-6, medium	90–180	6.5	15–20	1,000–6,000
Bio-Gel P-6, fine	45–90		10–15	
Bio-Gel P-6, extra fine	<45		<10	
Bio-Gel P-6DG Gel	90–180		15–20	
Bio-Gel P-10 Gel, medium	90–180	7.5	15–20	1,500–20,000
Bio-Gel P-10 Gel, fine	45–90		10–15	
Bio-Gel P-30 Gel, medium	90–180	9	7–13	2,400–40,000
Bio-Gel P-30 Gel, fine	45–90		6–11	
Bio-Gel P-60 Gel, medium	90–180	11	4–6	3,000–60,000
Bio-Gel P-60 Gel, fine	45–90		3–5	
Bio-Gel P-100 Gel, medium	90–180	12	4–6	5,000–100,000
Bio-Gel P-100 Gel, fine	45–90		3–5	

\* Flow rates determined in a 1.5 x 70 cm column using hydrostatic pressure head-to-bed ratio of 1:1

#### Bio-Gel P Polyacrylamide Gel

##### Features

- Prepared by copolymerization of acrylamide and *N,N'*-methylenebisacrylamide
- Chromatography type: size exclusion chromatography (SEC)
- Available in several particle size ranges with molecular weight exclusion limits ranging from 100 to 100,000 daltons
- Extremely hydrophilic and essentially nonionic
- Do not support microbial growth or leach carbohydrates (due to their synthetic composition), as dextrose and agarose gels can
- Autoclavable at pH 5.5–6.5 and operate over a pH range of 2–10
- Flow rate and resolution increase with increasing temperature in the range of 4–80°C

##### Applications

- Purification of nucleotides, peptides, and tannins

**ANEXO 6: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS EN EL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA (CPQ) Y EL HIDROLIZADO DE QUINUA (HQ)**

<b>Análisis</b>		<b>CPQ</b>	<b>HQ</b>
Grado de Hidrólisis (%)	R1	ND	30
	R2	ND	22
	R3	ND	25
Capacidad Antioxidante (µmol TE/g proteína)	R1	1,320.21	1,657.83
	R2	1,386.94	1,676.93
	R3	1,353.58	1,667.38
Inhibición de la ACE* (%)	R1	ND	57.2
	R2	ND	61.0
Valor IC <sub>50</sub> ( µg/mL )	R1	ND	309.6
	R2	ND	291.8

\*ACE= Enzima convertidora de Angiotensina. Inhibición realizada a 0.5 mg/mL de concentración proteica. ND: No detectado

**ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ( $\mu\text{MOL TE/G PROTEÍNA}$ ) ABTS PARA EL CONCENTRADO PROTEICO DE QUINUA Y EL HIDROLIZADO DE QUINUA\***

**Prueba de Kruskal-Wallis**

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
CPQ	3	2.0
HQ	3	5.0

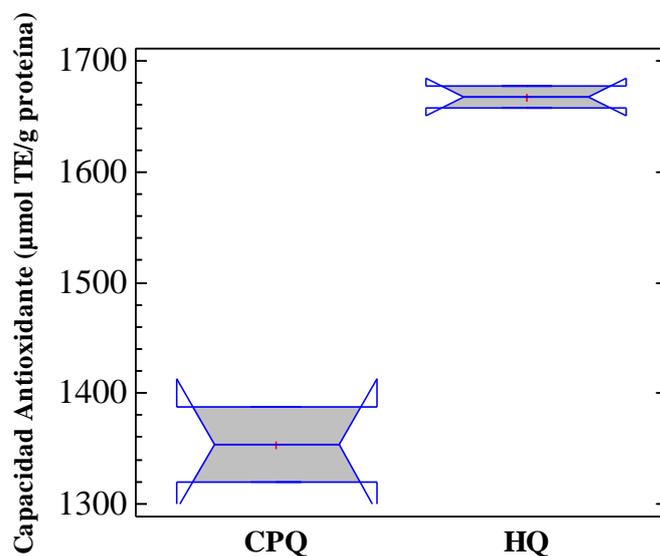
Estadístico = 3.85714 Valor-P = 0.0495311

**Pruebas de Múltiple Rangos para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CPQ	3	1353.58	X
HQ	3	1667.38	X

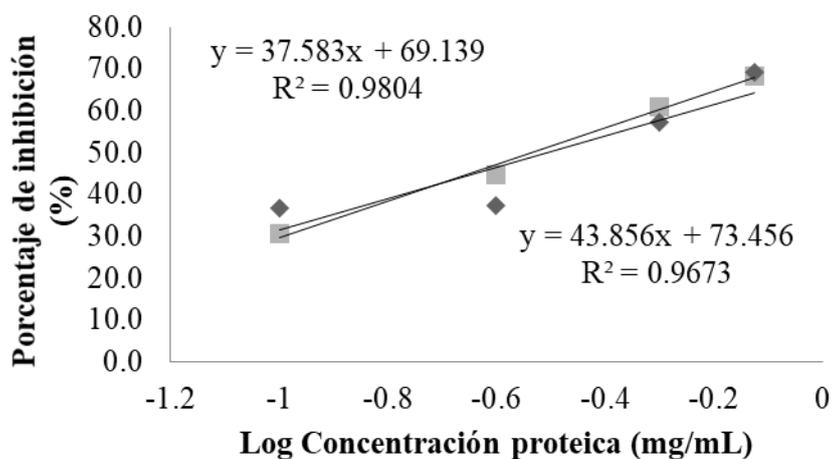
**Gráfico de Cajas y Bigote**



\* CPQ = Concentrado Proteico de Quinoa

HQ = Hidrolizado de quinoa

## ANEXO 8: CÁLCULO DE VALOR IC<sub>50</sub> DEL HIDROLIZADO DE QUINUA



## ANEXO 9: DISTRIBUCIÓN DE PÉPTIDOS DEL HIDROLIZADO DE QUINUA EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR ULTRAFILTRACIÓN

