

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE UN HIDROLIZADO
PROTEICO DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen): CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIHIPERTENSIVA”**

Presentada por

KARINA GUADALUPE OCHOA PACHAS

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

Lima-Perú

2018

DEDICATORIA

Para Merino y Dora..... Sé que me cuidas siempre

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, la Dra. Rosana Chirinos por haberme permitido formar parte de esta investigación y por su apoyo en la etapa experimental.
- A mi co-asesora, la Dra. Ana Aguilar por sus consejos y preparación para la sustentación exitosa de esta tesis.
- A mi familia, especialmente a Ronald, por la paciencia para realizar las gestiones y a Fanny por su disposición a ayudarme.
- La presente tesis ha sido financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al convenio 354-PNICP-PIAP-2014 en el marco del proyecto: "Estudio de la Biotransformación Enzimática de la Proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) para la Obtención de Péptidos Bioactivos, con Actividades Antihipertensiva, Antioxidante y Antihipercolesterolémica"

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	CAÑIHUA.....	3
2.1.1	GENERALIDADES.....	3
2.1.2	VALOR NUTRITIVO	4
2.2	PÉPTIDOS BIOACTIVOS	8
2.2.1	DEFINICIÓN	8
2.2.2	PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	11
2.2.3	ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	12
2.2.4	APLICACIONES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS	15
2.3	SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	23
2.3.1	ULTRAFILTRACIÓN.....	23
2.3.2	MÉTODOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EMPLEADOS EN PROTEÍNAS	24
2.3.3	ELECTROFORESIS	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	34
3.2	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	34
3.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	34
3.3.1	MATERIALES.....	34
3.3.2	EQUIPOS	35
3.3.3	REACTIVOS.....	35
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	37
3.4.1	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	37
3.4.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL	37
3.4.3	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	37
3.4.4	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	38
3.4.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS	39
3.4.7	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA	39

3.4.8	DETERMINACIÓN DEL IC ₅₀	40
3.4.9	ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	41
3.5	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	42
3.5.1	OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA	43
3.5.2	SEPARACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN	44
3.5.3	SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL	44
3.5.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS PURIFICADAS	45
3.5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1	CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO E HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA	46
4.2	PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS	49
4.2.1	PURIFICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE CAÑIHUA POR ULTRAFILTRACIÓN.....	49
4.2.2	CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL.....	54
4.2.3	ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	59
V.	CONCLUSIONES	70
VI.	RECOMENDACIONES.....	71
VII.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	72
VIII.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición química de algunos cultivares de cañihua	6
Cuadro 2: Contenido de aminoácidos lisina, metionina, treonina y triptófano en los granos andinos y en trigo (g de aminoácidos/100 g de proteínas).....	6
Cuadro 3: Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos	13
Cuadro 4: Péptidos con actividad biológica derivados de distintas fuentes proteicas	16
Cuadro 5: Tipos de cromatografía y materiales cromatográficos para la separación de proteínas	25
Cuadro 6: Concentración y parámetros empleados en la hidrólisis	43
Cuadro 7: Características del concentrado proteico de cañihua (CPC) y el hidrolizado proteico de cañihua (HPC)*	46
Cuadro 8: Valores de actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$), inhibición de la actividad ECA - I (%) e IC50 obtenidos luego del proceso de ultrafiltración	50
Cuadro 9: Características de las fracciones obtenidas durante el proceso de cromatografía de filtración en gel	56
Cuadro 10: Resumen del proceso de purificación de péptidos bioactivos	59
Cuadro 11: Pesos moleculares de las fracciones de cañihua obtenidas por cromatografía de filtración en gel	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efectos de los péptidos bioactivos sobre el organismo humano.	10
Figura 2: Daño a las moléculas biológicas por especies de oxígeno reactivas que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.	17
Figura 3: Sistema Renina-Angiotensina.	21
Figura 4: Principios de la cromatografía por exclusión de tamaño.	27
Figura 5: Esquema de la separación electroforética de proteínas en un gel de poliacrilamida.	29
Figura 6: Esquema del sistema de electroforesis discontinuo.	30
Figura 7: Efecto del SDS en la conformación y carga de una proteína.	32
Figura 8: Diseño experimental para la caracterización de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antihipertensiva.	44
Figura 9: Separación mediante cromatografía de filtración en gel del permeado < 3kDa del hidrolizado de cañihua.	55
Figura 10: Perfil electroforético de las fracciones del hidrolizado proteico purificado de la cañihua	59

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	84
ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE LEUCINA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRADO DE HIDRÓLISIS	85
ANEXO 3: CURVA ESTÁNDAR DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS ⁺	86
ANEXO 4: ANOVA SIMPLE –ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL CPC Y HPC.....	87
ANEXO 5: ANOVA SIMPLE –ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR <i>CUT OFF</i>	88
ANEXO 6: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE LA ECA - I POR <i>CUT OFF</i>	89
ANEXO 7: ANOVA SIMPLE – VALOR IC ₅₀ POR <i>CUT OFF</i>	90
ANEXO 8: ANOVA SIMPLE – ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR PICOS.....	91
ANEXO 9: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE LA ECA - I POR PICO.....	92
ANEXO 10: ANOVA SIMPLE – IC ₅₀ DE LOS PICOS	93
ANEXO 11: SIMPLE – AAOX DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN.....	94
ANEXO 12: ANOVA SIMPLE – INHIBICIÓN DE LA ECA – I DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN	95
ANEXO 13: ANOVA SIMPLE – IC ₅₀ DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN	96
ANEXO 14: ABREVIATURAS DE NOMBRES DE AMINOÁCIDOS.....	97

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la purificación de los péptidos de un hidrolizado proteico de cañihua, mediante técnicas de: ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel, en función a su actividad antioxidante ABTS⁺ (AAOX) y antihipertensiva, a través de la medida del valor IC₅₀, (correspondiente al 50 por ciento de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I), así como su caracterización a nivel de peso molecular mediante electroforésis. El hidrolizado proteico fue obtenido a partir de un concentrado proteico, mediante una hidrólisis en dos etapas con las enzimas Neutrasa y Alcalasa (0.385 UA/0.385 AU), por un período de 180 minutos. El hidrolizado presentó una actividad antioxidante de 1.95 μmol TE/mg proteína y un valor IC₅₀ de 0.16 mg/mL. Luego de pasar, el hidrolizado proteico, por ultrafiltración empleando el *cut off* de 10 y 3 kDa, los valores de AAOX e IC₅₀ el permeado final (3 kDa) alcanzó valores de AAOX de 2.11 μmol TE/mg proteína y de IC₅₀ de 0.09 mg/mL. Este permeado fue pasado por cromatografía de filtración en gel utilizando Biogel P-2, obteniéndose un total de 3 fracciones, donde, la última fracción obtuvo el más alto valor de AAOX (3.18 μmol TE/g proteína) y el más bajo valor de IC₅₀ (0.055 mg/mL). Luego de la evaluación electroforética, los péptidos constituyentes de esta última fracción presentaron un rango de pesos moleculares comprendidos entre 1.29 a 5.33 kDa, encontrándose en ellos un potencial antioxidante y antihipertensivo. De los resultados obtenidos se destaca a la cañihua como una alternativa nutritiva y beneficiosa a la salud.

Palabras clave: hidrolizado proteico de cañihua, actividad antioxidante, actividad antihipertensiva, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel, electroforesis.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to purify the peptides of a cañihua protein hydrolyzate, by ultrafiltration and gel filtration chromatography techniques, based on their ABTS⁺ antioxidant capacity (AAOX) and antihypertensive activity, by measuring the IC₅₀ value, (corresponding to 50 percent inhibition of the angiotensin converting enzyme I), as well as its characterization at the molecular weight level by electrophoresis. The protein hydrolyzate was obtained from a protein concentrate, by a two-step hydrolysis with the enzymes Neutrasa and Alcalasa (0.385 AU/0.385 AU), for a period of 180 minutes. The hydrolyzate showed an AAOX of 1.95 μmol TE/mg protein and an IC₅₀ value of 0.16 mg / mL. After passing, the protein hydrolyzate, by ultrafiltration using the cut off of 10 and 3 kDa, the values of AAOX and IC₅₀ the final permeate (3 kDa) reached AAOX values of 2.11 μmol TE/mg protein and IC₅₀ of 0.09 mg/mL. This permeate was passed through filtration chromatography on Biogel P-2 gel, obtaining a total of 3 fractions, where, the last fraction obtained the highest value of AAOX (3.18 μmol TE/g protein) and the lowest value of IC₅₀ (0.055 mg/mL). After the electrophoretic evaluation, the constituent peptides of this last fraction presented a range of molecular weights between 1.29 to 5.33 kDa, being found in them an antioxidant and antihypertensive potential. Given the results obtained, cañihua stands out as a nutritious and beneficial alternative to health.

Keywords: canihua protein hydrolyzate, antioxidant activity, antihypertensive activity, ultrafiltration, gel filtration chromatography, electrophoresis.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes dentro del sector de los alimentos funcionales. Estos péptidos son secuencias aminoacídicas (entre 2 y ~ 20 aminoácidos) que tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos (Segura-Campos *et al.*, 2013). Los hidrolizados y fracciones peptídicas tienen varias ventajas: no sólo tienen actividad biológica sino que también pueden tener contribución nutricional; el fraccionamiento incrementa su actividad luego de ser ingeridos, y además actúan en sinergia para incrementar el efecto en el organismo (Herrera *et al.*, 2014).

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica podrían ayudar a reducir la actual epidemia de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial (OMS; citado por Segura-Campos *et al.*, 2013).

En un estudio previo, Ochoa (2017) determinó las condiciones óptimas de hidrólisis de la proteína de cañihua para obtener péptidos con el menor valor de IC_{50} , mostrando que se puede usar como fuente potencial de ingredientes funcionales y compuestos antioxidantes con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA - I). Sin embargo, debido a que dicho hidrolizado proteico podría contener algunas fracciones de compuestos de naturaleza no proteica, que pudiesen actuar como interferencia; así como fracciones proteicas de alto peso molecular, que no presentasen importantes actividades antioxidante y antihipertensiva, es que se hace necesario continuar estudios más profundos que permitan elucidar a fracciones proteicas de interés (con bioactividad) y caracterizarlas. Es por ello que en la presente investigación se aplicaron técnicas de purificación en el hidrolizado proteico de la cañihua: separación por membranas y cromatografía de filtración en gel para evaluar la influencia de tales técnicas en las propiedades antioxidante y antihipertensiva, así como la evaluación de su perfil electroforético como una aproximación a su caracterización. Por

ello, los objetivos de la presente tesis fueron:

- Determinar la actividad antihipertensiva (actividad inhibitoria de enzima convertidora de la angiotensina ECA - I) y actividad antioxidante (ABTS⁺) *in vitro* de la proteína de cañihua hidrolizada y de las fracciones peptídicas obtenidas luego de los procesos de ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel.
- Determinar el rango de pesos moleculares de las fracciones de péptidos con mayor actividad antihipertensiva y antioxidante mediante electroforesis SDS-PAGE.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CAÑIHUA

2.1.1 GENERALIDADES

Desde hace cientos de años se cultiva en nuestro país la “kañiwa” (*Chenopodium pallidicaule*) descrita por Aellen en 1929. Esta especie altoandina habita sobre los 1500 a 3600 m de altura. Puede crecer a mayor altitud que la quinua; su periodo vegetativo es de 135 - 145 días, en comparación a la quinua (165 - 172 días). Ambas especies pueden crecer donde otros cereales lo hacen con dificultad, debido a que toleran heladas, y se han adaptado a un amplio rango de suelos prefiriendo aquellos ricos en limo, potasio y magnesio (Pirie, 2011).

Algunos de los cultivares conocidos en Perú son: Cupis, Ramis, Akallapi, Huanaco, Rosada, Chillahua, Condorsaya, K'ellu y Puca. En Bolivia, los cultivares incluyen Kanallapi, Chusllunca e Issualla. Existen colecciones de germoplasma en las estaciones experimentales INIA de Camacani e Illpa (Puno), la Universidad San Antonio Abad en K'ayra (Cuzco) en Perú; y en Bolivia en la Universidad de Patacamaya en el Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA) donde se almacenan en frío más de 380 accesiones (FAO, 1994).

La cañihua es una especie agroalimentaria poco estudiada y que muchas veces ha sido confundida con la quinua. Es un grano muy nutritivo propio del altiplano andino, tuvo especial relevancia para los habitantes en el altiplano peruano-boliviano, donde se desarrolló la cultura Tiahuanaco y es donde actualmente existen mayores extensiones cultivadas con esta especie (en el Perú 2400 t y en Bolivia 1000 t anuales) (Bustamante, 2014).

Según Huamán (2011), la cañihua presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Vegetal, Eucariota
División: *Angiospermophyla*
Clase: *Dicotyledoneae*
Sub clase: *Archichlamydeae*
Orden: *Centrospermales*
Familia: *Chenopodaceae*
Género: *Chenopodium*
Especie: *Chenopodium pallidicaule* Aellen

Este grano tiene una adaptabilidad a diferentes regiones agroecológicas. Puede crecer a una humedad relativa entre 40 a 88 por ciento, y tolera temperaturas entre - 4 a 38 °C. Resiste la falta de humedad del suelo y produce cultivos con rendimientos aceptables con una precipitación de 100 a 200 mm anual (FAO/OMS, citado por Gallego *et al.*, 2014). En el Perú, en la región Puno al norte del Lago Titicaca, se siembra aproximadamente 5 mil hectáreas de cañihua y el rendimiento promedio por hectárea alcanza entre 750 y 800 kg. La mayor concentración de producción de Cañihua se encuentra en el altiplano de la región Puno, principalmente en la provincia de Melgar en los distritos de Llalli, Macari, Ayaviri, Nuñoa, en las provincias de Azángaro, Huancané, San Román, Puno en el distrito de Acora y en la provincia de Chuquito en los distritos de Pomata y Kelluyo. Todas las provincias mencionadas corresponden al grupo étnico Aymara (Arnillas *et al.*, 2013). La producción también se da en menor escala, en las zonas altas de Arequipa y Cusco. En el 2016, la producción alcanzada fue de 4.57 toneladas para una superficie cosechada de 6155 hectáreas (rendimiento 764 kg/ha) (MINAGRI, 2017).

2.1.2 VALOR NUTRITIVO

Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos, desde un punto de vista nutricional como funcional. Son una fuente de aminoácidos, los cuales son esenciales para el crecimiento y mantenimiento del cuerpo; desde el punto de vista tecnofuncional, estas afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos, así como también, muchas proteínas de la dieta pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo

humano, ya que poseen propiedades biológicas que hacen a estos componentes ingredientes potenciales por su bioactividad o como alimentos promotores de la salud (Carmona y Zapata, 2016). Las proteínas en la semilla tienen diferentes roles: funcional, como parte de estructuras complejas, en las membranas y proteínas estructurales; energéticas, proteínas de almacenamiento, como fuente de aminoácidos para suministrar los bloques de construcción necesarios durante la biosíntesis de proteínas en la germinación; y metabólico, como en el caso de las enzimas necesarias para el control de diversas reacciones (Yada, 2017).

La cañihua es un grano que tiene un alto valor nutricional por su elevado contenido de proteínas que varía entre 14 y 19 por ciento, las cuales pertenecen principalmente a las albúminas y globulinas que tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales (Repo-Carrasco *et al.*, 2003); además tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados, metionina y cisteína (Repo-Carrasco *et al.*, 2009). Esta calidad proteica en combinación con un contenido de carbohidratos del orden del 63.4 por ciento y aceites vegetales del orden del 7.6 por ciento, la hacen altamente nutritiva. También concentra grandes proporciones de calcio, magnesio, sodio, fósforo, hierro, zinc, vitamina E, complejo vitamínico B (Callisaya y Alvarado, 2009). El grano también tiene alto nivel de fibra dietética y grasas no saturadas, considerándose a esta especie como uno de los componentes estratégicos de la seguridad alimentaria (Juárez y Quispe, 2016). Los factores antinutricionales son muy bajos, por lo cual la ventaja de la cañihua, es que los granos tienen un contenido de saponinas bajo, lo cual facilita su utilización. Esto indica que es más rápido y más barato obtener harina comestible de la cañihua, que procesar quinua para el mismo fin (INIA, 2004).

Gallego *et al.* (2014) determinaron un contenido de proteína en granos de quinua y cañihua entre 12 a 18 por ciento en base húmeda, mientras que la composición química señalada por La Rosa *et al.* (2016) se muestra en el Cuadro 1. Además, según Walters (2013), esta proteína tiene alta calidad y es particularmente rica en aminoácidos esenciales, tales como aminoácidos azufrados, lisina y aminoácidos aromáticos, mayores que los recomendados por la FAO/OMS (2007) y que son deficientes en la mayoría de granos pero necesarios para una nutrición apropiada en humanos.

Cuadro 1: Composición química de algunos cultivares de cañihua

COMPONENTE (por ciento)	CULTIVAR					
	Roja	Blanca	Amarilla	Cupi	Ramis	ILLPA- INIA
Humedad	10.7	10.7	10.7	8.5	7.7	8.4
Proteína	16.1	16.1	16.5	14.2	13.7	14.5
Grasa	7.5	7.8	7.5	3.9	3.9	3.9
Carbohidratos	62.7	62.5	62.5	59.8	61.2	58.7
Cenizas	3.7	3.7	3.5	4.1	4.1	4.2

FUENTE: La Rosa *et al.* (2016)

El Cuadro 2 evalúa el contenido de los aminoácidos lisina, metionina, treonina y triptófano en las proteínas de los granos andinos; en ella se observa que estos aminoácidos son elevados al ser comparados con los cereales (pobres en lisina y treonina). En el caso de la cañihua, la leucina es el aminoácido limitante comparado con el patrón de aminoácidos de referencia para niños de 1 a 2 años.