Muestra*	Cantidad de proteína (mg)	Distribución (%)	
HQ	R1	1,883.63	-
	R2	1,888.88	-
	R3	1,886.26	-
F-I	R1	217.99	12
	R2	217.99	12
	R3	215.15	11
F-II	R1	457.58	24
	R2	457.58	24
	R3	457.01	24
F-III	R1	899.81	48
	R2	879.92	47
	R3	852.37	45

- \* HQ = Hidrolizado de quinua  
 F-I = Moléculas con peso molecular mayor a 10 kDa  
 F-II = Moléculas con peso molecular entre 3-10 kDa  
 F-III = Moléculas con peso molecular menor a 3 kDa

**ANEXO 10: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LAS FRACCIONES  
SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN**

<b>Muestra*</b>		<b>CAO (<math>\mu\text{mol TE/g proteína}</math>)</b>
F-I	R1	1,571.94
	R2	1,527.17
	R3	1,549.55
F-II	R1	1,719.62
	R2	1,711.09
	R3	1,715.35
F-III	R1	1,780.31
	R2	1,768.33
	R3	1,774.32

- \* HQ = Hidrolizado de quinua  
 F-I = Moléculas con peso molecular mayor a 10 kDa  
 F-II = Moléculas con peso molecular entre 3-10 kDa  
 F-III = Moléculas con peso molecular menor a 3 kDa

## ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR ULTRAFILTRACIÓN

### Prueba de Kruskal-Wallis

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
F I	3	2.0
F II	3	8.0
F III	3	11.0
HQ	3	5.0

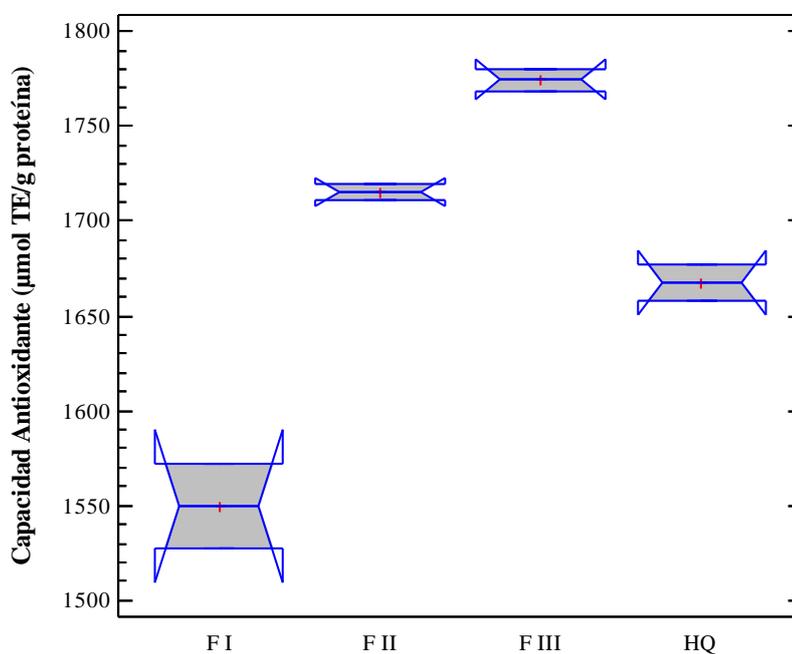
Estadístico = 10.3846 Valor-P = 0.0155638

### Pruebas de Múltiple Rangos para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra*	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F I	3	1,549.55	X
HQ	3	1,667.38	X
F II	3	1,715.35	X
F III	3	1,774.32	X

### Gráfico de Cajas y Bigote



- \* HQ = Hidrolizado de quinua
- F-I = Moléculas con peso molecular mayor a 10 kDa
- F-II = Moléculas con peso molecular entre 3-10 kDa
- F-III = Moléculas con peso molecular menor a 3 kDa

## ANEXO 12: INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE) Y VALOR IC<sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN

Muestra*		Inhibición de la ACE (%)	Valor IC <sub>50</sub> (µg/mL)
P10kDa	R1	57.1	134.4
	R2	60.7	253.7
P3kDa	R1	71.5	133.0
	R2	68.7	131.0

## ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE) EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR ULTRAFILTRACIÓN

Tabla ANOVA para la Inhibición de la ACE (%)

Fuente	Suma de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	164.32	2	82.16	13.99	0.0301
Intra grupos	17.62	3	5.87333		
Total (Corr.)	181.94	5			

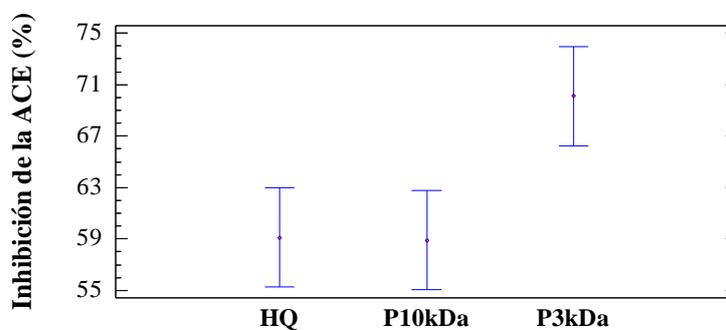
### Pruebas de Múltiple Rangos para la Inhibición de la ACE (%)

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra*	Casos	Medi	Grupos Homogéneos
P10kDa	2	58.9	X
HQ	2	59.1	X
P3kDa	2	70.1	X

### Gráfico de Medias

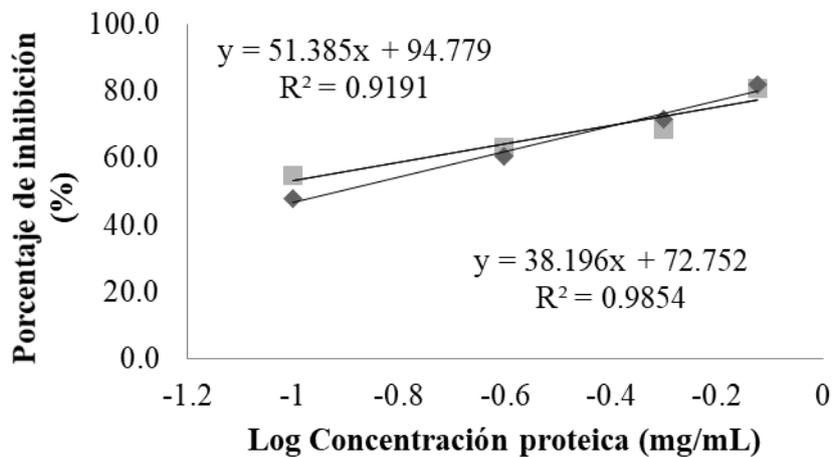
Medias y 95.0 % de Fisher LSD



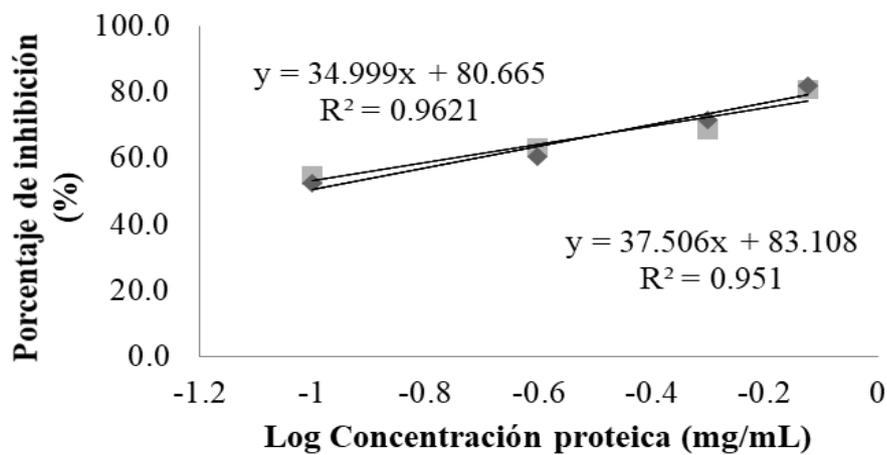
- \* P10kDa = Permeado obtenido en la UF de 10 kDa
- P3kDa = Permeado obtenido en la UF de 3 kDa
- HQ = Hidrolizado de Quinoa

## ANEXO 14: CÁLCULO DE VALOR IC<sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SOMETIDAS A ULTRAFILTRACIÓN

Valores IC<sub>50</sub> en el permeado obtenido en el *cut off* de 10 kDa (P10kDa)



Valores IC<sub>50</sub> en el permeado obtenido en el *cut off* de 3 kDa (P3kDa)



**ANEXO 15: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LOS PICOS  
OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

<b>Muestra*</b>		<b>CAO (<math>\mu\text{mol TE/g proteína}</math>)</b>
PI-CA	R1	1,083.71
	R2	1,061.19
	R3	1,072.45
PII-CA	R1	1,905.78
	R2	1,714.34
	R3	1,810.06
PIII-CA	R1	1,714.34
	R2	1,725.60
	R3	1,719.97
PIV-CA	R1	700.83
	R2	712.09
	R3	706.46

\* PI - CA =Primer pico eluido

PII - CA =Segundo pico eluido

PIII - CA =Tercer pico eluido

PIV - CA =Cuarto pico eluido

## ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

### Prueba de Kruskal-Wallis

	Tamaño de	Rango Promedio
P I	3	5.0
P II	3	10.1667
P III	3	8.83333
P IV	3	2.0

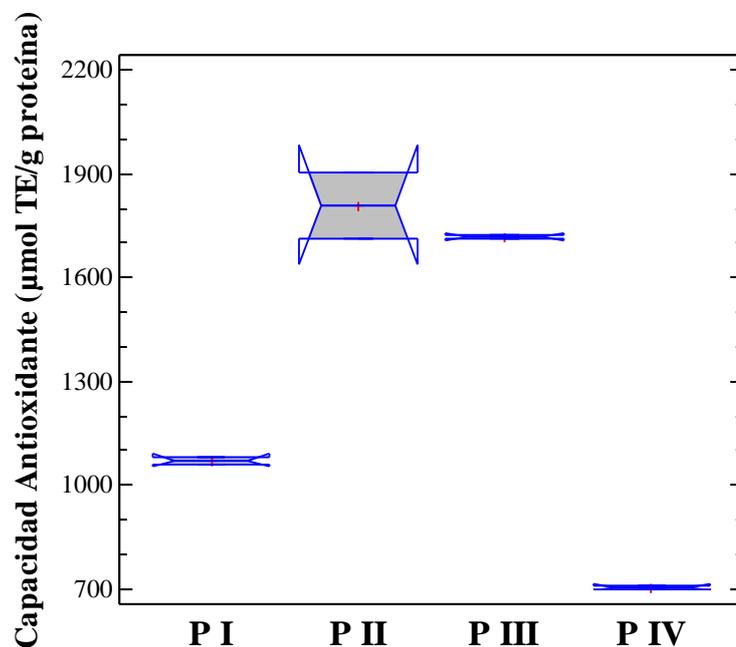
Estadístico = 9.5848 Valor-P = 0.0224454

### Pruebas de Múltiple Rangos para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P IV	3	706.46	X
P I	3	1,072.45	X
P III	3	1,719.97	X
P II	3	1,810.06	X

### Gráfico de Cajas y Bigote



- \* P I = Primer pico eluido
- P II = Segundo pico eluido
- P III = Tercer pico eluido
- P IV = Cuarto pico eluido