Cuadro 2: Contenido de aminoácidos lisina, metionina, treonina y triptófano en los granos andinos y en trigo (g de aminoácidos/100 g de proteínas)

AMINOÁCIDOS	g/100 g DE PROTEÍNA					
	Cañihua	Quinua	Kiwicha	Trigo	FAO/OMS*	FAO/OMS**
Triptófano	0.9	1.5	1.1	1.1	0.7	0.6
Metionina +cisteína	4.6	3.4	6.1	4.0	2.5	2.2
Treonina	3.3	3.8	3.3	2.9	2.7	2.3
Isoleucina	3.4	3.2	3.2	3.3	3.1	3.0
Valina	4.2	3.9	3.8	4.4	4.1	3.9
Lisina	5.3	5.1	6.0	2.9	5.2	4.5
Fenilalanina +Tirosina	6.0	6.3	6.4	7.5	4.6	3.8
Leucina	6.1	7.9	5.4	6.7	6.3	5.9
Histidina	2.7	2.4	2.4	2.3	1.8	1.5

FUENTE: Walters (2013); *: Patrón de aminoácidos de referencia para niños de 1 a 2 años (FAO/OMS 2007);

** : Patrón de aminoácidos de referencia para adultos (FAO/OMS 2007)

En las últimas décadas ha surgido un gran interés en el uso de concentrados proteicos, esto se debe al aumento exponencial de la población que genera un déficit creciente a escala mundial de productos ricos en proteínas, tales como los concentrados y aislados proteicos. Los concentrados proteicos son aquellos que contienen un mínimo de 70 por ciento de proteína en base seca, en cereales y leguminosas se extraen a partir de la harina desgrasada del grano previamente descascarillado y pulverizado, con la posterior eliminación de compuestos solubles no proteicos, obteniendo un producto rico en azúcares insolubles y proteínas (Aguilar y Vélez, 2013). Sin embargo, también pueden contener cantidades sustanciales de carbohidratos y grasa, por lo cual se realiza una purificación adicional utilizando filtración o microfiltración de intercambio iónico, lo cual resulta en la obtención de un aislado proteico, el cual tiene bajos niveles de carbohidratos y grasa y son casi en su totalidad proteína (Kalman, 2014).

Con el fin de satisfacer esta demanda se han realizado numerosas investigaciones orientadas a encontrar nuevas fuentes proteicas y tecnologías que permitan obtener una mayor disponibilidad y calidad de proteínas, a partir de las diferentes fuentes proteicas existentes en la actualidad (Jaimes *et al.*, 2014). En años recientes, los cereales y sus ingredientes son reconocidos como alimentos funcionales y nutraceuticos por ser fuentes de fibra dietaria, proteínas, energía, minerales, vitaminas y antioxidantes requeridos para la salud humana. Además, pueden ser usados como fuentes fermentables para el crecimiento de microorganismos probióticos (Das *et al.*, 2012). Los cereales andinos son alimentos promisorios debido a su contenido de metabolitos secundarios fenólicos como polifenoles, sintetizados para contrarrestar condiciones de crecimiento y clima adversos. Estos metabolitos están relacionados a la reducción del riesgo de enfermedades crónicas cuando se consumen en la dieta (Gallego, 2014). Por ejemplo, los polifenoles de plantas, antioxidantes naturales, son candidatos ideales ligados a efectos protectores de frutas y vegetales contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Arts y Hollman, 2005).

La extracción alcalina es una alternativa tecnológica para el aislamiento de la proteína de granos. El aislado proteico tiene baja actividad inhibidora de tripsina y generalmente cumple con las recomendaciones de la FAO para el contenido de aminoácidos esenciales en dietas para adultos (Herrera *et al.*, 2014). La elección del método de aislamiento de proteínas depende de las propiedades de la fuente. Los métodos para la ruptura celular varían desde

métodos físicos, tales como tratamiento térmico y sonicación, a métodos químicos, como el tratamiento con soluciones detergentes. Las soluciones proteicas generalmente se diluyen antes de analizar, por lo tanto, es necesario aplicar un proceso de enriquecimiento como concentración o precipitación. Dado que las proteínas precipitan en condiciones específicas, se puede utilizar este método para separar la proteína deseada de otras proteínas mediante el empleo de sales o precipitación isoeléctrica disminuyendo el pH hasta alcanzar el punto isoeléctrico particular de la proteína objetivo (Lee, 2017). Es así que el concentrado proteico de cañihua de la variedad Cupis obtenido mediante extracción alcalina seguida de precipitación isoeléctrica de la proteína, registra contenidos de proteína mayores a 70 por ciento (Espinoza, 2015 y Ochoa, 2017).

En cuanto a su actividad antioxidante, Abderrahim *et al.* (2012) señalan que la cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) es un cereal rico en compuestos antioxidantes, lo cual puede estar vinculado a sus condiciones severas de cultivo, tales como: la altitud, el frío y la sequía.

Al respecto, Chanamé y Cruz (2017) indican que las plantas que soportan condiciones climáticas extremas (heladas, sequías y bajas temperaturas), como es el caso de la cañihua, ejercen una protección innata contra la oxidación lo cual le confiere su mayor actividad antioxidante en comparación a otros cereales.

2.2 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

2.2.1 DEFINICIÓN

Tradicionalmente, las propiedades nutricionales de las proteínas se asocian al contenido en aminoácidos, especialmente los esenciales. Sin embargo, recientemente se está investigando la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de las proteínas de los alimentos, con vistas a conocer mejor las propiedades nutricionales de dichos alimentos y también a utilizar dichos péptidos como ingredientes funcionales (Vercruyssen *et al.*, 2005).

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica (PB) son secuencias cortas de aminoácidos, generalmente entre 2 a 20 aminoácidos (Singh *et al.*, 2014), aunque se han reportado péptidos con más de 20 residuos de aminoácidos (Capriotti *et al.*, 2015). Para ser considerado bioactivo, un componente de la dieta debe impartir un efecto biológico medible a un nivel fisiológico. Esta bioactividad debe tener el potencial de afectar la salud de una manera beneficiosa, que excluye efectos potencialmente dañinos tales como toxicidad, alergenicidad y mutagenicidad (Moller *et al.*, 2008).

Los PB son conocidos por su habilidad de inhibir interacciones proteína-proteína debido a su pequeño tamaño y especificidad. Son derivados de proteínas que más allá de aportar un alto valor nutricional, ejercen una respuesta fisiológica en forma beneficiosa para el organismo (Guevara, 2016). La mayoría de las actividades fisiológicas de las proteínas están dadas por secuencias de péptidos encriptadas en la proteína de origen que se vuelven activos cuando se liberan durante proteólisis enzimática (digestión gastrointestinal, hidrólisis *in vitro* utilizando enzimas proteolíticas) de las proteínas y también durante el procesamiento de alimentos (cocción, fermentación, maduración) (Daliri *et al.*, 2017).

En la naturaleza permanece la mayor fuente de PB dado que plantas, animales, hongos, microorganismos y sus productos contienen varias proteínas en ellos (Daliri *et al.*, 2017). Los PB han demostrado tener un amplio número de funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la antihipertensiva, antioxidante, opiáceo-antagonista, inmunomodulatoria, antimicrobiana, prebiótica, antitrombótica e hipocolesterolemica, entre otras (Arihara y Ohata, 2006). Dependiendo de la composición y secuencia de aminoácidos que los conforman, presentan efectos sobre diferentes sistemas del organismo humano: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (Figura 1) (Carrasco y Guerra, 2010).

En los últimos años se viene reconociendo el papel protector o beneficioso de algunos péptidos presentes en alimentos sobre la salud del consumidor, por poseer propiedades funcionales y/o bioactivas (Vercruysse *et al.*, 2005). Actualmente el mercado de proteínas y péptidos funcionales se valora en \$75 miles de millones/año. Los PB tienen potencial para ayudar a reducir la epidemia mundial de enfermedades crónicas que afectan a 58 millones de personas al año, con la posibilidad de su incorporación en alimentos funcionales y nutracéuticos (Daliri *et al.*, 2017).

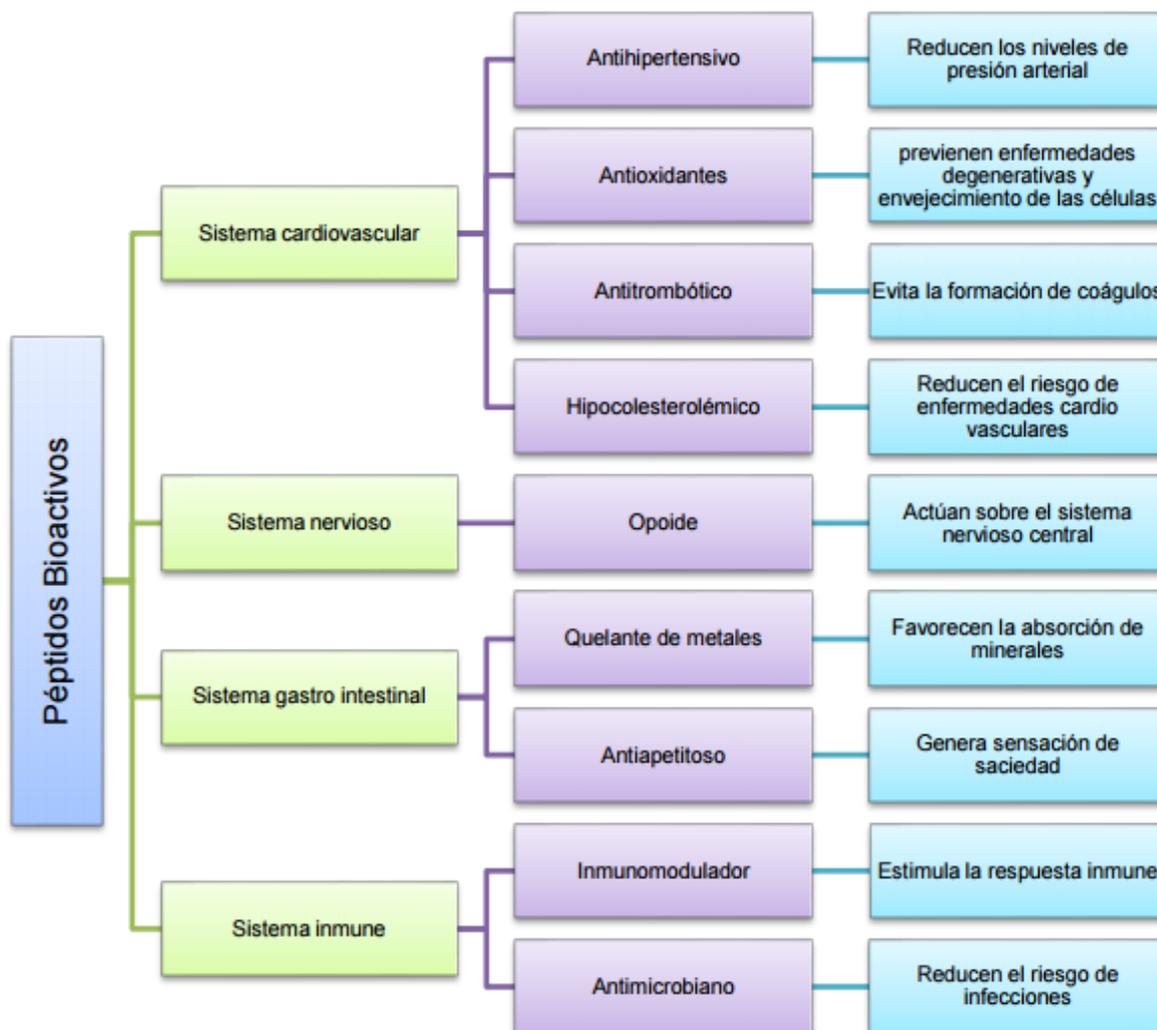


Figura 1: Efectos de los péptidos bioactivos sobre el organismo humano.

FUENTE: Guevara (2016)

Numerosos estudios han demostrado que los péptidos bioactivos se encuentran en muchas proteínas de alimentos que se consumen en la dieta humana, siendo la principal fuente de obtención la proteína de la leche. Sin embargo, también se pueden obtener de otras fuentes animales como sangre bovina (Przybylski *et al.*, 2016), gelatina (Lassoued *et al.*, 2015), carne, huevos, diversas especies de peces como atún, sardina, arenque y salmón. Algunas fuentes vegetales de PB y proteínas son trigo (Kumagai, 2010), maíz, soja (Singh *et al.*, 2014), arroz (Selamassakul *et al.*, 2016), champiñones, calabaza, sorgo (Moller *et al.*, 2008) y amaranto (Silva-Sanchez *et al.*, 2008).

2.2.2 PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Existe una gran cantidad de PB contenida en un amplio rango de fuentes alimenticias (productos de plantas, animales y de origen marino) y generados por fermentación, hidrólisis enzimática, química o procesos de digestión gastrointestinal de proteínas de alimentos (Udenigwe y Aluko, 2012). El uso de hidrólisis enzimática para producir péptidos bioactivos se prefiere a la fermentación microbiana debido al corto tiempo de reacción y facilidad de escalamiento (Daliri *et al.*, 2017).

La hidrólisis enzimática ofrece indudables ventajas, como la no existencia de procesos de degradación del sustrato, moderados valores de pH y temperatura (pH entre 5 a 10 y temperatura entre 40 a 60 °C) y el mantenimiento o mejora del valor nutritivo de la proteína. Además de la ventaja adicional de la disminución de alérgenos (Bustamante, 2014). Las características de los hidrolizados que se obtengan, estarán determinadas por el uso al que estén destinados, así como por el grado de hidrólisis (GH) (Ramírez, 2015).

Las proteasas se agrupan típicamente en cuatro clases de mecanismos: las cisteín proteasas, serin proteasas, metalo proteasas y asparto proteasas. Las enzimas proteolíticas más empleadas en la obtención de hidrolizados *in vitro* son las serin proteasas, que utilizan un resto de serina activado para unirse al sustrato y catalizar la hidrólisis de grupos peptídicos. Las serin proteasas usan el mecanismo clásico de tríada Ser/His/Asp, donde la Ser es el nucleófilo, la His es la base general y el Asp ayuda a orientar el residuo de His y neutralizar la carga que se desarrolla en la His durante los estados de transición (Ekizi *et al.*, 2008). Polaina y MacCabe (2007) señalan que esta triada es muy similar a las enzimas digestivas intestinales de mamíferos, tripsina y quimotripsina.

Las enzimas proteolíticas que utilizan Ser en su triada catalítica son bastante ubicuas e incluyen un amplio rango de actividades peptidasa, tales como endopeptidasas, exopeptidasas y oligopeptidasas. Por otro lado, el grupo más amplio de enzimas proteolíticas se clasifica como metaloproteasas, que representan un amplio grupo de hidrolasas que escinden enlaces peptídicos por acción de una molécula de agua activada por su acomplejamiento con iones metálicos bivalentes (Polaina y MacCabe, 2007). Casi todas las metaloproteasas contienen uno o dos enlaces iónicos zinc, mientras que otras enzimas

contiene uno o dos iones de cobalto o magnesio (Fukusawa *et al.*, 2011). En los sitios catalíticos de las metaloproteasas, el zinc forma complejos con cualquier donante de tres nitrógenos (His) y oxígeno (Glu o Asp), siendo His el aminoácido predominante, debido a su capacidad de dispersar cargas a través de del enlace de su nitrógeno no ligado con hidrógeno. Entre las más comunes, se tiene por ejemplo a la astacina, carboxypeptidasa A, y termolisina (Barret *et al.*, 2012).

Las proteasas tales como alcalasa, flavouzyme, pepsina, pancreatina, quimotripsina, papaína, tripsina y termolisina se han utilizado para producir péptidos bioactivos a partir de proteínas de diversas fuentes (Ramírez, 2015). Las variaciones en el tratamiento como la relación enzima/sustrato, el tratamiento previo de la proteína y la combinación de las enzimas en la hidrólisis juegan un papel importante en la bioactividad de los péptidos generados (Luna *et al.*, 2014).

La Neutrasa, es una metaloproteasa proveniente de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* y presenta como sitio de acción catalítica a los aminoácidos Leu, Val y al metal hierro (Mosquera, 2014); permite la hidrólisis de proteínas para producir péptidos con el extremo C-terminal conteniendo aminoácidos hidrofóbicos, por ejemplo, tirosina, triptófano o fenilalanina. Por otro lado, la Alcalasa es una proteasa alcalina de uso industrial producida por *Bacillus licheniformis* siendo su principal componente activo la endopeptidasa serina subtilisina, la cual hidroliza enlaces peptídicos con amplia especificidad perteneciendo a un grupo de serina proteasas que inician el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico (amida) a través de un residuo de serina en el sitio activo (típicamente Asp-His-Ser) (Montoya *et al.*, 2015), liberando péptidos con aminoácidos hidrofóbicos con grandes cadenas laterales y ausentes de cargas (aminoácidos aromáticos y alifáticos), incluidos isoleucina, leucina, valina, tirosina o prolina en su región C-terminal (Chen *et al.*, 2016).

2.2.3 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los mecanismos a través de los cuales se realiza la absorción y transporte al torrente sanguíneo de péptidos, se describen en el Cuadro 3. Estos péptidos contenidos en hidrolizados, presentan una solubilidad en agua cercana al 100 por ciento en un intervalo

amplio de pH y tienen la característica de ser hipoalergénicos. Además, su absorción intestinal es mejor que en las proteínas intactas (Carmona y Zapata, 2016).

Cuadro 3: Posibles rutas para la absorción y transporte al torrente circulatorio de péptidos

RUTA DE TRANSPORTE	MECANISMO	CANDIDATOS
Ruta paracelular	Difusión a través de las uniones entre células por un proceso de difusión pasiva independiente de energía	Péptidos grandes solubles en agua
Difusión pasiva	Difusión a través de un proceso de difusión transcelular independiente de energía	Péptidos hidrofóbicos
Vía transportador	Salida de algunos péptidos del enterocito hacia la circulación porta a través de un transportador localizado en la membrana baso lateral intestinal	Péptidos pequeños resistentes a hidrólisis
Endocitosis	Unión de las moléculas a la célula para absorción al interior de la célula vía vesiculización.	Péptidos polares grandes
Sistema linfático	Absorción de péptidos del espacio intersticial hacia el espacio linfático intestinal	Péptidos altamente lipofílicos demasiado grandes para ser absorbidos

FUENTE: Sarmadi e Ismail (2010)

Las células epiteliales del intestino delgado son el sitio principal de absorción de compuestos nutricionales y bioactivos tales como los péptidos. Más aún, luego de la administración oral, los péptidos pueden encontrar barreras químicas, bioquímicas y físicas por estas células, lo cual puede reducir la influencia en sus otras funciones fisiológicas. La principal barrera química para los péptidos bioactivos es el pH bajo del estómago, necesario para la digestión de proteínas y la absorción de los aminoácidos. Las mismas enzimas que hidrolizan las

proteínas pueden llevar a cabo la digestión hidrolítica de los péptidos debido a su similaridad en estructura química y grupos funcionales (Karás *et al.*, 2017).