**ANEXO 17: INHIBICIÓN DE LA ACE Y VALOR IC<sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

Muestra*		Inhibición de la ACE (%)	Valor IC <sub>50</sub> (µg/mL)
PI-CA	R1	21.5	ND
	R2	16.1	ND
PII-CA	R1	64.8	123.0
	R2	56.9	111.0
PIII-CA	R1	72.4	109.0
	R2	68.6	85.4

\* PI - CA =Primer pico eluido

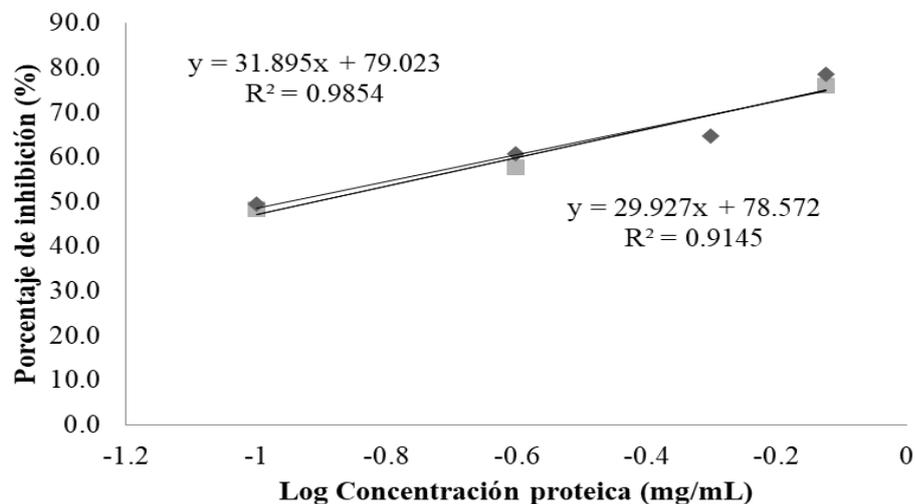
PII - CA =Segundo pico eluido

PIII - CA =Tercer pico eluido

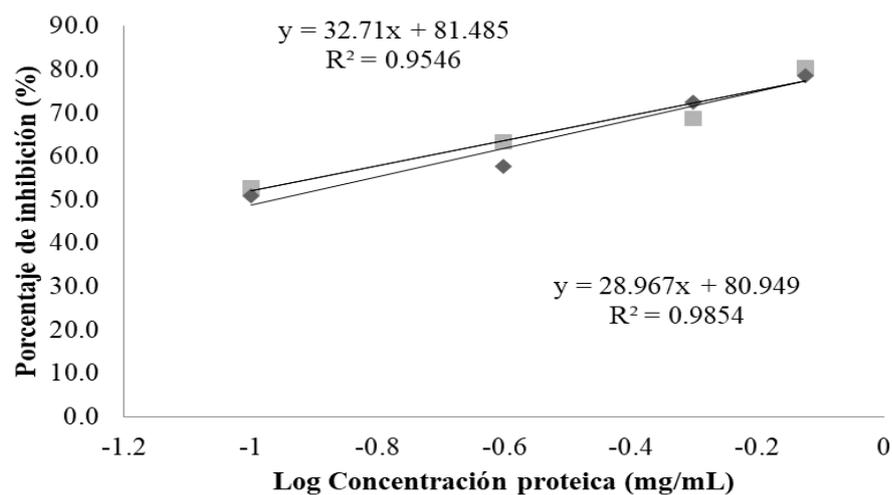
ND : No detectado

## ANEXO 18: CÁLCULO DEL VALOR IC<sub>50</sub> DE LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRFÍA DE ADSORCIÓN

### Valores IC<sub>50</sub> en la fracción PII-CA obtenida por cromatografía de adsorción



### Valores IC<sub>50</sub> en la fracción PIII-CA obtenida por cromatografía de adsorción



## ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE ACE EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

**Tabla ANOVA para la Inhibición de la ACE (%)**

Fuente	Suma de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3022.81	2	1511.4	85.54	0.0023
Intra grupos	53.005	3	17.6683		
Total (Corr.)	3075.81	5			

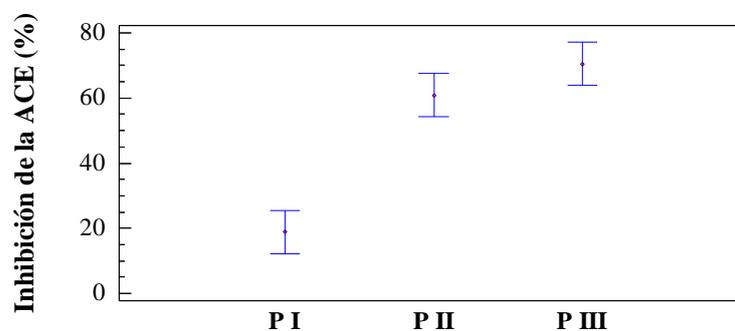
### Pruebas de Múltiple Rangos para la Inhibición de la ACE (%)

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra	Casos	Medi	Grupos Homogéneos
P I	2	18.8	X
P II	2	60.85	X
P III	2	70.5	X

### Gráfico de Medias

Medias y 95.0 % de Fisher LSD



**ANEXO 20: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

Muestra*		CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ )	
		Sin previa CA	Con previa CA
PI-G	R1	1,373.20	1,517.78
	R2	1,224.73	1,474.05
	R3	1,298.97	1,495.91
PII-G	R1	859.16	1,313.81
	R2	775.12	1,280.76
	R3	817.14	1,297.29
PIII-G	R1	1,240.17	1,510.29
	R2	1,025.55	1,468.11
	R3	1,132.86	1,489.20
PIV-G	R1	2,322.45	3,192.58
	R2	2,232.36	3,056.36
	R3	2,277.40	3,124.47
PV-G	R1	2,586.40	3,801.91
	R2	2,526.08	3,767.78
	R3	2,556.24	3,784.85

- \* PI-G = Primer pico eluido
- PII-G = Segundo pico eluido
- PIII-G = Tercer pico eluido
- PIV-G = Cuarto pico eluido
- PV-G = Quinto pico eluido

## ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) ABTS EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

### Prueba de Kruskal-Wallis

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
P IG	3	16.0
P IIG	3	9.33333
P IIIG	3	15.0
P IVG	3	26.0
P VG	3	29.0
PG I	3	9.33333
PG II	3	2.0
PG III	3	5.33333
PG IV	3	20.0
PG V	3	23.0

Estadístico = 28.3032 Valor-P = 0.000848688

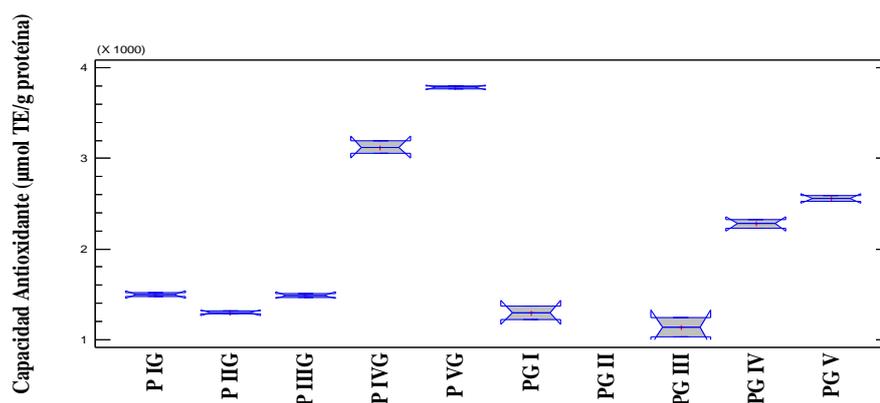
### Pruebas de Múltiple Rangos para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PG II	3	817.14	X
PG III	3	1,132.86	X
P IIG*	3	1,297.29	X
PG I	3	1,298.97	X
P IIIG*	3	1,489.2	X
P IG*	3	1,495.91	X
PG IV	3	2,277.4	X
PG V	3	2,556.24	X
P IVG*	3	3,124.47	X
P VG*	3	3,784.85	X

\*Con previa CA

### Gráfico de Cajas y Bigote



**ANEXO 22: INHIBICIÓN DE LA ACE Y VALOR IC<sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

Muestra*		Inhibición de la ACE (%)		Valor IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
		Sin previa CA	Con previa CA	Sin previa CA	Con previa CA
P-I-G	R1	-0.8	1.6	ND	ND
	R2	-17.0	5.3	ND	ND
PII-G	R1	56.4	40.62	ND	ND
	R2	59.5	43.18	ND	ND
PIII-G	R1	50.1	78.1	298.5	128.3
	R2	75.4	74.0	267.8	180.2
PIV-G	R1	74.1	73.88	165.4	103.0
	R2	65.0	72.50	134.9	116.3
PV-G	R1	77.2	80.7	104.3	34.6
	R2	80.1	80.3	84.1	43.6

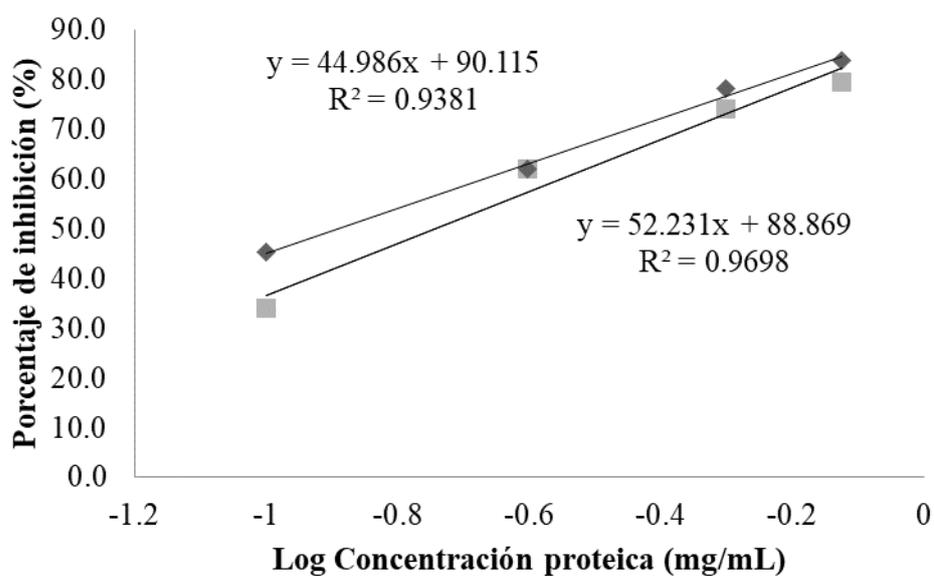
- \* PI-G = Primer pico eluido  
 PII-G = Segundo pico eluido  
 PIII-G = Tercer pico eluido  
 PIV-G = Cuarto pico eluido  
 PV-G = Quinto pico eluido