Algunos péptidos bioactivos son capaces de resistir la acción de proteasas, lo cual está relacionado a su estructura característica. Es así que los péptidos incluyendo prolina o hidroxiprolina y dipéptidos u oligopéptidos con prolina en el extremo C-terminal no son hidrolizados por enzimas digestivas (por ejemplo lactotripéptidos antihipertensivos Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro, Lys-Try-Leu-Pro-Val-Pro-Gln y Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro (Boelsma y Kloek, 2009; Van Platernik *et al.*, 2006). La presencia de peptidasas es una barrera bioquímica, mientras que el epitelio gastrointestinal impermeable, así como los parámetros de la capa acuosa/mucosa, la membrana epitelial de enterocitos (ruta transcelular), y las uniones estrechas entre los extremos apicales de las células epiteliales (ruta paracelular), representan barreras físicas (Yin *et al.*, 2014).

Los péptidos pueden ser transportados activa o pasivamente dependiendo de su composición de aminoácidos y función. El transporte transepitelial de los péptidos (compuesto de más de cuatro aminoácidos) ha sido investigado utilizando células intestinales monocapas Caco2 (utilizada para la evaluación de la permeabilidad gastrointestinal *in vitro*) (Sarmadi e Ismail (2010).

Algunos estudios sugieren que el rol principal en el flujo a través de la capa celular epitelial está dado por la digestión mediante peptidasas celulares. Por otro lado, se sugirió que un mecanismo intracelular tal como una transcitosis adsorptiva era el factor principal en el transporte de bradiquinina y sus derivados, pero se reportó que la ruta paracelular estaba involucrada en el transporte del tetrapéptido Gly-Gly-Tyr-Arg (Shimizu *et al.*, citados por Karás *et al.*, 2017). Los péptidos antihipertensivos tales como Ile-Phe, Ala-Phe, Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro o péptidos opioides permanecen estructuralmente estables durante la infiltración vía la monocapa epitelial, donde la eficiencia del transporte es dependiente de la carga, peso molecular y presencia de péptidos hidrofóbicos (Sienkiewicz *et al.*, 2009).

Algunos péptidos podrían requerir protección de las enzimas gastrointestinales cuando se administren de forma oral utilizando formas de dosaje no convencionales. Es importante resaltar el hecho que los transportadores específicos del duodeno responsables por su

biodisponibilidad absorben también la mayor parte de los péptidos bioactivos; por ello, debería investigarse cualquier mecanismo de competencia para el mismo transporte intestinal (Cicero *et al.*, 2017).

2.2.4 APLICACIONES DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Dependiendo de la composición y secuencia de aminoácidos que conforman los péptidos bioactivos, estos pueden presentar efectos sobre diferentes sistemas del organismo humano: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (Carrasco y Guerra, 2010).

Ciertos péptidos pueden desencadenar actividades fisiológicas que promueven la salud de la piel y por lo tanto, se utilizan en productos no alimentarios, tales como cosméticos y productos dermatológicos. Algunas de estas funciones incluyen la modulación de inflamación de células y tejidos, estimulación de la síntesis de colágeno, control de la angiogénesis y melanogénesis y modulación de la proliferación celular y migración celular (Agyei *et al.*, 2016).

Considerando la relación que guarda la nutrición con el estado de salud, los péptidos con actividad biológica podrían ayudar a reducir la actual epidemia de enfermedades crónicas degenerativas que afectan a un amplio sector de la población mundial. Además de impactar el mercado de alimentos, donde el rubro de alimentos funcionales crece a un ritmo del 20 por ciento anual, pues la preocupación por la salud conlleva al aumento de la demanda de este tipo de productos por parte de los consumidores y al desarrollo de nuevos productos funcionales basados en efectos cuantificables sobre la salud (Segura-Campos *et al.*, 2013).

Resulta relevante que diversos estudios han demostrado que cualquier proteína independientemente de sus funciones y calidad nutricional, puede ser empleada para generar péptidos con actividad biológica (Cuadro 4), potenciando así el uso de proteínas de origen no convencional o subutilizadas, como proteínas vegetales provenientes de fuentes silvestres, residuos de pesquerías, subproductos de la extracción de aceites, etc. (Segura-Campos *et al.*, 2013). En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*,

empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano. Es más, en estudios recientes se han obtenido péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (Mulero *et al.*, 2013).

Cuadro 4: Péptidos con actividad biológica derivados de distintas fuentes proteicas

PÉPTIDOS	ORIGEN	NOMBRE/SECUENCIA
Inhibidores de ECA - I / Hipotensores	Soya	NWGPLV
	Pescado	LKP, IKP, LRP
	Carne	IKW, LKW
	Leche	Lactoquininas (WLAHK, LRP, KLP)
		Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP)
	Huevo	KVREGTTY
Ovokinina (FRADHPPL, KVREGTTY)		
Inmunomoduladores	Trigo	IAP, Inmunopéptidos
	Brócoli	YPK
	Arroz	GYPMYPLR
	Leche	Inmunopéptidos
Opioides antagonistas	Trigo	Exorfinas
	Leche	Lactoferroxina
Antimicrobianos	Huevo	(f 109-200)
	Leche	Lactoferricina
Antitrombóticos	Leche	Casoplatelinas
Quelantes de metales	Leche	Caseinofosfopéptidos
Hipocolesterolémicos	Soya	LPYPR
	Leche	IIAEK
Antioxidantes	Pescado	MY
	Leche	MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI

FUENTE: Segura-Campos *et al.* (2013). A: Ala; R: Arg; N: Asn; D: Asp; C: Cys; Q: Gln; E: Glu; G: Gly; H: His; I: Ile; L: Leu; K: Lys; M: Met; F: Phe; P: Pro; S: Ser; T: Thr; W: Try; Y: Tyr; V: Val.

El uso de péptidos bioactivos como potenciales agentes terapéuticos tiene como ventajas su alta especificidad y su actividad. Esto implica que en general tienen poca toxicidad y efectos secundarios, además que se administran en pequeñas dosis, reduciendo así las cantidades de producto a sintetizar a escala industrial. Asimismo, no se acumulan en el organismo, debido a que poseen una vida media relativamente corta (Borja, 2014).

a. PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), se generan constantemente en los organismos aerobios como resultado de las reacciones metabólicas. Una excesiva producción de ROS puede sobrepasar la actividad antioxidante fisiológica. Como consecuencia de este daño oxidativo, las proteínas, los lípidos y el ADN se convierten en el blanco del ataque de los radicales libres, dañando enzimas, membranas y el material genético (Segura-Campos *et al.*, 2013), además de otros efectos negativos mostrados en la Figura 2.

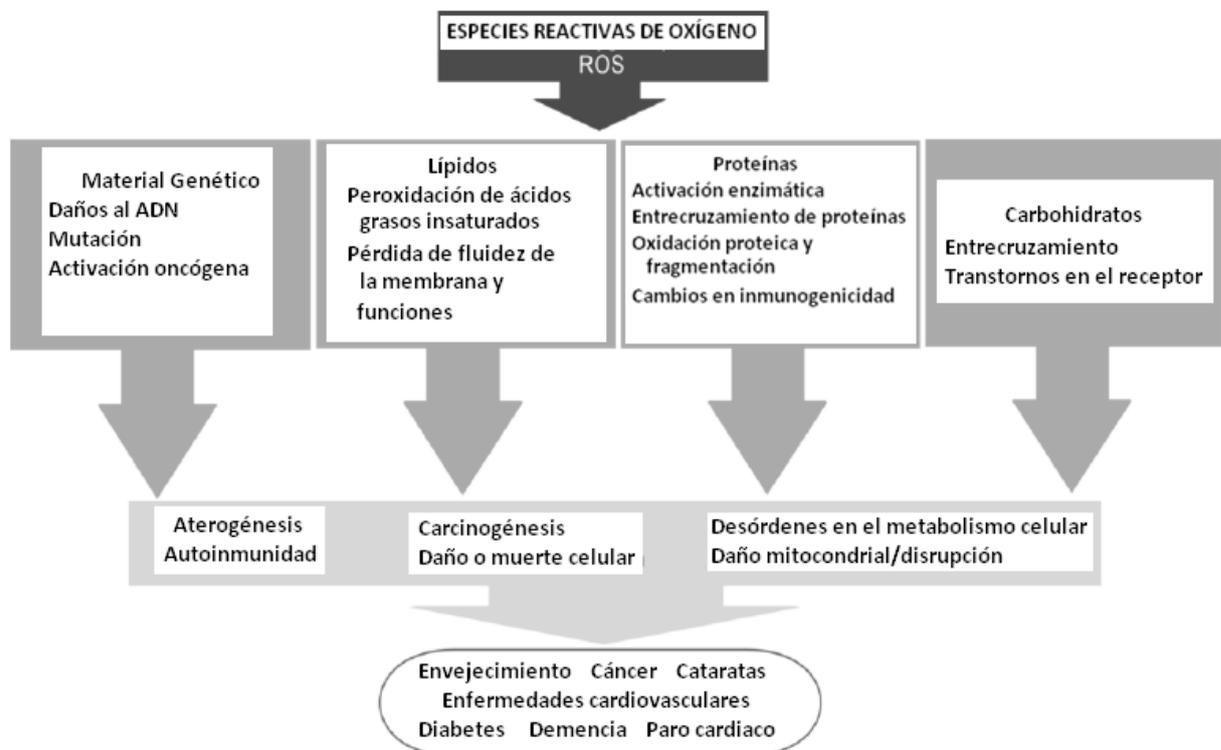


Figura 2: Daño a las moléculas biológicas por especies de oxígeno reactivas que conducen a un mayor riesgo de enfermedades.

FUENTE: Ojiugo (2014)

Para prevenir la peroxidación lipídica en alimentos se han utilizado muchos antioxidantes sintéticos, como el hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), terbutil hidroxiquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG). Sin embargo, debido a los posibles riesgos para la salud asociados con el uso a largo plazo de estos antioxidantes sintéticos, es necesaria la búsqueda de antioxidantes naturales seguros y económicos. En este sentido, los antioxidantes naturales son sustancias en los alimentos que retrasan considerablemente o inhiben la oxidación de otras sustancias cuando se consumen (Girgih *et al.*, 2015).

Segura-Campos *et al.* (2013) señalan que, las secuencias peptídicas antioxidantes de interés podrían presentar efectos sinérgicos o antagónicos con otros antioxidantes y/o metales traza presentes en el alimento así como sistemas biológicos e incluso actuar como pro-oxidantes bajo ciertas condiciones, por lo que estos factores deberían ser considerados cuidadosamente para posibles aplicaciones; y además, comparados con los péptidos aislados puros, los extractos que contienen péptidos crudos o semipurificados son más factibles para su empleo en productos alimenticios.

Varios estudios han reportado que la actividad antioxidante de hidrolizados de proteína y péptidos aislados y preparados de fuentes naturales, en algunos casos es similar o mayor que el BHA, BHT y propilgalato; y además de sus actividades antioxidantes, los hidrolizados de proteínas han demostrado propiedades funcionales interesantes, como una alta solubilidad, lo que resulta en aumentos en la concentración de grupos amino y carboxilo libres (Borja, 2014).

El mecanismo de acción de los péptidos con propiedades antioxidantes está relacionado con la inactivación de ROS, la eliminación de radicales libres, la quelación de los metales de transición prooxidativos y la reducción de hidroperóxidos (Zhou *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que éstos péptidos mantienen las células a salvo de daños por ROS a través de la inducción de genes (Borja, 2014). Se han descrito péptidos antioxidantes que tienen la capacidad tanto de secuestrar radicales libres como de formar complejos con los iones metálicos que catalizan las reacciones de los radicales libres. Estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan a especies reactivas de oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes, es decir, el péptido actúa cediéndole un electrón al radical libre una vez que colisionan en la membrana

plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venéreo, citado por Segura-Campos *et al.*, 2013).

La hidrólisis con enzimas se ha utilizado ampliamente en la producción de péptidos antioxidantes a partir de proteínas alimentarias (Segura-Campos *et al.*, 2013). Es así que se ha encontrado que los péptidos bioactivos de diversas fuentes tales como gliadina de trigo, arveja, proteína de soya (Malaguti *et al.*, 2014) y también proteínas de la yema de huevo, proteínas miofibrilares porcinas y sub productos acuícolas tiene un efecto protector contra el daño oxidativo (Pihlanto, 2006), actuando como captadores de radicales libres y quelantes de iones metálicos contra la peroxidación enzimática y no enzimática de lípidos y ácidos grasos esenciales. Entre ellos, se ha demostrado que la lunasina escinde los radicales peroxil y superóxido, confirmando sus propiedades antioxidantes *in vitro* (García-Nebot *et al.*, 2014). La carnosina y anserina, los cuales son los péptidos antioxidantes más abundantes en carne, se ha reportado que tienen un rol en la prevención de las enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (Hipkiss y Brownson, citado por Cicero *et al.*, 2017). Otros péptidos antioxidantes se han identificado en organismos marinos tales como ostras, cangrejos, calamar y mejillones azules (Harada *et al.*, 2010).

Vignesh *et al.* (2012) señalan que la determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteínas depende de los niveles y la composición de aminoácidos libres y péptidos. La mayoría de péptidos antioxidantes identificados hasta el momento son de cadena corta (5-16 aminoácidos) y contienen aminoácidos hidrofóbicos (Val y Leu) en el extremo N-terminal y Pro, His o Tyr en su secuencias. Las tirosinas contribuyen sustancialmente a la eliminación de radicales libres debido a que sus cadenas laterales fenólicas actúan como potentes donantes de electrones; permitiendo por lo tanto, la terminación de la reacción en cadena del radical (Halim *et al.*, 2016). En los péptidos que contienen His, la actividad antioxidante está en relación con la donación de hidrógeno, captura de radicales peroxilo de lípidos y/o con la capacidad quelante de iones metálicos por parte del grupo imidazol. Asimismo, el grupo SH de la cisteína tiene una acción antioxidante debido a su interacción directa con los radicales, según manifiesta Borja (2014).

b. PÉPTIDOS BIOACTIVOS ANTIHIPERTENSIVOS

Se sabe que la hipertensión es uno de los mayores factores de riesgo para gran número de enfermedades cardiovasculares (ECVs). La hipertensión (presión arterial alta) se caracteriza por un valor de presión arterial sistólica (PA) persistente de ≥ 140 mmHg y una presión diastólica de ≥ 90 mmHg (140/90). Sin embargo, la PA aumenta con la edad y, por lo tanto, solo las personas mayores de 60 años con valores de presión arterial superiores a 150/90 mmHg pueden necesitar tratamiento (Daliri *et al.*, 2017). La enzima convertidora de angiotensina I (ECA - I, hidrolasa peptidildipéptido, EC 3.4.15.1) es una exopeptidasa dependiente de zinc y cloruro, liberadora de dipéptidos y uno de los principales reguladores de la presión sanguínea. Dos formas de ECA - I están presentes en humanos; una ECA - I somática de aproximadamente 170 kDa encontrada en células endoteliales, epiteliales y neuronales y una isoforma testicular más pequeña de un tamaño de aproximadamente 100 kDa que existe en las células germinales (Michaud *et al.*, 2014). De acuerdo con Manoharan *et al.* (2017), la ECA - I también está presente en el plasma además de las formas somática y germinal. La ECA - I somática es necesaria en la regulación cardiovascular, mientras que la ECA - I germinal está involucrada en la reproducción masculina.

La ECA - I participa en varios sistemas, incluyendo el sistema renina-angiotensina (SRA) y el sistema kinina-óxido nítrico. En el SRA, la cascada comienza con la escisión del angiotensinógeno, cuya síntesis principal ocurre en el hígado, pero es capaz de ser sintetizada por el endotelio. A través de la renina (enzima producida a nivel renal y endotelial) se separa un primer producto de degradación compuesto por 10 aminoácidos, la angiotensina I (inactiva), posteriormente a través de la enzima ECA - I es convertida al octapéptido activo angiotensina II (Rosas *et al.*, 2008).

La ECA - I actúa por un lado hidrolizando el decapeptido Angiotensina I para producir Angiotensina II que es vasoconstrictor y por otro degrada el péptido vasodilatador bradiquinina (Segura-Campos *et al.*, 2013). Sin embargo, durante trastornos metabólicos, la operación funcional excesiva del SRA conduce a niveles elevados anormales de angiotensina II en la sangre, que es la principal causa de hipertensión (Aluko, 2015). Esta enzima es la responsable de los efectos vasoconstrictivos, de influenciar a los túbulos renales para la retención de sodio y agua, así como de la liberación de aldosterona (promotora de la

retención de sodio) a partir de la glándula suprarrenal. Luego se libera la hormona antidiurética de la hipófisis por estimulación de la sangre hipertónica, lo que aumenta la reabsorción de agua, el volumen plasmático, el gasto cardiaco y la presión arterial (Figura 3) (Rosas *et al.*, 2008).

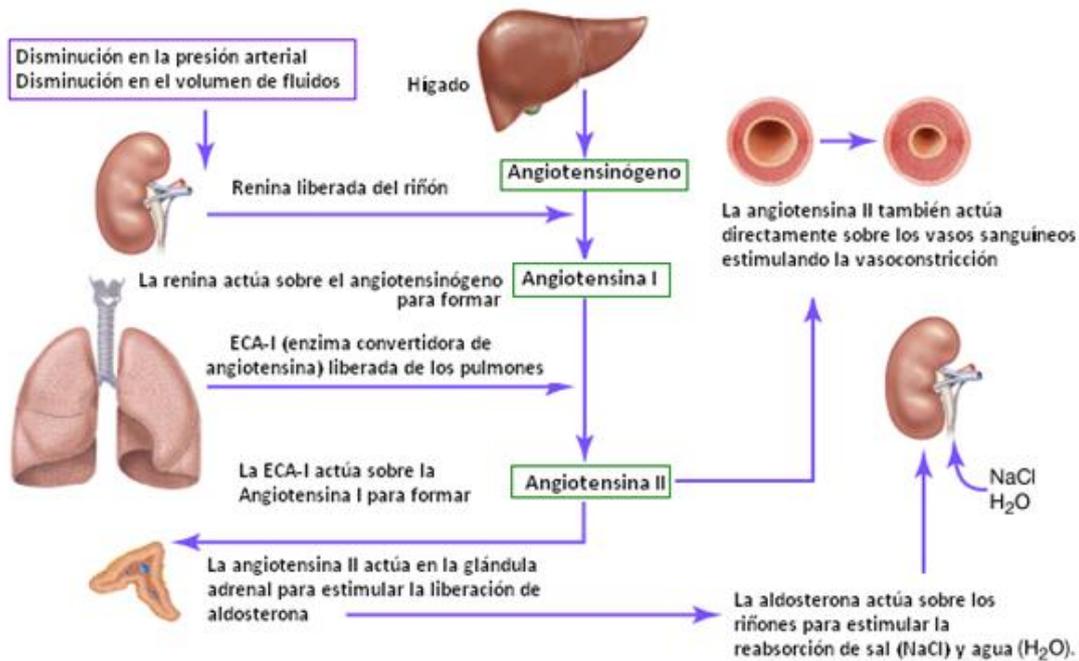


Figura 3: Sistema Renina-Angiotensina.