ND: No detectado

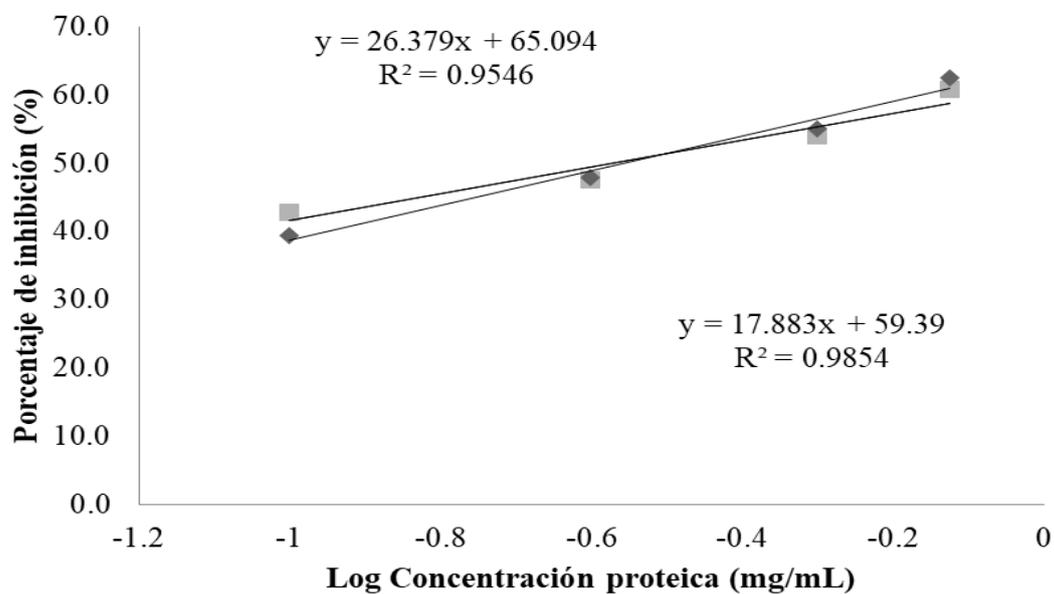
## ANEXO 23: CÁLCULO DE VALOR IC<sub>50</sub> DE LOS PICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

Valores IC<sub>50</sub> en la fracción PIII-G obtenida por cromatografía de filtración sobre gel con y sin previa cromatografía de adsorción

### a. Sin previa cromatografía de adsorción

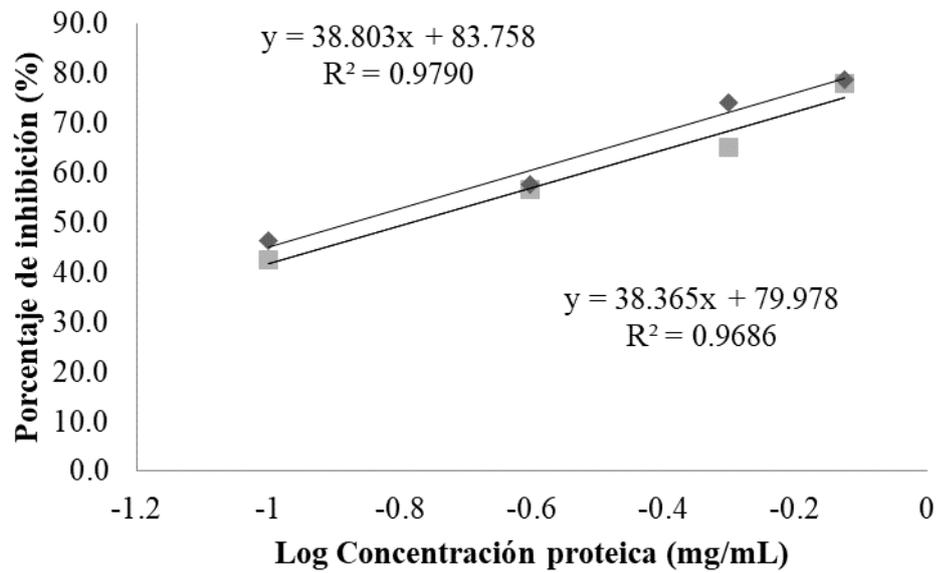


### b. Con previa cromatografía de adsorción

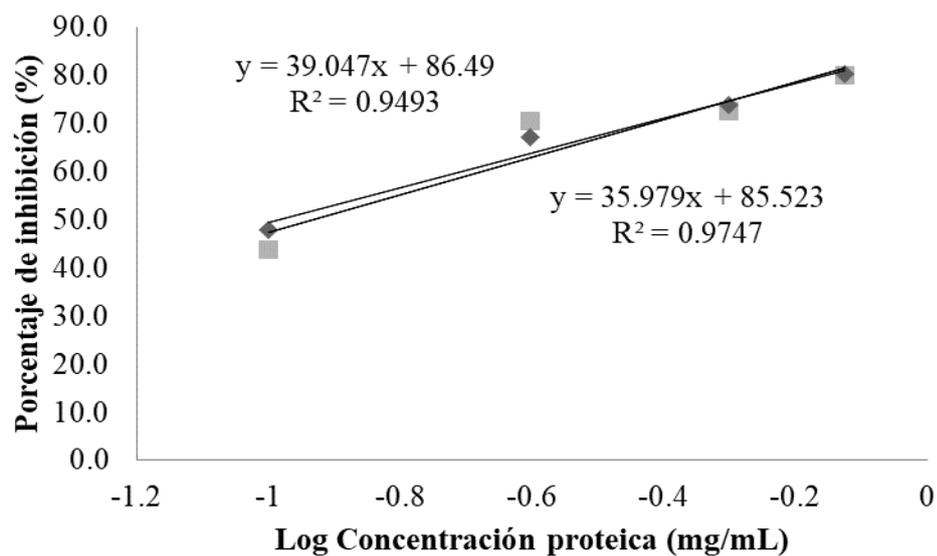


**Valores IC<sub>50</sub> en la fracción PIV-G obtenida por cromatografía de filtración sobre gel con y sin previa cromatografía de adsorción**

**a. Sin previa cromatografía de adsorción**

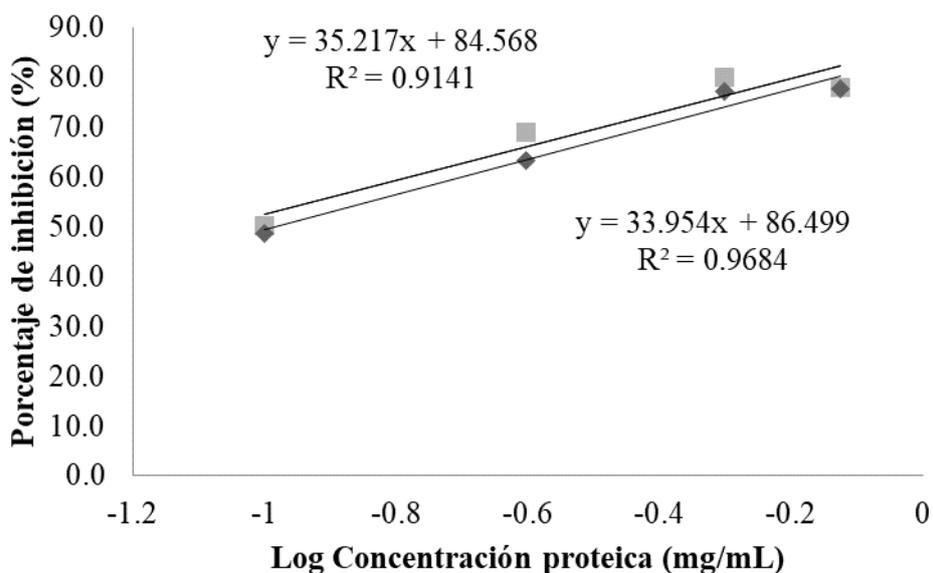


**b. Con previa cromatografía de adsorción**

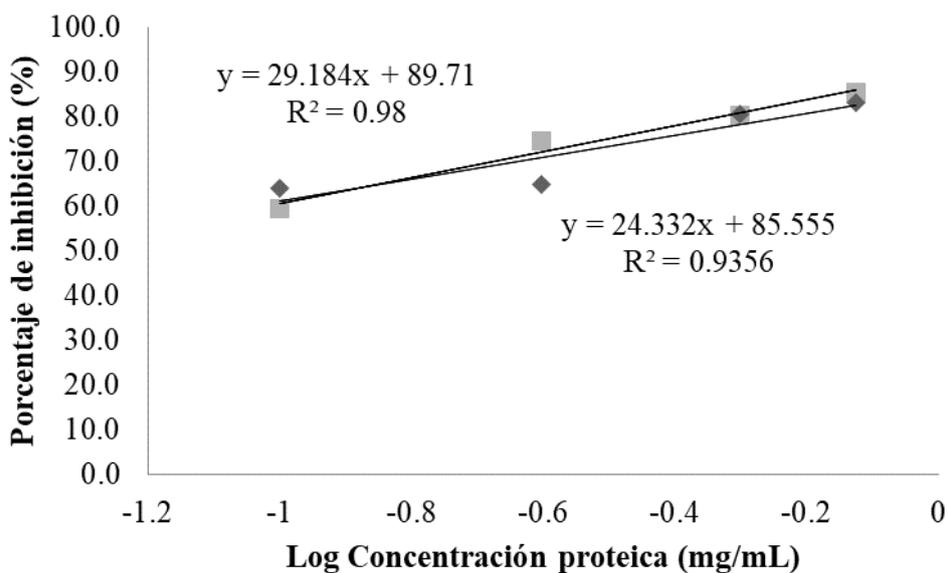


**Valores IC<sub>50</sub> en la fracción PV-G obtenida por cromatografía de filtración sobre gel con y sin previa cromatografía de adsorción**

**a. Sin previa cromatografía de adsorción**



**b. Con previa cromatografía de adsorción**



## ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ACE EN LAS FRACCIONES SEPARADAS POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN SOBRE GEL CON Y SIN PREVIA CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

### Prueba de Kruskal-Wallis para la Inhibición de la ACE (%)

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
P IG*	2	3.5
P IIG*	2	5.5
P IIIG*	2	15.0
P IVG*	2	11.5
P VG*	2	19.5
PG I	2	-8.9
PG II	2	8.5
PG III	2	11.0
PG IV	2	12.0
PG V	2	17.0

Estadístico = 17.4857 Valor-P = 0.0416313

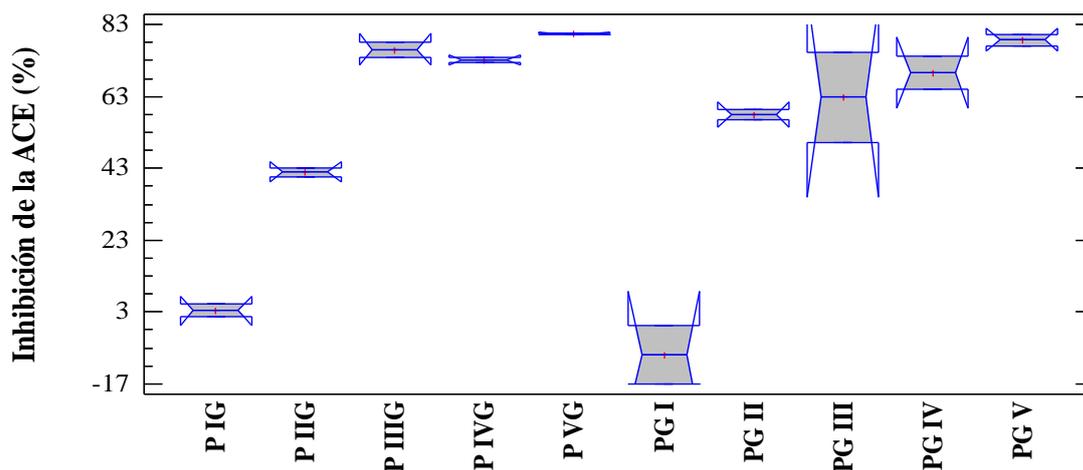
### Pruebas de Múltiple Rangos para la Inhibición de la ACE (%)