FUENTE: Adaptado de Encyclopaedia Britannica (2017)

Se conoce que la acción antihipertensiva de algunos péptidos bioactivos se debe a una inhibición competitiva y no competitiva de la ECA - I. Otros presuntos mecanismo de acción se atribuyen al incremento en la actividad de ciertos agentes vasodilatantes, incluyendo el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS); el incremento en la producción de óxido nítrico endotelial y la inhibición de renina, que convierte el angiotensinógeno en angiotensina I e incrementa el sustrato del ECA - I. Además, los péptidos bioactivos pueden actuar reduciendo la actividad del sistema simpático, induciendo la vasodilatación (Aluko, 2015).

Históricamente, la modulación negativa de las actividades enzimáticas del SRA se lograron utilizando varios sintéticos compuestos como Capoten (Captopril), Prinivil (Lisinopril), Vasotec (Enalapril) y Altace (Ramipril) que actúan como fármacos inhibidores de la ECA - I (Aluko, 2015). Los medicamentos de acción rápida con efectos reversibles se administran

como inhibidores competitivos para reaccionar con la ECA - I y causar su inhibición. Sin embargo, cuando se toman regularmente estos productos farmacéuticos pueden tener efectos secundarios adversos, tales como tos, irritación, dolor de cabeza, fiebre, insomnio, entre otros. Por lo tanto, se ha incrementado el interés por la producción y el aislamiento de los inhibidores de la ECA - I naturales derivados de proteínas o péptidos bioactivos (Solís, 2016).

Un fármaco sintético siempre tendrá mayor actividad que un producto natural; sin embargo, los hidrolizados, fracciones peptídicas y péptidos aislados tienen varias ventajas: los hidrolizados no sólo tienen actividad biológica sino que pueden mejorar el aporte nutricional, están constituidos de péptidos con peso molecular similar, que pueden actuar en sinergia en el organismo y además, pueden incrementar la actividad antihipertensiva luego de ser ingeridos (Herrera *et al.*, 2014). El uso de nutracéuticos en el tratamiento o prevención de la hipertensión podría resultar en una reducción de los efectos secundarios típicos de los fármacos convencionales, además de las ventajas económicas en gastos de salud debido a una reducción potencial en las ECVs (Houston, 2013).

Aunque la relación estructura-función de los inhibidores de la ECA - I aún no se encuentra definida, estos presentan algunas similitudes entre ellos. Están compuestos por aminoácidos hidrofóbicos y muchos contienen prolina, lisina o arginina en su C- terminal, medio por el cual el péptido se une al sitio activo de la enzima (Iwaniak y Minkiewicz, 2008). El péptido con secuencia Phe-Ala-Pro en el extremo C-terminal, es el más favorable para unirse al centro catalítico de la enzima (Torruco *et al.*, 2009). De igual forma la mayoría de los péptido inhibidores ECA - I son di- o tripéptidos (Mohanty *et al.*, 2015), que son resistentes a las peptidasas del tracto digestivo y puede ser absorbidos fácilmente hacia la sangre (Iwaniak y Minkiewicz 2008). Otro mecanismo por el cual los péptidos pueden disminuir los niveles de presión arterial se debe a que algunas secuencias de péptidos tienen la capacidad para quelar minerales, los cuales pueden formar sales solubles de fosfato y facilitar la absorción del calcio al impedir su precipitación en el intestino. El consumo de una dieta rica en calcio ha sido relacionado con una disminución de la presión arterial (Quirós del Bosque, 2007).

2.3 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los procesos de producción a escala piloto de péptidos bioactivos utilizan generalmente membranas de ultrafiltración y cromatografía líquida como procesos secuenciales para el fraccionamiento y aislamiento de componentes bioactivos a partir de hidrolizados. El diseño de procesos para la separación de péptidos se basa en propiedades moleculares tales como el tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad que dan información cuantitativa acerca de la relación estructura/actividad (Ramírez, 2015).

2.3.1 ULTRAFILTRACIÓN

Un sistema de ultrafiltración (UF) por membranas puede ser un método útil e industrialmente ventajoso para la obtención de fracciones peptídicas de tamaño molecular deseado y una mayor actividad biológica, dependiendo de la composición del hidrolizado inicial y la actividad que se esté estudiando (Mosquera, 2014).

Las membranas de UF se caracterizan por sus rangos de peso molecular, que varían de 1 kDa a 1000 kDa NMWC (*nominal molecular weight cut off* - límite nominal de peso molecular). Se usan comúnmente para separaciones biológicas y de proteínas o cambio de buffer (diafiltración) y también a lo largo de los procesos modernos de purificación de proteínas (Janson, 2012). Los rangos de *cut off* están relacionados con moléculas globulares, mientras que las moléculas lineales pueden retenerse accidentalmente o no, dependiendo de su orientación relativa a la membrana. Es por ello que el uso secuencial de membranas proporciona información de tamaño por etapas (según los rangos de *cut off*) pero puede multiplicar los problemas mencionados (Fanali *et al.*, 2017).

Estos procesos de separación se basan en la permeabilidad selectiva de uno o más líquidos a través de una membrana de acuerdo con la diferencia de presión. Es así que la UF se aplica comúnmente para preparar soluciones enriquecidas de péptidos a partir de hidrolizados de proteínas para mejorar su bioactividad; empleándose para separar péptidos con un tamaño inferior a 7 kDa (Ramírez, 2015).

La UF es una técnica que ha sido empleada con éxito para la obtención de fracciones abundantes de péptidos con actividad antihipertensiva procedentes de proteínas lácteas (Ramírez, 2015), en el fraccionamiento y la caracterización funcional de los hidrolizados de gelatina de túnica de calamar o cobia y también como un primer paso en el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos procedentes de colágeno y otras fuentes proteicas (Mosquera, 2014).

Sin embargo, un problema importante en la ultrafiltración es la pérdida de flujo de permeación causada por el *fouling* debido a la adsorción de moléculas biológicas como las proteínas. El *fouling* en ultrafiltración se define como la acumulación de algunos componentes en la superficie de la membrana o dentro de los poros de la misma (Herrero, 2010).

Este fenómeno puede evitarse o bien reducirse si las interacciones entre el soluto y la superficie de la membrana se minimizan mediante la disminución de la afinidad de la proteína con la membrana. Esto podría hacerse por ejemplo mediante el control del nivel de pH. Cualquiera de las partículas en la muestra puede provocar el *fouling* y su impacto dependerá de sus características y concentración, así como también influirán las propiedades de la membrana tales como el tamaño de poro, la hidrofobicidad, el modo de funcionamiento y el flujo aplicado (Herrero, 2010).

2.3.2 MÉTODOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EMPLEADOS EN PROTEÍNAS

Las técnicas líderes en la separación de mezclas de proteínas y otros tipos de materia, son los procesos cromatográficos. La cromatografía es un término general que engloba diferentes métodos de separación físico-químicos (Müller, 2008). Existen varias técnicas cromatográficas con diferentes selectividades para la purificación de biomoléculas, especialmente la separación de proteínas. En general, una separación cromatográfica depende de la partición diferencial de proteínas entre la fase estacionaria (medio cromatográfico o adsorbente) y la fase móvil (buffer o solvente orgánico). Se emplean varios métodos de cromatografía líquida para la separación de proteínas. Ellos difieren

principalmente en el tipo de fase estacionaria empleada, tal como se muestra en el Cuadro 5 (Fanali *et al.*, 2017).

La columna cromatográfica representa un método simple de análisis utilizado generalmente para la determinación del peso molecular o tamaño de proteínas y para la desalinización o separación de compuestos de bajo y alto peso molecular. Además, es un método adecuado para la purificación inicial previo al aislamiento de enzimas (Sorensen *et al.*, 2007).

Cuadro 5: Tipos de cromatografía y materiales cromatográficos para la separación de proteínas

TIPO DE SEPARACIÓN	TIPO DE CROMATOGRAFÍA
Tamaño y forma	Filtración en gel (FG) / Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)
Carga neta	Cromatografía de intercambio iónico
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)/ Cromatografía de fase reversa (RPC)
Función Biológica	Cromatografía de afinidad (AC)
Interacción con ligandos	Cromatografía de pseudoafinidad
Unión de metales	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC)
Otros	Cromatografía en hidroxiapatita (HT/HTP)

Inorgánico	Polímeros sintéticos orgánicos	Polisacáridos
Sílica porosa	Poliacrilamida	Celulosa
Vidrio con poros	Polimetacrilato	Dextran
Hidroxiapatita	Poliestireno	Agarosa

FUENTE: Fanali *et al.* (2017)

La selectividad de los materiales en SEC depende solamente de su porosidad. Consecuentemente, una matriz apropiada para SEC es un soporte con propiedades adsorptivas

reducidas tales como polímeros naturales (en su mayoría agarosa o dextrano) y sintéticos (mayormente poliacrilamida) o su combinación, o el medio frecuentemente usado Sepharosa. El tamaño del poro de los materiales cromatográficos (p.e. Sephadex) depende del grado de entrecruzamiento en el polímero particular. Predominantemente, la cubierta de grupos hidroxilo es favorable para el uso en el fraccionamiento de proteínas hidrofílicas. Luego de la adición de agua, algunos polímeros tales como agarosa, forman geles espontáneamente. Para prevenir la desnaturalización de las proteínas, la sílica macroporosa, usada como soporte para SEC, debe ser cubierta con una capa hidrofílica protectora (Fanali *et al.*, 2017).

Los biogeles son producidos por co-polimerización de la acrilamida con la N,N metilen bisacrilamida para formar una poliacrilamida entrecruzada. La porosidad varía en función de las diferente proporción del agente entrecruzante resultando en un rango de geles denotados como Bio-Gel P-2, P-10, P-20, P-30, P-100, etc, donde el número se refiere al límite de exclusión aproximado $\times 10^{-3}$; es así que el Bio-Gel P-20 tiene un límite de exclusión de alrededor de 20 kDa, el cual se refiere al peso molecular de la proteína globular, que teóricamente, es excluida completamente del gel (Dennison, 2013). Estos geles son extremadamente hidrofílicos y libres de carga, y proveen una filtración eficiente de compuestos sensibles, además su composición sintética y ausencia de impurezas solubles evita la contaminación del eluato (Bio-Rad, 2000).

El mecanismo de separación SEC implica que el volumen de elución, o el tiempo de retención, resulta absolutamente esencial para el análisis. Esto requiere instrumentos de alto rendimiento para garantizar la precisión y la reproducibilidad. Son adecuadas las bombas isocráticas o las bombas de gradiente en modo isocrático, por lo que se pueden utilizar los detectores de índice de refracción (RI), así como los detectores UV o DAD, más convencionales. Contrario al medio cromatográfico, la selectividad de la matriz SEC no depende del ajuste de la composición de la fase móvil. Para preservar la estructura y actividad biológica de la proteína, la muestra requiere a veces una solución buffer de pH y composición iónica definida. Sin embargo, un concentración muy alta o baja de sales en la fase móvil debe evitarse para prevenir la interacción indeseable de la proteína con el soporte (Fanali *et al.*, 2017).

Comparado con otros métodos cromatográficos, tanto la capacidad como resolución en SEC son relativamente bajas; sin embargo, la SEC es un método útil y simple para la separación de polímeros. Una ventaja de este enfoque es la elevada actividad biológica de las proteínas luego de la SEC debido a la ausencia de interacciones de superficie del analito con el soporte cromatográfico. Algunas veces, este método también se usa como paso final cuando el volumen de muestra es bajo (Fanali *et al.*, 2017). Como se aprecia en la Figura 4, en este método cromatográfico, el analito no interactúa con la superficie de la fase estacionaria.

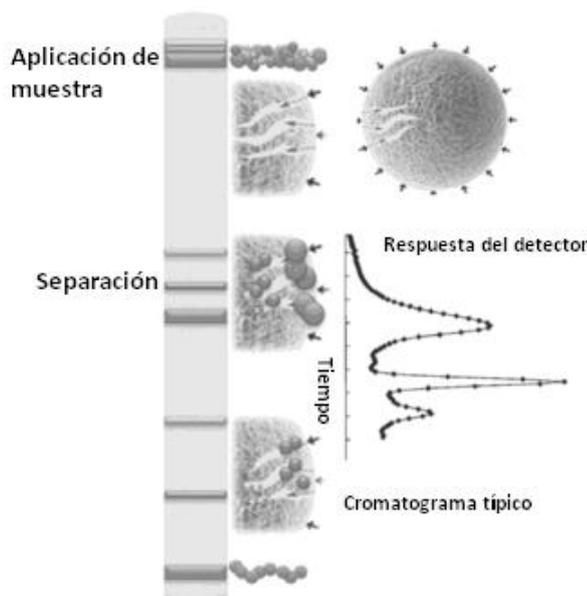


Figura 4: Principios de la cromatografía por exclusión de tamaño.

FUENTE: Adaptado de Fanali *et al.* (2017)

La separación se logra por el diferencial de penetración y exclusión de los componentes de la muestra dentro y fuera de los poros del material de empacado. Las partículas de diferentes tamaños eluyen a diferentes velocidades. Las moléculas pequeñas, que pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria, eluyen después. Por otro lado, una molécula muy grande, que no puede penetrar en el sistema poroso, eluye antes, en el volumen muerto de la columna. Las moléculas de tamaño intermedio, las cuales penetran parcialmente los poros de la fase estacionaria, eluyen en un tiempo intermedio, entre las moléculas grandes y pequeñas.

2.3.3 ELECTROFORESIS

La electroforesis es el transporte de iones en soluciones bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. Las soluciones conteniendo los compuestos cargados requieren ser

incluidos en un medio de soporte. Se pueden preparar geles de poliacrilamida como planchas entre placas de vidrio, que se mantienen distanciadas por separadores, o en columnas. El medio de soporte se coloca en contacto con electrodos, y un campo eléctrico aplicado fuerza a los compuestos cargados a moverse; los aniones hacia el ánodo y los cationes hacia el cátodo. Las partículas migran en función de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Sorensen *et al.*, 2007).

La velocidad de migración de un ión depende de la fuerza ejercida por el campo eléctrico y la fuerza de rozamiento que ejerce el entorno sobre la partícula. Cuando se activa el campo eléctrico, la molécula se acelera rápidamente hasta alcanzar una velocidad en la que estas fuerzas se equilibran, moviéndose posteriormente a esa velocidad de forma constante (Nelson y Cox, 2015).

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Campuzano, 2006).

La electroforesis separa la proteína de acuerdo a su peso molecular. Si el peso molecular de la proteína objetivo es conocido, se puede cortar la posición de la banda aproximada en el gel y utilizarse para un análisis posterior como la espectrometría de masas (Lee, 2017). Los geles de acrilamida sirven como un tamiz de selección de tamaño durante la separación. A medida que las proteínas se mueven a través de un gel en respuesta a un campo eléctrico, las moléculas más pequeñas viajan más rápidamente que las proteínas más grandes, tal como se muestra en la Figura 5. Dado que las moléculas de una muestra no pueden abandonar el gel, el movimiento electroforético de las más grandes se ve impedido en comparación con el de las más pequeñas (Voet y Voet, 2006).

Sobre la base de los buffer empleados, la electroforesis se puede clasificar de dos formas: sistemas de buffer continuo y sistema de buffer discontinuo. El sistema de continuo, usan el mismo buffer (a pH constante) en los depósitos de gel, muestra y electrodo. Las muestras se cargan en pozos y las proteínas que están más cerca del gel entran primero. Esto proporciona una matriz de separación uniforme, pero produce bandas de proteína difusas y sin resolución. Los sistemas continuos rara vez se utilizan para la electroforesis de proteínas, pero se utilizan comúnmente para el análisis de ácidos nucleicos (McLellan, 1982).

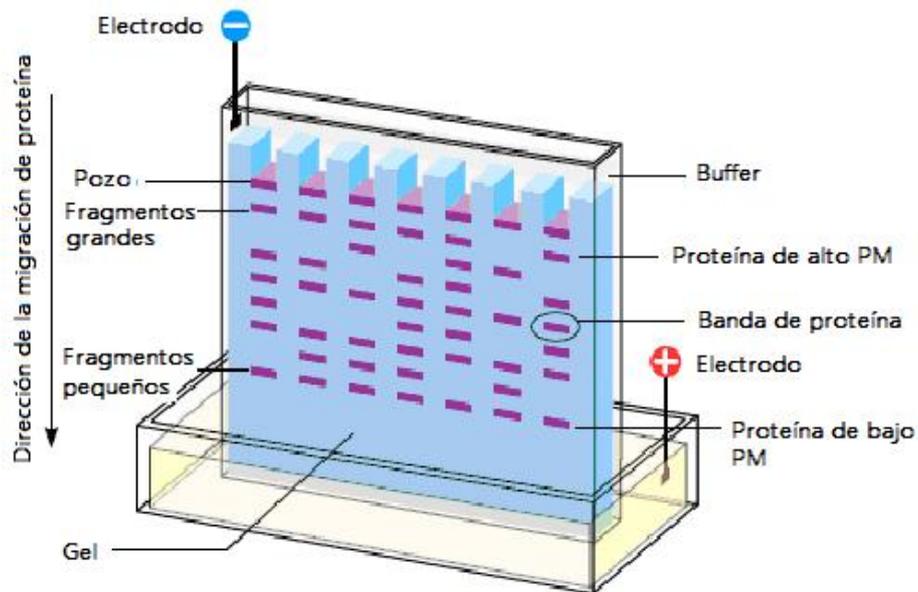


Figura 5: Esquema de la separación electroforética de proteínas en un gel de poliacrilamida.