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PG I	2	-8.9	X
P IG*	2	3.45	X
P IIG*	2	41.9	X
PG II	2	57.95	XX
PG III	2	62.75	XX
PG IV	2	69.55	XXX
P IVG*	2	73.19	XXX
P IIIG*	2	76.05	XX
PG V	2	78.65	XX
P VG*	2	80.5	X

\*Con previa CA

### Gráfico de Cajas y Bigote



**ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO)  
ABTS LUEGO DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN**

**Prueba de Kruskal-Wallis para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra**

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
HQ	3	2.0
P II	3	7.0
P VG	3	14.0
P3kDa	3	6.0
PG V	3	11.0

Estadístico = 12.9 Valor-P = 0.0117749

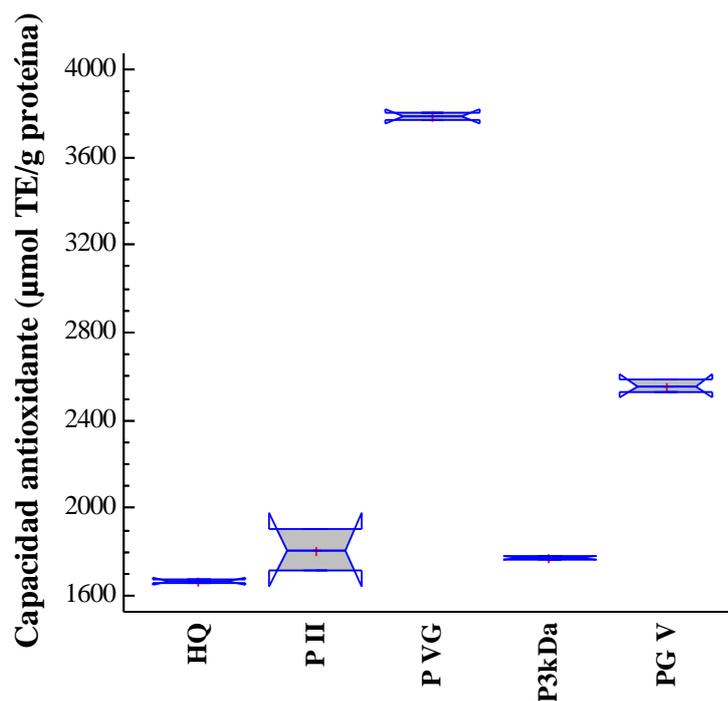
**Pruebas de Múltiple Rangos para la CAO ( $\mu\text{mol TE/g proteína}$ ) por muestra**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HQ	3	1,667.38	d
P3kDa	3	1,774.32	c
P II	3	1,810.06	c
PG V	3	2,556.24	b
P VG*	3	3,784.85	a

\*Con previa CA

**Gráfico de Cajas y Bigote**



## ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO - INHIBICIÓN DE LA ACE (%) LUEGO DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN

Tabla ANOVA para la Inhibición de la ACE (%)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	774.974	4	193.744	20.77	0.0026
Intra grupos	46.63	5	9.326		
Total (Corr.)	821.604	9			

### Pruebas de Múltiple Rangos para la Inhibición de la ACE (%)

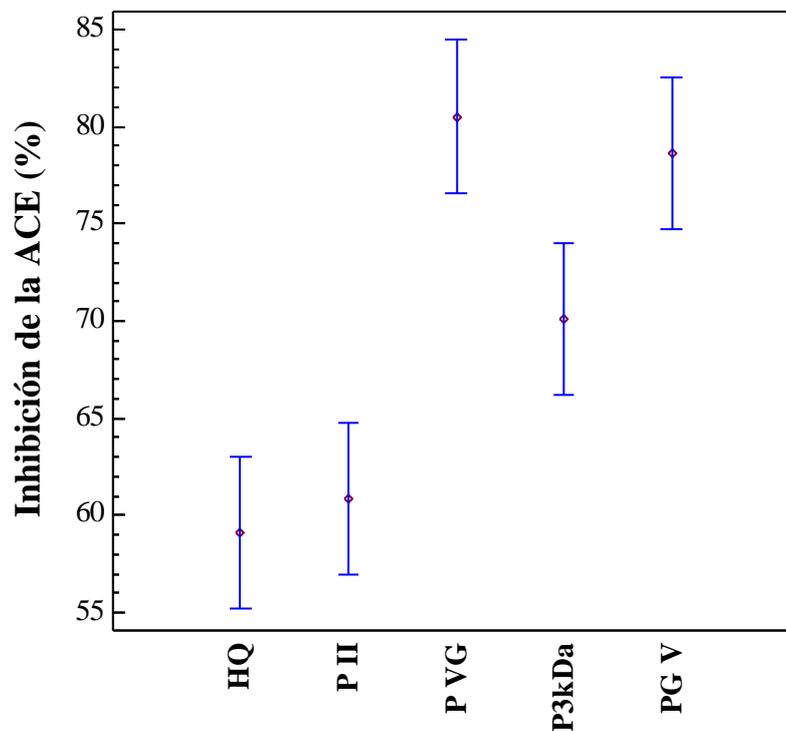
Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HQ	2	59.1	c
P II	2	60.85	c
P3kDa	2	70.1	b
PG V	2	78.65	a
P VG*	2	80.5	a

\*Con previa CA

### Gráfico de Medias

Medias y 95.0 % de Fisher LSD



**ANEXO 27: PRUEBA DE CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CAO) Y LA INHIBICIÓN DE LA ACE**

**Correlaciones**

	CAO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	Inhibición de la ACE (%)
CAO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )		0.8205
		(12)
		0.0011
Inhibición de la ACE (%)	0.8205	
	(12)	
	0.0011	

Correlación

(Tamaño de Muestra)

Valor-P