FUENTE: Bio-Rad (2012)

Por otro lado, los sistemas de buffer discontinuos utilizan dos tipos de geles, el gel de concentración, de mayor diámetro de poro, y el gel de separación, de menor diámetro, que presenta una mayor resistencia al desplazamiento de los componentes a través del gel. La función del gel de concentración es acumular ordenadamente los distintos componentes de la muestra en la interfase entre los dos geles, lo que aumenta sensiblemente la resolución en el segundo gel, en el cual se lleva a cabo la separación de las proteínas en función de su masa molecular. El gel de concentración tiene un bajo porcentaje de acrilamida para que la exclusión molecular sea mínima y el pH es diferente al del gel de separación. Al aumentar la concentración de acrilamida el tamaño del poro efectivo disminuye (Wheeler *et al.*, 2004).

Las proteínas migran rápidamente a través del gel de concentración de poro grande y luego se ralentizan a medida que ingresan al gel de resolución de poro pequeño. Las proteínas se apilan una encima de la otra para formar una banda apretada, lo que ayuda a mejorar la resolución. Los sistemas de buffer discontinuos proporcionan una resolución más alta que los sistemas continuos, y la variación de los buffers utilizados en las cámaras de muestra, gel y electrodo crea una variedad de sistemas buffer discontinuos que se pueden utilizar para una variedad de aplicaciones (Moreno, 2016).

El fundamento del sistema discontinuo se esquematiza en la Figura 6. La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones cloruro Cl^- del gel y la movilidad del ión glicina Gly^- del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles (Maldonado y Jorrín, 2010).

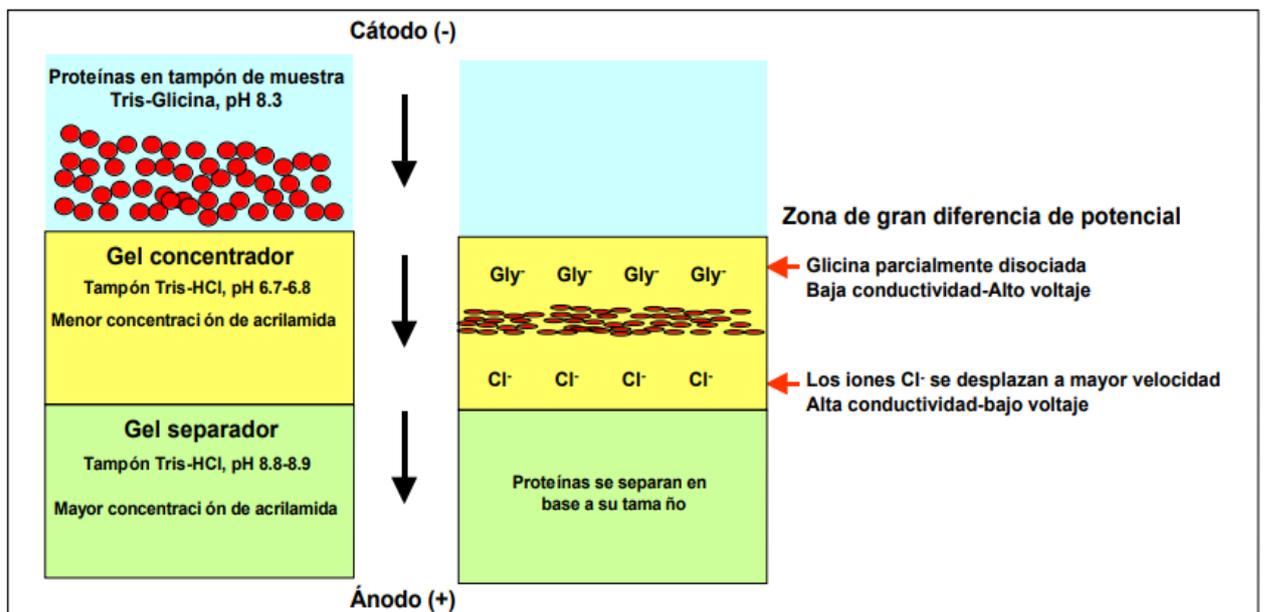


Figura 6: Esquema del sistema de electroforesis discontinuo.

FUENTE: Maldonado y Jorrín (2010)

Atendiendo al estado de la proteína al momento de realizar la electroforesis, podemos encontrar dos tipos, la nativa o no desnaturizante y la desnaturizante. La electroforesis nativa o en condiciones no desnaturizantes (PAGE nativa), es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen, en ciertos casos, las interacciones entre subunidades y entre proteínas. Las proteínas se mantienen en una solución amortiguadora no reductora - no desnaturizante con lo que se asegura que las proteínas mantienen su estructura secundaria y densidad de carga nativa (Arndt *et al.*, 2012).

Los sistemas amortiguadores empleados en estos casos son: tris-glicina (pH 8.3 a 9.5), tris-borato (pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (pH 7.2 a 8.5) (Pérez *et al.*, 2015). La carga nativa se conserva y las proteínas pueden migrar hacia cualquier electrodo, pero produce patrones de separación impredecibles que no son adecuados para la determinación del peso molecular. Sin embargo, la PAGE nativa permite la separación de proteínas en su estado activo y puede resolver proteínas del mismo peso molecular (Vavricka, 2009).

Para superar las limitaciones de los sistemas PAGE nativos, Laemmli en 1970 incorporó el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) en un sistema discontinuo de buffer desnaturizante, creando lo que se ha convertido en la forma más popular de electroforesis de proteínas, la SDS-PAGE (Bio-Rad, 2012). En SDS-PAGE, las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida en función de su peso molecular. Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, tienen cargas positivas y negativas. Para hacer que se muevan en una sola dirección, se crea una carga negativa uniforme en ellos. Cuando las proteínas se mezclan con SDS, adquieren una carga neta negativa.

El SDS es un detergente que tiene una carga negativa (aniónico), el cual desnaturiza las proteínas nativas al alterar las fuerzas no covalentes, que incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y iónicas que son responsables de la estructura tridimensional de una proteína nativa (Saraswathy y Ramalingam, 2011). Dado que el SDS está cargado negativamente, enmascara la carga intrínseca de la proteína a la que se une, estableciendo una relación de carga-masa similar para todas las proteínas en una mezcla, ya que la SDS se une a una tasa constante de 1,4 g de SDS por 1g de proteína SDS (una estequiometría de aproximadamente una molécula de SDS por dos aminoácidos); proporciona además una

conformación larga tipo varilla en las proteínas en lugar de una forma terciaria compleja (Bio-Rad, 2012).

Cuando las proteínas se separan en presencia de SDS y agentes desnaturizantes, se desnaturalizan por completo y se disocian entre sí, tal como se muestra en la Figura 7 (Bio-Rad, 2012).

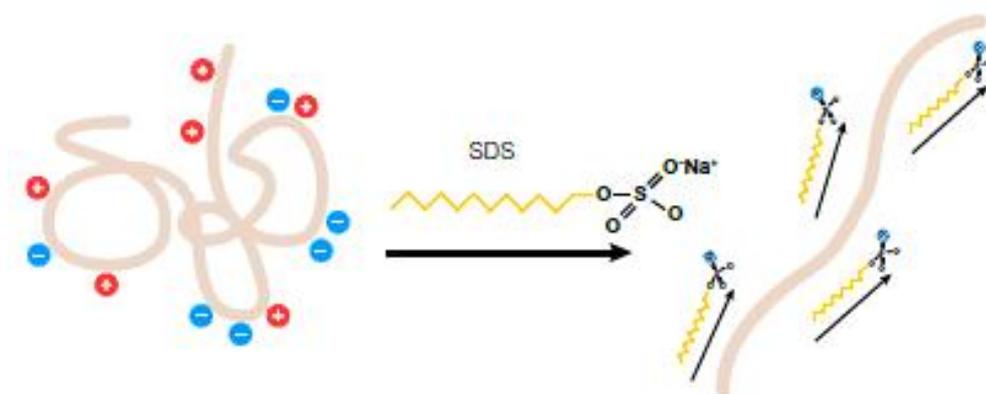


Figura 7: Efecto del SDS en la conformación y carga de una proteína.

FUENTE: Bio-Rad (2012)

Las moléculas de proteína lineal desnaturizadas se cargan en el gel de poliacrilamida (PAGE) que se prepara polimerizando los monómeros de acrilamida, bisacrilamida, tetrametilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (APS) y buffer Tris-HCl (Saraswathy y Ramalingam, 2011). El sistema Laemmli original incorporó SDS en los geles y buffers, pero no se requiere SDS en el gel. La SDS en el buffer de muestra es suficiente para saturar las proteínas, y el SDS en el buffer de cátodo mantiene la saturación de SDS durante la electroforesis (Bio-Rad, 2012).

Cuando se ha completado una electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, entonces se pueden ‘revelar’ mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Las proteínas coloreadas como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo c, pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo, la visualización de la mayoría de las proteínas requiere del uso de colorantes, por ello se utiliza la tinción con plata, azul de Coomassie o reactivos fluorescentes. El Coomassie es un colorante textil de triarilmetano que se une a los grupos amino de las proteínas en solución ácida. Los beneficios de esta tinción son su fácil uso, bajo coste y la alta compatibilidad que presenta

con el análisis de espectrometría de masas (Carrillo *et al.*, 2013). Según Berg *et al.*, (2008), cuando se tiñe con azul de Coomassie, basta 0.1 µg de proteína de una proteína para dar una banda diferenciada, además señala que las fracciones iniciales mostrarán desde docenas hasta centenares de proteínas pero conforme progresa la purificación, el número de bandas disminuirá.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en los laboratorios del Área de Biotecnología Industrial y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2 MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Concentrado proteico de cañihua Cupis (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) con un contenido de proteína en base seca de 71.95 por ciento, obtenido de harina desgrasada con un contenido de proteína de 17.6 % en base seca, provenientes de la estación agronómica experimental INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) Puno, Perú.
- Alcalasa® 2.4 L (2.4 UA/g de proteína) (Novozyme)
- Neutrasa® 5.0 BG (5 UA/g de proteína) (Novozyme)

3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1 MATERIALES

- Columna de vidrio para cromatografía de filtración en gel (CFG) (1.5 x 100 cm)
- Columna analítica de fase reversa (RP) para cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) Kinetex 1.7 µm HILIC C18 (2.1 mm x 100 mm), pre columna AJO-8786 Phenomenex.
- Material de vidrio diverso: Embudo Büchner, beakers, matraces, fiolas, pipetas, etc.)
- Micropipetas (20-200µL, 100-1000 µL y 0.5-5 mL) (Brand, Alemania)

3.3.2 EQUIPOS

- Agitador magnético (Cat, Modelo M6, Alemania)
- Agitador Vortex (VELP scientific, modelo F202A0175, Alemania)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2140, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS, modelo Scout, China)
- Baño maría con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuumbrand. Modelo ME2C, Alemania)
- Bomba peristáltica (Cole Pamer Instrument Co. Masterflex LIS, USA)
- Cabina de secado con flujo de aire recirculado (Fravil, Perú)
- Cámara de electroforesis, Minigel (Biometra, Göttingen, Germany)
- Cassette Pellicon XL 10 kDa (Merck Millipore, USA)
- Cassette Pellicon XL 3 kDa (Merck Millipore, USA)
- Centrífuga (Hettich. Modelo Rotofix 32, Alemania)
- Cocina eléctrica (Ingesa, Perú)
- Colector de fracciones universal (Eldex Laboratories, USA)
- Congelador (Electrolux, modelo GLFC1326FW1, Canadá)
- Sistema Acquity UPLC (Waters Associates, H-Class. USA) con detector Acquity UPLC PDA (Waters Associates, USA)
- Densitómetro de geles (GS-900TM, BioRad, USA)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10 UV, USA)
- Fuente de energía, PS600 (Hoefer, Holliston MA, USA)
- Placa de electroforesis 10.5 cm x 10 cm
- Potenciómetro digital (Thermo Orion, modelo 410, USA)
- Refrigeradora (LG, modelo GR-482BEF, Corea)

3.3.3 REACTIVOS

- Acetonitrilo (Fermont, México)
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico 37 por ciento (J.T. Baker, México)
- Ácido etilendiamina tetracético EDTA 2 Na, grado BM (Calbiochem, USA)
- Ácido hipúrico 98 por ciento (Sigma Aldrich, India)

- Ácido picrilsulfónico 5por ciento (Sigma Aldrich, India)
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Acrilamida para electroforesis, grado BM (Merck, Alemania)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Aldrich, India)
- Alcohol etílico PA (J.T. Baker, USA)
- Azida sódica (Sigma Aldrich, India)
- Azul Brillante Coomassie G 250 para electroforesis (Merck, Alemania)
- Bio-Gel P-2 (Bio-Rad, USA)
- Bis-Acrilamina (Acrilamida N-N metil-ene-bis) (Sigma Aldrich, 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)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA) (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)
- Glicerol (Calbiochem, USA)
- Glicina 99 por ciento, grado BM (Calbiochem, USA)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker, México)
- Marcador de peso molecular para polipéptidos 161-0326 (Bio-Rad, CA, USA):
Triosafosfatoisomerasa 26.625 kDa, Mioglobina 16.950 kDa, α -Lactalbúmina 14.
437 kDa, Aprotinina 6.512 kDa, Insulina b oxidada 3.496 kDa y Bacitracina 1.423
kDa
- Mercaptoetanol, beta, grado BM (Merck, Alemania)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratado 98por ciento (Sigma Aldrich, India)
- Persulfato de amonio (Omnipur, USA)
- SDS (Lauril sulfato de sodio), grado BM (Merck, Alemania)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99por ciento (Sigma Aldrich, USA)
- Tricina (Sigma Aldrich, USA)
- Tris Base, grado BM (Calbiochem, USA)
- Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) (Sigma Aldrich, India)

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

La humedad se determinó por el método AOAC (930.15, 1995), que se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa al vacío. Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL

La proteína cruda se determinó por el método AOAC (920.87, 1995), que 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 que 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. El contenido de nitrógeno total se convirtió a contenido de proteína al multiplicarse por el factor 5.85 empleado en el caso de cereales (Shoenlechner *et al.*, 2008). Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Se determinó según la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951), que se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría. Para esto se mezclaron 400 μL de la muestra hidrolizada con 2 mL de la solución de reacción de Na_2CO_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 μL 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. El blanco se preparó substituyendo la muestra hidrolizada por 400 μL de una solución acuosa de cloruro de sodio al 0.9 por ciento. La cantidad de proteínas en la muestra se estimó a partir de una curva

estándar de una solución proteica estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) en un rango de concentración de 0.5 - 3 mg/mL (Anexo 1). Los resultados se expresan en mg de BSA/mL.

3.4.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis del hidrolizado (por ciento, GH) se determinó mediante el método de Adler-Nissen (1979), basado en la determinación de los grupos amino libres con ácido 2,4,6-trinitrobenzenilsulfónico (TNBS). Las aminas primarias, al reaccionar con el TNBS forman un cromógeno que puede ser medido a 340 nm. Para esto, 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 baño María. La reacción se detuvo agregando 1mL de HCl 0.1N y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se agregó 2 mL de agua destilada y se dejó reposar por 10 minutos más, antes de leer la absorbancia a 340 nm. Los resultados se determinaron empleando 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 2). Se preparó el blanco sustituyendo la muestra por 0.63 mL de solución de SDS al 1 por ciento en agua. Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación:

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

Donde:

GH: grado de hidrólisis

AN₁: 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).

AN₂: 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.

3.4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS

Se determinó la actividad antioxidante utilizando el método de ABTS⁺ (Torruco *et al.*, 2009), que se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS⁺, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS⁺ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS⁺ (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Este ensayo se realizó preparando la solución A: 7 mM de ABTS⁺ y la solución B: 25.4 mM de K₂S₂O₈, 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 (Solución madre).

Luego del tiempo transcurrido, se preparó la solución diluida de ABTS⁺ en buffer fosfato salino (PBS), el cual está compuesto por 8.18 g/L de NaCl, 0.27 g/l de KH₂PO₄, 1.42 g/L de Na₂HPO₄, 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 ± 0.03 a 734 nm. Para la medición de la actividad antioxidante se tomaron 40 μ 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 TE/L (Anexo 3) y fueron expresados en μ mol de trolox equivalente (TE)/mg de proteína. Asimismo, se preparó el blanco usando PBS en reemplazo de la muestra.

3.4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

La actividad inhibitoria se determinó por el método de Wu *et al.* (2002), utilizando como sustrato el hipuril-histidil-leucina (HHL) donde se determinó la cantidad de ácido hipúrico. 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 enzima convertidora de angiotensina (ECA - I) fue disuelta en 0.5 mL de BBS.

La reacción se realizó mezclando en tubos de reacción, 50 µL de solución de HHL 2.17 mM, 10 µL de muestra de hidrolizado proteico a analizar (muestras diluidas a concentraciones de 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 y 1.0 mg/mL en BBS) y 10 µL de solución de ECA - I. Se incubó con agitación durante 30 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida con la adición de 80 µL de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco. El control consiste en la determinación de la actividad absoluta de ECA - I sobre el sustrato HHL, que resulta en la formación de ácido hipúrico (HA), para lo cual se reemplazaron los 10 µL de muestra proteica hidrolizada por 10 µL de BBS y la reacción se realizó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para la preparación del blanco se usó la ECA - I 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 µM y analizadas mediante UPLC (Acquity), usando una columna Kinetex C₁₈ en RP. Se trabajó bajo un gradiente compuesto por: solvente A (0.05 por ciento de TFA en agua) y solvente B (0.05 por ciento de TFA en acetonitrilo). La corrida se realizó a 30°C, bajo un flujo de 0.5 mL/min y los resultados (ácido hipúrico) fueron monitoreados a 229 nm. El tiempo de corrida fue de 8 minutos. La actividad inhibitoria ECA - I fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria ECA - I (por ciento)} = [(Ac - As)/(Ac - Ab)] \times 100$$

Donde:

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

As: concentración de HA de la muestra

Ab: concentración HA del blanco

3.4.8 DETERMINACIÓN DEL IC₅₀

El IC₅₀ se define como la concentración de hidrolizado proteico que permite una inhibición del 50 por ciento de la actividad ECA - I expresada en mg proteína/mL. Se utilizó el método de Barbana y Boye (2011). Se evaluaron concentraciones en un rango de 0.1 a 1 mg proteína/mL. Los resultados se expresaron en mg/mL y se determinaron mediante un análisis

de regresión de la inhibición de ECA - I (porcentaje) frente al logaritmo de la concentración proteica (mg proteína/mL).

3.4.9 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Se empleó el método SDS-PAGE discontinuo reportado por Schägger y Von Jagow (1987), el cual emplea tricina, para permitir una mejor resolución de los péptidos pequeños a concentraciones de acrilamida más altas que en los sistemas SDS-PAGE con glicina, logrando una resolución superior de proteínas sin el uso de úrea, especialmente en el rango de 5 a 20 kDa.

Para la preparación de los geles, la solución de acrilamida preparada fue de 49.5 por ciento T, 3 por ciento C, donde T denota la concentración total en porcentaje de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida) y C denota la concentración en porcentaje del entrecruzador relativo a la concentración total T.

El gel de separación se preparó a partir de 2.5 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida, 2.5 mL de buffer para gel (3 M de Tris Base, pH de 8.45 ajustado con HCl concentrado), 1 mL de glicerol, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 10 por ciento, completando con agua milliQ para alcanzar una concentración final de acrilamida de 16.5 por ciento T y 3 por ciento C. Esta mezcla se vertió entre las placas de electroforesis, luego de lo cual se cubrió con una capa de agua milliQ hasta conseguir su polimerización (aproximadamente 30 minutos).

El gel de concentración fue preparado con 0.2 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida (para alcanzar 4 por ciento de T y 3 por ciento de C), 0.62 mL de buffer para gel, 1.62 mL de agua milliQ, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 10 por ciento. Esta mezcla se vertió sobre el gel de separación previa eliminación del agua añadida, y se colocó el peine y se dejó polimerizar por 10 minutos aproximadamente. Posteriormente fue almacenado a 4°C, hasta su uso.

Las tres muestras fueron tratadas por separado, los microlitros de muestra conteniendo 1 µg de proteína fueron mezclados con buffer de muestra Tris-Tricina para alcanzar un volumen de 12 µl (2.4mL de glicerol, 0.2 mL de mercaptoetanol, 1 mL de SDS 10 por ciento, 2.0 mL Tris HCl 0.5 M pH 6.8 y 0.4 mL de azul de Coomasie G-250 al 0.5 por ciento); respecto al marcador de peso molecular, se utilizó 1 µl de este y 4 µl de buffer muestra. Tanto la muestra como el marcador de peso molecular fueron calentados a 95°C por 5 minutos, para luego ser enfriados antes de su aplicación al gel. Se aplicó 10 µl de muestra a cada pocillo y 5 µl de la mezcla conteniendo al marcador de peso molecular.

Para la corrida electroforética se utilizó una solución buffer para el ánodo, conteniendo Tris 0.2 M, pH 8.9 ajustado con HCl concentrado; y para el buffer del cátodo Tris 0.1 M y Tricina 0.1 M, en SDS 0.1 por ciento, pH 8.25.

La corrida electroforética se realizó a 120 V durante 9 horas, a 4 °C. Concluida la corrida el gel de concentración fue eliminado y el gel de separación se colocó en una solución de fijación (metanol al 40 por ciento y ácido acético al 10 por ciento, en agua) por 30 minutos. Luego el gel se tiñó con azul de Coomassie G-250 (0.25 por ciento en ácido acético al 10 por ciento en agua) por 1 hora y finalmente se procedió a su decoloración en una solución decolorante (10 por ciento de ácido acético en agua) hasta visualizar las bandas de proteína. Para la determinación del peso molecular se utilizó la captura de imagen de la corrida electroforética, utilizando un densitómetro para geles (GS-900™ BioRad) y el procesamiento de datos se realizó con la ayuda software integrado al densitómetro, ImageLab™ Software.

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se siguió se muestra en la Figura 8. La purificación y caracterización de los péptidos provenientes de hidrolizados de proteínas de cañihua se realizó en cuatro etapas que se detallan a continuación: obtención de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la cañihua, separación por ultrafiltración, separación por cromatografía de filtración en gel y caracterización mediante electroforesis.

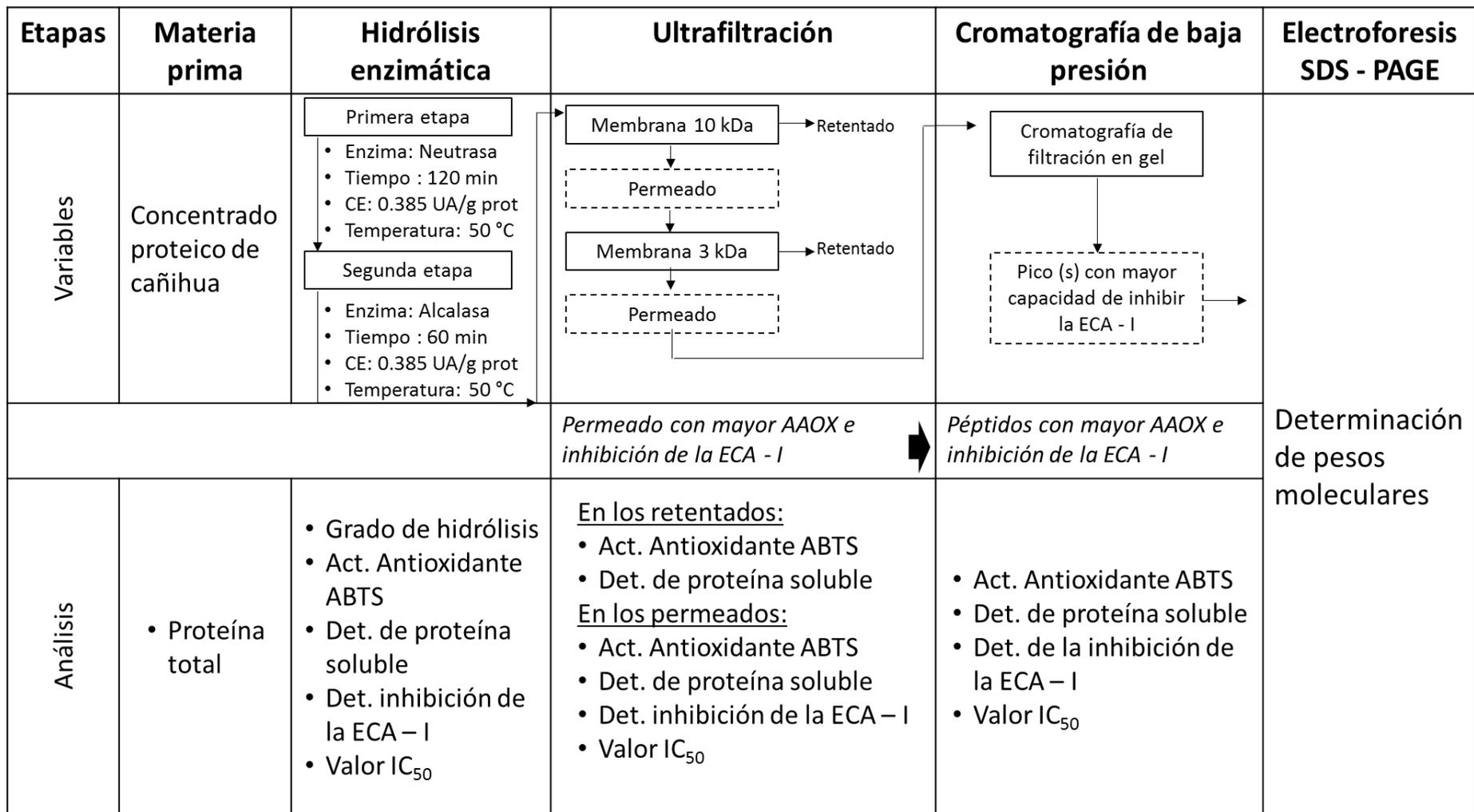


Figura 8: Diseño experimental para la caracterización de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antihipertensiva.

3.5.1 OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO PROTEICO A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA

Para la hidrólisis del concentrado proteico de cañihua (CPC) se utilizó la metodología de Ochoa (2017). Se llevó a cabo una hidrólisis secuencial con dos enzimas de grado alimentario con diferentes mecanismos de acción: a) Neutrasa® (termolisina, metaloproteasa) y (Alcalasa®) (subtilisina, serina endopeptidasa). El CPC se mezcló con buffer borato 0.2 M a pH 8.3 para Alcalasa® y buffer fosfato 0.2 M a pH 7.0 para Neutrasa®, a una concentración de concentración de 2.5 por ciento de la relación proteína: buffer (p/v). En el Cuadro 6 se resumen los parámetros empleados en la hidrólisis enzimática.

Cuadro 6: Concentración y parámetros empleados en la hidrólisis

Enzima/reacción	Concentración de enzima	pH inicial y Temperatura
Primera etapa Neutrasa®	0.385 UA*/ g de proteína	7.0 y 50 °C
Segunda etapa Alcalasa® (Neutrasa y Alcalasa)	0.385 UA/g de proteína	8.3 y 50 °C

*: Unidades Anson (UA)

La reacción se realizó en un proceso de dos etapas. En la primera etapa de la hidrólisis, el CPC se homogenizó con buffer fosfato a pH 7 a 50°C bajo agitación constante a 300 RPM, seguida de la adición de la solución enzimática de Neutrasa® (0.385 UA) que se dejó actuar hasta los 120 minutos, momento en el cual se agregó la solución enzimática de Alcalasa® (0.385 UA) y se dejó actuar por 60 minutos adicionales. Concluido el tiempo de la reacción, la mezcla fue inactivada en agua a 100 °C por 10 minutos. Se centrifugó el hidrolizado a 10,000 RPM por 10 min, recuperándose el sobrenadante (conteniendo los péptidos) que fue conservado a -20 °C hasta su evaluación para determinar el GH (por ciento), proteína soluble (mg/mL), actividad antioxidante (ABTS⁺), actividad ECA - I (por ciento) y el valor IC₅₀ (mg/mL). El hidrolizado obtenido pasó luego al proceso de purificación: por ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel y electroforesis.

3.5.2 SEPARACIÓN POR ULTRAFILTRACIÓN

En esta etapa se procedió a pasar el hidrolizado proteico de cañihua por un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de tamaño de corte (*cut off*) de 10 y 3 kDa de forma secuencial.

Luego de pasar por la membrana de 10 kDa se obtuvo dos fracciones: permeado y retentado. Seguidamente, el permeado, donde se encontrarían péptidos de tamaño menor a 10 kDa fue sometido a una segunda ultrafiltración por una membrana de 3 kDa para obtener permeado y retentado. A los permeados y retentados (de 10 y 3 kDa, respectivamente) se les determinó el contenido de proteína soluble y actividad antioxidante ABTS⁺ y sólo a los permeados, la actividad inhibitoria ECA - I y el valor IC₅₀. El permeado obtenida con el *cut off* de 3 kDa prosiguió con la siguiente etapa de purificación por cromatografía de filtración en gel.

3.5.3 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

La cromatografía de baja presión se realizó mediante la técnica de cromatografía de filtración en gel (CFG). El permeado obtenido de la membrana de 3 kDa (item 3.5.2) fue sometido a una CFG. Se empleó el gel Biogel® P-2, conformado por cuentas de poliacrilamida que separan a los péptidos en un rango de fraccionamiento de 100-1800 Da. El gel 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 ~ 1.5 mL y la detección se hizo a 214 nm.

Para cada una de las fracciones obtenidas se determinó la actividad ECA - I y actividad antioxidante ABTS⁺. En los picos con alta actividad ECA - I se determinó el valor IC₅₀. Estas fracciones fueron liofilizadas y conservadas en congelación para su posterior caracterización.

3.5.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS PURIFICADAS

De la etapa anterior se seleccionaron las fracciones conteniendo péptidos con alta actividad antihipertensiva y antioxidante, según los ítems. Seguidamente fueron evaluados para determinar su peso molecular aproximado mediante electroforesis SDS-PAGE.

3.5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) y un análisis de varianza para poder analizar el efecto de la purificación de los hidrolizados de la proteína de cañihua (ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel) sobre la actividad inhibitoria de la ECA - I, la actividad antioxidante y el contenido de proteína soluble (variables respuesta). Los análisis se realizaron por triplicado. Para la selección de las fracciones a las que se evaluó IC_{50} y aquellas que fueron caracterizados mediante electroforesis se realizó una comparación de medias de Duncan de las variables respuesta con un nivel de significación del 95 por ciento. Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurión XV (Statpoint Technologies INC, 2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO E HIDROLIZADO PROTEICO DE CAÑIHUA

Se partió de un concentrado proteico de cañihua (CPC), al cual se sometió a un proceso de hidrólisis en dos etapas con la enzima Alcalasa seguida de Neutrasa por un tiempo total de reacción de 180 minutos. Al producto obtenido se le denominó hidrolizado proteico de cañihua (HPC).

El Cuadro 7 muestra diversas características tanto del CPC como del HPC, donde se destaca la actividad antioxidante y la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA - I). En el CPC no se determinó la actividad antioxidante ni antihipertensiva dado que los péptidos se liberan en la etapa de hidrólisis.

Cuadro 7: Características del concentrado proteico de cañihua (CPC) y el hidrolizado proteico de cañihua (HPC)*

CARACTERÍSTICAS	CPC	HPC
Humedad (%)	4.33	ND
Proteína total (%) bs	71.95	ND
Grado de hidrólisis (%)	ND	29.10 ± 0.01
Actividad antioxidante (µmol TE/mg proteína)	0.62 ± 0.02 ^b	1.95 ± 0.03 ^a
Inhibición de la ECA - I (%)	ND	69.85 ± 1.82
Valor IC ₅₀ (mg/mL)**	ND	0.16 ± 0.001

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

El contenido de proteínas del CPC determinado es cercano a lo reportado en concentrados proteicos de otros cereales andinos como quinua (73.24 por ciento) y kiwicha (75.8 por ciento) (Cisneros, 2017; Velásquez, 2018), pero superior al reportado en concentrados proteicos de *Vicia faba* (63 por ciento) (Jaimes *et al.*, 2014) y de otras leguminosas, como maní y garbanzo con 69.54 y 69.9 por ciento, respectivamente (Clark *et al.*, 2014).

En cuanto al grado de hidrólisis (GH), en el hidrolizado se tuvo un porcentaje promedio de 29.10 (Cuadro 7), valor cercano al encontrado por Cisneros (2017) en un hidrolizado de quinua (26 por ciento) pero inferior al determinado por Velásquez en hidrolizado de kiwicha (57 por ciento). Para la misma secuencia de enzimas empleadas en esta investigación, Guerrero *et al.* (2015) reportaron un GH no mayor de 49 por ciento para un tiempo de hidrólisis de 240 minutos, en proteína de quinua de las variedades Huallhuas y Pasankalla. Ramírez (2015) señala que los hidrolizados con GH > 10 por ciento son hidrolizados destinados a una alimentación especializada, como suplemento proteico o en dietas médicas, debido a que este tipo de hidrólisis mejora las características nutricionales de las proteínas de origen, obteniendo un producto muy específico para un objetivo concreto. Además, el autor señala que el grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, naturaleza de la enzima, temperatura, pH, relación enzima - sustrato y el tiempo de reacción.

Cabe resaltar que el tamaño de los péptidos y su actividad biológica pueden variar dependiendo del tipo de enzima usada. Así, se ha encontrado que los péptidos de bajo peso molecular son antioxidantes (< 10 kDa) y antihipertensivos (21-24 kDa) más efectivos que los péptidos de alto peso molecular y por lo tanto, las proteasas que rinden péptidos de bajo peso molecular serían adecuadas para la producción comercial de péptidos antioxidantes y antihipertensivos (Daliri *et al.*, 2017). Respecto a la naturaleza de las enzimas empleadas, Mosquera (2014) señala que la especificidad de las proteasas afecta al tamaño, cantidad, composición de aminoácidos libres, tipo de péptidos y sus secuencias de aminoácidos, lo que a su vez influye en la actividad biológica de los hidrolizados.

Respecto a la actividad antioxidante (AAOX), esta aumentó de 0.62 a 1.95 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína del CPC al HPC, observándose diferencias significativas (Anexo 4). Según Borja (2014), las actividades antioxidantes, así como las biológicas pueden ser afectadas por las

condiciones operacionales aplicadas a los aislados proteicos, grado de hidrólisis, tipo de proteasa, estructura del péptido, concentración de péptidos y peso molecular. Sin embargo, se ha postulado que la actividad antioxidante total debe atribuirse a los efectos de integración de estas acciones en lugar de las acciones individuales de péptidos. Chi *et al.* (2015) señalan que los hidrolizados de proteína o péptidos con bajo peso molecular interactúan de forma más eficaz con los radicales que intervienen en el proceso de oxidación, respecto a las fracciones de alto peso molecular.

El hidrolizado de cañihua tuvo un porcentaje de inhibición de la ECA - I de 69.85, mayor al citado por Cisneros (2017) en hidrolizado de quinua (59.1 por ciento) y ligeramente inferior al citado por Velásquez (2018) en hidrolizado de kiwicha (72.84 por ciento), todos medidos a la misma concentración proteica (0.5 mg/mL). Gomes *et al.* (2016) reportan que la quinua presenta mayor inhibición de la ECA - I que la kiwicha, el trigo sarraceno y diversos cereales. Al respecto, Cicero *et al.* (2017) señalan que en particular, aquellos péptidos extraídos de cereales, tales como avena y cebada, y los péptidos Ile-Val-Tir e Ile-Asp-Pro del germen de trigo, muestran una fuerte inhibición de la ECA - I.

Por su parte, Wu *et al.* (2016) obtuvieron valores de 19 por ciento a 85 por ciento de inhibición en hidrolizados de sorgo dulce con Alcalasa, mientras que el captopril, utilizado como control positivo por Gangopadhyay *et al.* (2016), exhibió una actividad inhibitoria ECA - I de 87.46 por ciento a una concentración de 0.05 mg/mL, valor muy superior al encontrado en este trabajo.

El valor IC₅₀ (concentración de péptido en [mg/mL] para inhibir el 50 por ciento de la actividad de la ECA - I) se determinó por análisis de regresión lineal; donde menores concentraciones indican mayor efectividad. Tal como se muestra en el Cuadro 7, el HPC presentó un valor IC₅₀ de 0.16 ± 0.01 mg/mL, menor al reportado por Cisneros (2017) en hidrolizados de quinua con Alcalasa (0.3 mg/mL) y por Nongonierma *et al.* (2015), quienes obtuvieron 0.88 mg/mL. Por su parte, Velásquez (2018) obtuvo un valor IC₅₀ de 0.30 mg/mL en hidrolizado de kiwicha, mientras que en frijol terciopelo, Castillo *et al.* (2015) obtuvo valores IC₅₀ de 0.08 y 0.15 mg/mL, con pepsina y pancreatina respectivamente, señalando que fueron menores a los reportados para Alcalasa (0.59 mg/mL de proteína), flavourzyme (0.63 mg/mL de proteína) y alcalasa-flavourzyme (0.94 mg/mL de proteína). En hidrolizados

de semilla de colza, He *et al.* (2016) determinaron un valor de IC_{50} de 0.0932 ± 0.0037 mg/mL; González *et al.* (2014) en hidrolizados de semilla de ciruela encontraron que la termolisina y los hidrolizados de alcalasa tuvieron mayor potencia inhibidora ($IC_{50} < 0.5$ mg/mL) en comparación a la Proteasa P y Flavourzyme ($IC_{50} > 2.0$ mg/mL).

4.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS

4.2.1 PURIFICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE CAÑIHUA POR ULTRAFILTRACIÓN

El hidrolizado proteico de cañihua se sometió a un proceso de ultrafiltración con membrana de tamaño de corte de 10 y 3 kDa como paso previo a la cromatografía de baja presión (filtración en gel). Janson (2012) señala que la ultrafiltración se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada en bioquímica preparativa y que las membranas de ultrafiltración están disponibles con diferentes límites para la separación de moléculas desde 1 kDa hasta 300 kDa. Además, el mismo autor indica que el método es excelente para la separación de sales y otras moléculas pequeñas, permitiendo obtener una fracción de proteína con mayor peso molecular.

Luego de la primera etapa de ultrafiltración con el *cut off* de 10 kDa, se obtuvo un permeado con AAOX 2.01 μ mol de TE/mg de proteína (< 10 kDa), mientras que con la membrana de 3 kDa, se logró una AAOX de 2.11 μ mol de TE/mg de proteína en el permeado (fracción < 3 kDa), encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estas fracciones (Anexo 5), tal como puede apreciarse en el cuadro 8.

Al respecto, Fanali *et al.* (2017) señalan que durante la ultrafiltración los problemas están relacionados con la contaminación y las pérdidas por adsorción en las membranas del filtro. Esto se pudo comprobar en la presente investigación, donde se tuvo una pérdida de volumen al pasar por los *cut off*. Los mismos autores señalan además, que puede ocurrir obstrucción, lo que resulta en la retención de especies independientemente de su tamaño, lo cual también pudo influenciar este proceso.

Cuadro 8: Valores de actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg prote\u00edna}$), inhibici\u00f3n de la actividad ECA - I (%) e IC_{50} obtenidos luego del proceso de ultrafiltraci\u00f3n

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE $\mu\text{mol TE/mg prote\u00edna}$	INHIBICI\u00d3N DE LA ECA-I (%) *	IC_{50} (mg/ml)
HPC	1.95 ± 0.03^c	69.85 ± 1.82^a	0.16 ± 0.001^a
Permeado 10 kDa	2.06 ± 0.02^b	71.00 ± 1.40^a	0.13 ± 0.01^b
Permeado 3 kDa	2.11 ± 0.04^a	72.82 ± 0.55^a	0.09 ± 0.01^c

*: Promedio de tres repeticiones \pm DS. Los valores medios con letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencia significativa seg\u00fan la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

En la ultrafiltraci\u00f3n del hidrolizado de quinua, Cisneros (2017) obtuvo 3 fracciones F-I, F-II y F-III (>10 kDa, 3 – 10 kDa y < 3 kDa, respectivamente) que presentaron AAOX de 1.55, 1.72 y 1.77 $\mu\text{mol TE/mg prote\u00edna}$, respectivamente, valores menores a los obtenidos en la presente investigaci\u00f3n.

Chang *et al.* (2015) se\u00f1alan que el proceso de ultrafiltraci\u00f3n utilizando membranas ayuda a obtener mejor actividad antioxidante para un hidrolizado. Es as\u00ed que los hidrolizados proteicos obtenidos con pepsina y pancreatina en torta de palma emplearon un *cut off* de 3 kDa, encontrando que la fracci\u00f3n con menor peso molecular tuvo una actividad antioxidante significativamente mayor, comparada a la fracci\u00f3n de mayor peso molecular. Asimismo, Guo *et al.* (2015) determinaron en hidrolizados de semilla de ciruela fraccionados por membranas con *cut off* de 10, 5 y 3 kDa, que la fracci\u00f3n < 3 kDa exhibi\u00f3 la mayor capacidad anti radical que las otras fracciones, y el hidrolizado, cuando se evaluaron con los ensayos de DPPH, radical hidroxil y an\u00edon super\u00f3xido.

Kim y Wijesekara (2010) se\u00f1alan que la mayor\u00eda de p\u00e9ptidos bioactivos de fuentes naturales tienen peso moleculares menores a 6 kDa. Los resultados de Herrera *et al.* (2014) en prote\u00edna de *Mucuna pruriens* hidrolizada con Alcalasa-Flavourzyme, revelaron la presencia de p\u00e9ptidos antioxidantes en todas las fracciones y una clara tendencia a concentrarse en las fracciones con menor peso molecular, tal como ocurri\u00f3 en esta investigaci\u00f3n. Al respecto, los mismos autores se\u00f1alan que la accesibilidad a los sistemas oxidante-antioxidante es

mayor para péptidos pequeños y aminoácidos que para péptidos grandes y proteínas. En general, los 20 aminoácidos presentes en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres si la energía de estos es alta (por ejemplo en radicales hidroxilo). Los más reactivos incluyen los azufrados Met y Cys, los aromáticos Trp, Tyr y Phe y los que contienen anillo imidazol como la His (Borja, 2014).

Es así que varios factores pueden afectar la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos incluyendo la especificidad de las proteasas usadas para hidrólisis, el grado de hidrólisis, así como las propiedades estructurales de los péptidos resultantes, tales como el tamaño molecular, hidrofobicidad, secuencia y composición aminoacídica. Además de otros factores como las condiciones operacionales (Ho *et al.*, 2013). Por su parte, Segura-Campos *et al.* (2013) señalan que la mayor actividad antioxidante de los péptidos en comparación con los aminoácidos libres se atribuye a las propiedades químicas y físicas conferidas por su secuencia de aminoácidos, especialmente la estabilidad de los péptidos resultantes que no inician o propagan más reacciones oxidativas. La Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, son ejemplos de aminoácidos que causan la actividad antioxidante. Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones de electrones a los radicales deficientes. Por ejemplo, se ha informado que Gln- Gly- Ala- Arg- Leu y Glu tienen un papel importante en la eliminación de radicales. Sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales para aclarar la relación estructura / función de los péptidos antioxidantes (Borja, 2014). La actividad antioxidante de los hidrolizados de proteína de soya se atribuye a péptidos con secuencia Leu-Leu-Pro-His-His. De igual modo, se ha identificado como sitio activo la secuencia Pro-His-His; es sabido que los péptidos que contienen histidina en su estructura pueden actuar como quelantes de metales, captadores de radicales hidroxilo y especies reactivas de oxígeno (Borja, 2014).

Respecto al análisis de la capacidad antihipertensiva e IC_{50} , los resultados de los permeados y retentados de la ultrafiltración por membranas de *cut off* de 10 y 3 kDa son mostrados en el Cuadro 8. La UF es utilizada para separar contaminantes microbiológicos, coloides y en general moléculas de gran tamaño, encontrando sus principales aplicaciones en el campo de la separación y/o concentración de proteínas (Orozco *et al.*, 2008), por lo tanto podría incrementar la capacidad antihipertensiva, ya que se utiliza para fraccionar péptidos, y luego se aplican una o más técnicas cromatográficas para aumentar la pureza de las fracciones (Lemes *et al.*, 2016).

Los resultados muestran una actividad inhibitoria ECA - I (a 0.5 mg/mL) de 71.0 por ciento en el permeado de 10 kDa y 72.82 por ciento con el permeado de 3 kDa, siendo el valor inicial de 69.85 por ciento (Cuadro 8). Al respecto, en hidrolizado de quinua sometido a ultrafiltración, Cisneros (2017) obtuvo para los mismos *cut off*, valores de inhibición de la ECA - I de 59.08, 58.9 y 70.07 por ciento para el hidrolizado, permeado de 10 kDa y permeado de 3 kDa, respectivamente. También Du *et al.* (2013) quienes utilizaron membranas *cut off* de 10 kDa y 3 kDa en hidrolizados de residuos de *Phascolosoma esculenta* con pepsina, determinaron la mayor actividad ECA - I en la fracción menor a 3 kDa (74.6 por ciento) a la concentración de 2 mg/mL.

Por otro lado, González *et al.* (2015) en semillas de ciruela hidrolizadas con Termolisina encontraron que las fracciones peptídicas > 5 kDa y 3 - 5 kDa no exhibieron actividad inhibitoria ECA - I. He *et al.* (2013), por su parte, determinaron que la actividad de las fracciones peptídicas a partir de hidrolizados de colza con Proteinasa K fueron dependientes del peso molecular, donde la fracción < 1 kDa tuvo la mayor actividad inhibitoria ECA - I de 86.94 por ciento, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando el tamaño del péptido se incrementó de 5 a 10 kDa. Con Termolisina, la actividad inhibitoria ECA - I se incrementó significativamente ($p < 0.05$) desde las fracciones < 1 kDa a las fracciones entre 3 a 5 kDa, pero disminuyó para los péptidos de 5 a 10 kDa. En contraste, la actividad inhibitoria ECA - I para las fracciones hidrolizadas con Alcalasa y Flavourzyme fue independiente del peso molecular del péptido. Los valores obtenidos en las fracciones de cañihua son cercanos a lo señalado por Gangopadhyay *et al.* (2016) quien en hidrolizados de cebada, determinaron una actividad inhibitoria ECA - I de 70.37 por ciento en la fracción de 3 kDa, seguida de la fracción de 10 kDa (57.42 por ciento), partiendo de un hidrolizado con 47.23 por ciento, señalando que estos resultados indican que la ultrafiltración ayuda al enriquecimiento de los péptidos inhibidores, tal como se evidenció en los resultados de actividad antihipertensiva. Esto debido a que la ultrafiltración por membranas y la cromatografía de exclusión por tamaño permiten obtener un producto más uniforme con el rango deseado de masa molecular, sirviendo especialmente para concentrar péptidos de bajo peso molecular que son más resistentes a una posterior digestión proteolítica *in vivo* y con mayor potencial de ser inhibidores de la ECA (Lemes *et al.*, 2016).

En general, la inhibición de la ECA - I parece mejorarse cuando los péptidos contienen prolina, aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos o hidrofóbicos. Los péptidos conteniendo Val-Ala-Phe reportan alta actividad inhibitoria. La Gln en el extremo C-terminal tiene un efecto más potente que otros residuos, y la leucina (aminoácido de cadena ramificada) en el extremo N-terminal es más efectiva que la glicina para unirse con la ECA - I. Por otro lado, la Arg en el extremo C-terminal con una carga positiva en el grupo amino-E contribuye significativamente a la actividad inhibitoria ECA - I (Manoharan *et al.*, 2017). Por su parte, Aluko (2015) señala que el tetrapéptido C-terminal puede ser el principal determinante de la actividad inhibidora ECA - I de cadenas largas (> 4 residuos péptidicos); por lo tanto, la eliminación de otras zonas del péptido durante el tránsito en el tracto gastrointestinal no debería tener ningún efecto negativo sustancial en la inhibición de la ECA - I siempre que, el fragmento C-terminal del tetrapéptido permanezca intacto. La existencia y la posición de algunos aminoácidos especiales pueden influenciar la actividad inhibitoria ECA - I. Por ello, entender estas características puede ser útil para predecir la actividad de los péptidos inhibitorios ECA - I de fuentes naturales (Rizello *et al.*, 2015, Vallabha y Tiku, 2014) y podrían formar parte de los péptidos de la cañihua debido a que contiene todos los aminoácidos esenciales.

Con respecto al valor IC_{50} , como se muestra en el Cuadro 8, en un inicio se tuvo un valor de 0.16 mg/mL mientras que con el permeado de 10 kDa se obtuvo un valor de 0.13 mg/mL y con el permeado de 3 kDa fue 0.09 mg/mL de proteína, mostrando diferencias significativas en el valor IC_{50} (Anexo 7); diferencias que no fueron observadas en la actividad inhibitoria de la ECA - I ($p > 0.05$, Anexo 6). Los resultados se asemejan a lo señalado por Cisneros (2017), quien obtuvo valores IC_{50} de 0.3, 0.19 y 0.13 mg/mL en el hidrolizado de quinua, permeado de 10 kDa y permeado de 3 kDa, respectivamente.

González *et al.* (2015) en péptidos de semillas de ciruela hidrolizadas con Termolisina determinaron que el IC_{50} de los péptidos concentrados en la fracción menor a 3 kDa fue 22.8 μ g/mL. También Herrera *et al.* (2014) en proteína de *Mucuna pruriens* obtuvieron el menor valor IC_{50} en la fracción < 1 kDa y Dávalos *et al.* (citados por Herrera, 2014) obtuvieron la mayor actividad inhibitoria ECA - I (IC_{50} 0.040 mg/mL) en la fracción < 3 kDa en proteína de clara de huevo. Por otro lado, Chen *et al.* (2013) determinaron en hidrolizados de proteína de arroz fraccionados por membranas de 3 kDa y 10 kDa, que la fracción < 3 kDa

exhibió la mayor actividad inhibitoria ECA - I (IC_{50} 0.280 mg/mL), mientras que la fracción > 10 kDa mostró la menor actividad (IC_{50} 1.570 mg/mL). Los valores reportados en hidrolizado purificado de quinua son mayores a los encontrados en este estudio, lo cual es indicativo que los péptidos de cañihua exhiben mejor actividad antihipertensiva. Sin embargo, en otras fuentes se obtienen valores de IC_{50} menores, lo cual podría deberse a las características y composición aminoacídica propias de las fuentes estudiadas.

En hidrolizados de maíz con termolisina, Wang *et al.* (2014) determinaron un valor IC_{50} de 0.097 mg/mL en el hidrolizado y 0.023 mg/mL en el permeado de 3 kDa, valores menores a lo encontrado por Huang *et al.* (citado por Wang *et al.*, 2014) de 0.29 mg de proteína/mL en péptidos de la harina de gluten de maíz (peso molecular menor que 3 kDa), usando Alcalasa. La mayoría de los péptidos reportados que exhiben actividad inhibitoria ECA - I tiene pesos moleculares bajos (aproximadamente < 12 aminoácidos), lo cual indica que los péptidos activos pueden seleccionarse por ultrafiltración, resultando en la producción de un permeado con mayor inhibición ECA - I que el hidrolizado original (Sun *et al.*, 2004), lo cual pudo evidenciarse en los resultados obtenidos.

4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

La fracción permeada de tamaño menor a 3 kDa separada previamente por ultrafiltración, fue sometida al proceso de cromatografía de filtración en gel (CFG). Para ello el permeado de 3 kDa fue concentrado previamente en un rotavapor de forma que la concentración final de proteína en esta fracción fue de 50 mg/mL. Así, 1 mL de esta solución se inyectó en la columna Biogel P-2 y se procedió a la elución, monitoreada a una absorbancia de 214 nm. En la Figura 9 se muestra el cromatograma de separación del permeado < 3 kDa de una corrida, donde se observa que se obtuvieron tres fracciones, denominadas en este estudio como F-I, F-II y F-III, compuestas por la agrupación de 7, 6 y 4 tubos colectados, respectivamente; cada uno de ellos de ~ 1.5 mL. La F-I, F-II y F-III, presentaron contenidos proteicos de 15.8, 29.1 y 1.3 mg, respectivamente; representando el 31.6, 58.2 y 2.6 por ciento, respectivamente, del total de contenido proteico sujeto a la CFG.

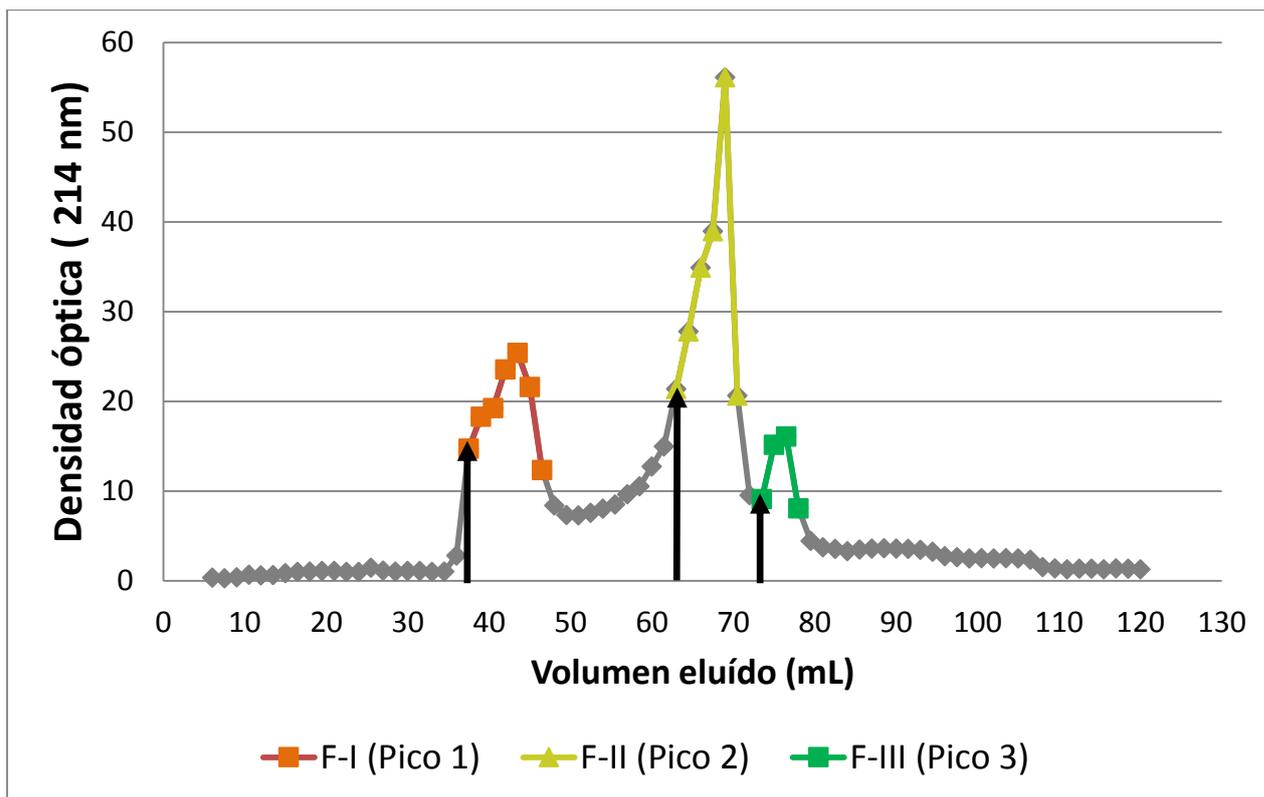


Figura 9: Separación mediante cromatografía de filtración en gel del permeado < 3kDa del hidrolizado de cañihua.

Al evaluar la actividad antioxidante de las tres fracciones se encontró que todos los picos tuvieron actividad antioxidante, la cual fue de 1.09, 2.22 y 3.18 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína para las fracciones F-I, F-II y F-III, respectivamente (Cuadro 9), destacando en esta propiedad la F-III, presentando diferencia significativa con las demás fracciones (Anexo 8).

Yu *et al.* (2016) señalan que en general, la actividad de los péptidos antioxidantes está altamente influenciada por su masa molecular y las fracciones peptídicas con PM de 200 a 3000 Da (como los contenidos en la fracción F-III) tienen una mayor actividad antioxidante. Estudios previos han demostrado que los péptidos con menor PM son los antioxidantes más eficientes, ya que tienen más probabilidades de cruzar la barrera intestinal; es así que en un estudio reciente, los péptidos que contenían de 2-20 residuos de aminoácidos generalmente cruzaron la barrera intestinal más fácilmente para ejercer efectos biológicos (Kou *et al.*, 2013).

Cuadro 9: Características de las fracciones obtenidas durante el proceso de cromatografía de filtración en gel

FRACCIÓN	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE $\mu\text{mol TE/mg proteína}$	INHIBICIÓN DE LA ECA-I (%) [*]	IC ₅₀ (mg/mL)
F-I	1.09 ± 0.01 ^c	18.66 ± 1.16 ^c	ND
F-II	2.22 ± 0.07 ^b	64.35 ± 2.45 ^b	0.141 ± 0.01 ^a
F-III	3.18 ± 0.03 ^a	78.40 ± 0.26 ^a	0.055 ± 0.01 ^b

*: Los valores están expresados como promedio de dos experimentos independientes para un contenido de proteína de 0.5 mg/mL. Los valores medios que presentan diferentes letras minúsculas indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$). ND: No determinada.

Muchos estudios previos sugieren que péptidos antioxidantes de hidrolizados de proteínas obtenidos de productos como nueces, huevos, gluten de maíz, tilapia y el suero de queso de oveja contienen 2-20 residuos de aminoácidos (Liu *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2013). Al respecto, Manohara *et al.* (2007) indican que las secuencias peptídicas cortas se absorben fácilmente y retienen su actividad al llegar al torrente sanguíneo, lo cual se debe probablemente a que los oligopéptidos no pueden digerirse adicionalmente en fragmentos más cortos en el tracto gastrointestinal, teniendo por lo tanto, una buena biodisponibilidad. Zhang *et al.* (2010), en proteína de endospermo de arroz hidrolizado (REP) usando varias proteasas indica que los aminoácidos ubicados en el N-terminal de los fragmentos peptídicos antioxidantes son Phe y Lys, mientras que en sus lados C-terminales se encuentra Lys y Phe, respectivamente.

Por otro lado, Zhang *et al.* (2011) identificaron con éxito un péptido antioxidante cuya secuencia es Asn-Arg-Tyr-His-Glu en hidrolizados de proteína de garbanzo. Guo *et al.* (2009) informaron que los tres dipéptidos identificados (Lys-Tyr, Arg-Tyr y Tyr-Tyr) contenían el aminoácido Tyr, situado en el extremo C-terminal, el cual se caracteriza por grupos de hidroxilo fenólicos, que inhiben significativamente los radicales libres a través del mecanismo donador de átomos de hidrógeno situados en su grupo hidroxilo. Torres-Fuentes *et al.* (2011) investigaron que la mejor actividad quelante se puede obtener mediante la combinación de altos niveles de His que van del 20 al 30 por ciento y fragmentos cortos de péptidos. Cheng *et al.* (2010) identificaron 2 péptidos antioxidantes que tienen los siguientes residuos de aminoácidos en los extremos N-terminal (Ser/Ile) y C-terminal (Tyr/Gln) de

ambos lados laterales de fragmentos activos de una muestra de hidrolizado de proteína de papa (PPH) fraccionado usando precipitación con sulfato de amonio. Sarmadi e Ismail (2010) por su parte, sugirieron que la estructura de los aminoácidos y su flujo de secuencia en el péptido podrían cambiar significativamente la actividad antioxidante.

De otro lado, la tercera fracción, presentó también la mayor actividad inhibitoria ECA - I (78.4 por ciento) y el menor valor IC_{50} de 0.055 mg de proteína/mL. En el Cuadro 9 se muestra el porcentaje de inhibición de la ECA - I (a la concentración de 0.5 mg/mL) y los valores IC_{50} en las fracciones obtenidas por CFG. Se encontró capacidad antihipertensiva en todos los picos (Anexos 9 y 10); sin embargo, la fracción F-I tuvo valores de AAOX y actividad inhibitoria de la ECA - I muy bajas en comparación a las obtenidas en la F-II, F-III y en el hidrolizado proteico (HPC), por ello se decidió continuar con la caracterización con las fracciones F-II y F-III.

Numerosos estudios se han reportado sobre purificación y aislamiento de péptidos derivados de alimentos e hidrolizados enzimáticos como suero de queso, caseína, soja y trigo que exhiben actividad inhibidora de la ECA - I (Mane y Jamdar, 2017). Mäkinen (2014) sometió un hidrolizado de colza con Alcalasa a extracción en fase sólida y ultrafiltración con un *cut off* de 3 kDa. Como resultado, los péptidos inhibidores de ECA - I fueron eficientemente concentrados en el permeado de la fracción hidrofóbica con un valor IC_{50} de 0.08 mg de proteína/ml. Mientras tanto, el valor IC_{50} para el filtrado de la fracción menos hidrofóbica fue de 0.32 mg/mL, por lo cual el autor señala que los aminoácidos hidrofóbicos juegan un papel integral en la inhibición de la ECA - I. Se ha informado que la presencia de Tyr, Phe, Trp, Pro, Lys, Ile, Val, Leu y Arg en los péptidos tiene una gran influencia en la unión de la ECA. Existen diferentes secuencias de inhibidores de la ECA - I que van desde dipéptidos a oligopéptidos. Estos dipéptidos contienen aminoácidos con cadenas laterales voluminosas e hidrófobas. En el caso de los tripéptidos, la característica estructural se ha señalado como un aminoácido aromático en el primer residuo, un aminoácido cargado positivamente en el segundo residuo y un aminoácido hidrófobo en el tercer residuo. La estructura de los tetrapéptidos inhibidores de la ECA - I se ha expresado como Tyr y Cys presentes en la primera posición; His, Trp y Met en la segunda posición; Ile, Leu, Val y Met en la tercera posición; y Trp en la cuarta posición (Daskaya-Dikmen *et al.*, 2017).

A pesar de la mejora de la actividad antihipertensiva con los procesos de ultrafiltración y cromatografía de filtración en gel, los valores IC_{50} determinados en este estudio, fueron mucho mayores que el del captopril (fármaco sintético) que presenta un valor de 0.00000478 mg/mL (Ambigaipalan *et al.*, 2015). Similares resultados tuvieron Younsr y Howell (2015) en péptidos de proteína de yema de huevo, donde la actividad de inhibición de la ECA - I se mejoró con el proceso de purificación por cromatografía de filtración en gel, donde la fracción EYGF-56 exhibió 69.2% de actividad y un valor IC_{50} de 3.35 mg/mL, señalando que esta observación está en concordancia con estudios previos que informaron que la purificación disminuye los valores de IC_{50} .

A lo largo del proceso de purificación se han ido seleccionando las fracciones con mejores propiedades antihipertensivas y antioxidantes, y son estas las que han sido purificadas; correspondiendo a las de menor peso molecular, tal como lo indica la literatura. En un primer lugar mediante la ultrafiltración se seleccionó la fracción < 3 kDa; después mediante la filtración en gel, la fracción III, que sale al final, y por lo tanto la de menor peso molecular. Esto indicaría que las secuencias peptídicas que presenta ambas propiedades bioactivas ha sido purificadas en el proceso. Para poder observar esta situación a mayor detalle, el Cuadro 10 muestra el resumen de la AAOX y antihipertensiva a lo largo de la purificación realizada, desde el HPC hasta la CFG (Anexos 11, 12 y 13).

En la actualidad, la combinación de herramientas informáticas con el trabajo experimental en el proceso de producción de biopéptidos ha contribuido a una reducción de costos y facilidad en su fabricación (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012). El esquema propuesto de un posible procedimiento para producir inhibidores de ECA - I es aplicable tanto en laboratorio como a escala industrial. Aunque las diversas etapas (como la selección de proteínas, hidrólisis, y el ensayo de inhibición de la ECA - I) son las mismas en ambos casos, los métodos de separación y purificación de péptidos pueden diferir debido a la falta de tecnología unificada Sin embargo, a lo largo de los años, se ha observado un progreso en el desarrollo e introducción de nuevas técnicas (Korhonen y Pihlanto 2007).

Cuadro 10: Resumen del proceso de purificación de péptidos bioactivos

FRACCIÓN	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)*	INHIBICIÓN DE LA ECA-I (%)**	Valor IC ₅₀ (mg/mL)
HPC	1.95 ± 0.03^d	69.85 ± 1.82^c	0.1597 ± 0.001^a
Permeado 10 kDa	2.06 ± 0.02^c	71.00 ± 1.40^c	0.1322 ± 0.01^c
Permeado 3 kDa	2.11 ± 0.04^c	72.82 ± 0.55^b	0.0885 ± 0.01^d
F-I	1.09 ± 0.01^e	18.66 ± 1.16^d	-
F-II	2.22 ± 0.07^b	64.35 ± 2.45^c	0.141 ± 0.01^{ab}
F-III	3.18 ± 0.03^a	78.40 ± 0.26^a	0.055 ± 0.01^e

*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

4.2.3 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

El perfil de peso molecular de las fracciones de proteínas de cañihua se determinó mediante SDS-PAGE (Figura 10); los pesos moleculares calculados se muestran en el Cuadro 11.

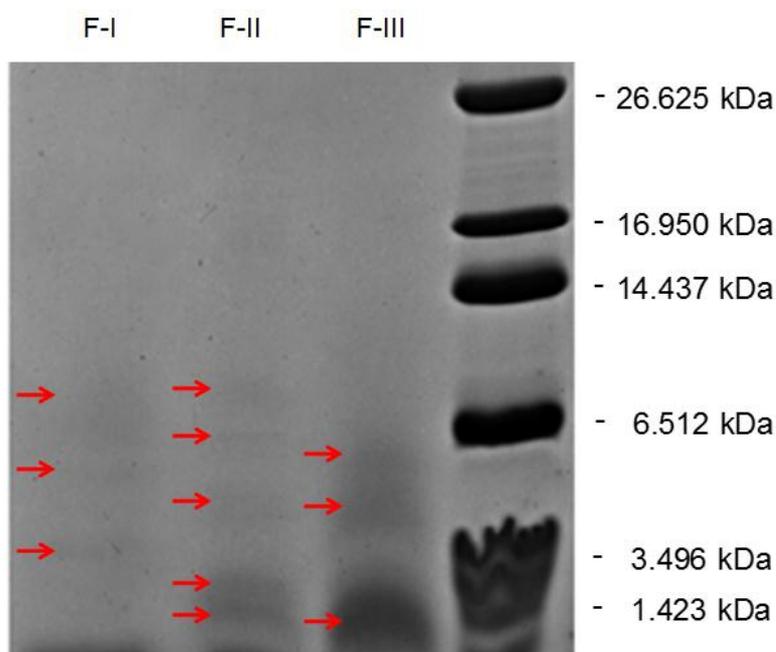


Figura 10: Perfil electroforético de las fracciones del hidrolizado proteico purificado de la cañihua

En las tres fracciones se obtuvieron más de 2 bandas proteicas. Es así que en la F-I se tuvo tres bandas de péptidos, con pesos moleculares entre 1.89 a 4.9 kDa; en la F-II, se tuvo 5 bandas de 1.29 a 5.33 kDa y en la F-III, 3 bandas con pesos moleculares entre 1.21 y 3.39 kDa. Respecto al tamaño de los péptidos, Liu *et al.* (2016) recopilaron secuencias y pesos moleculares de péptidos antioxidantes derivados de proteína animal, señalando que tienen en común un tamaño de 4-16 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 400-2000 Da. De forma similar, se caracterizaron noventa y tres péptidos a partir de una fracción de cromatografía de exclusión de tamaño con tamaños de 5-20 aminoácidos y pesos moleculares de 400-2500 Da, de los cuales, aquellos con pesos moleculares más pequeños poseían una gran actividad antioxidante (Mora *et al.*, 2014). Podemos indicar que la FIII es la que contiene péptidos de menor peso molecular, y es esta fracción la que posee mayor AAOX (Cuadro 9); estos resultados confirmarían que muestras con menor peso molecular poseen mayor actividad antioxidante, debido a que tienen la propiedad de atravesar más fácilmente el lumen intestinal.

Cuadro 11: Pesos moleculares de las fracciones de cañihua obtenidas por cromatografía de filtración sobre gel

NÚMERO DE BANDAS	MARCADOR DE PM (kDa)	F-I	F-II	F-III
1.	26.625	4.900	5.327	3.394
2.	16.955	3.234	3.953	2.395
3.	14.370	1.886	2.423	1.213
4.	6.512		1.451	
5.	3.496		1.287	
6.	1.423			

Se informa que los péptidos inhibidores de la ECA - I generalmente contienen de 2 a 12 aminoácidos y sus pesos moleculares generalmente varían de 150 a 800 Da (Yamamoto *et al.*, 2007). Valenzuela *et al.* (2013) encontraron en hidrolizados de quinua fracciones con pesos moleculares entre 8.8 y 72.0 kDa, mientras que para la misma materia prima, Nongonierma *et al.* (2015) encontraron fracciones entre 6.5 y 66 kDa.

Guang y Phillips (2009) produjeron un tetrapéptido de maní (Lys-Ala-Phe-Arg) con actividad inhibidora de la ECA de 16.9 µg/ml; mientras que Li *et al.* (2002) reportaron un hexapéptido inhibidor de la ECA (Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Arg) con un valor IC₅₀ de 82.4 µM a partir de aislado de proteína de frijol mungo con alcalasa.

Según Muhamyankaka *et al.* (2013), la distribución de pesos moleculares de hidrolizados proteicos obtenidos por proteasas individuales es notablemente distinto, reflejando las diferencias en la longitud de la cadena peptídica y la exposición de los grupos amino terminales, que podrían estar muy influenciadas por las propiedades funcionales de los hidrolizados. Es así que en hidrolizado de calabaza con Flavourzyme encontraron mayor proporción de fracciones peptídicas > a 5 kDa (40.93 por ciento). En cambio los hidrolizados con Neutrasa mostraron mayor contenido de fracciones entre 5 y 10 kDa (38 por ciento), señalando que para los hidrolizados con Alcalasa, Protamex, Neutrasa y Flavourzyme, el principal peso molecular de las fracciones estuvo entre 180 a 5000 Da.

En el caso de los péptidos antihipertensivos, muchas secuencias de péptidos potentes inhibidores de ECA - I, están presentes en el extremo C residuos de Tyr, Phe y Trp; además, la presencia del aminoácido hidrófobo Leu y residuos de Arg y Lys (Norris y FitzGerald, 2013). Se ha determinado que los tripéptidos con aminoácidos hidrofóbicos en el N-terminal, aminoácidos cargados positivamente en el centro y aminoácidos aromáticos en el extremo C-terminal, conducen a potentes péptidos inhibidores de la ECA - I. Met-Ala-Ala y Met-Pro-Ile tienen ambos un aminoácido hidrofóbico en el extremo N-terminal. Además, el tetrapéptido Ile-Ile-Ala-Glu fue seleccionado para síntesis debido a la presencia de Ile en C₃, una característica de potentes tetrapéptidos inhibidores de la ECA - I (O'Keefe *et al.*, 2017).

Al parecer hay una correlación entre los valores de IC₅₀ con la secuencia de los péptidos, a partir de la cual podría predecirse si una secuencia dada será un buen inhibidor de la ECA - I o no. Potentes inhibidores de la ECA - I están conformados por residuos de aminoácidos hidrófobos (cadenas laterales aromáticas o ramificadas) en el extremo C donde la máxima preferencia es la presencia de prolina (Norris y FitzGerald, 2013), que en la antepenúltima posición C-terminal da como resultado una buena unión a la ECA - I, mientras que la unión es débil si la prolina está presente en la penúltima posición del péptido (Miguel *et al.*, 2012).

Ma *et al.* (2010) en la digestión de proteína de trigo sarraceno mediante el uso de enzimas pepsina-pancreatina y purificada por LC-MS/MS, informaron que los péptidos identificados en su mayoría son Pro-Trp, Val-Pro-Trp, Trp-Pro-Leu y Val-Phe-Pro-Trp, los cuales exhiben una gran actividad antioxidante ABTS⁺. Por su parte, Gu y Wu (2016) han resumido eficientemente las funciones de las proteínas y péptidos antioxidantes y antiinflamatorios derivados de los alimentos y sus contribuciones en el manejo, la administración e inhibición de los trastornos cardiovasculares. Estos autores señalan que persisten varios desafíos futuros que requieren fundamentación adicional: detección y caracterización de los componentes principales de los hidrolizados de proteínas, comprensión de los mecanismos de acción a nivel molecular y funciones de los receptores de proteínas en detalle, elucidar los efectos secundarios nocivos, la dosis óptima, así como la interacción de los péptidos bioactivos con los otros componentes alimenticios en un sistema alimentario.

V. CONCLUSIONES

- Al evaluar la actividades antihipertensiva (actividad inhibitoria de enzima convertidora de la angiotensina ECA - I) y actividad antioxidante (ABTS⁺) *in vitro* de la proteína de cañihua hidrolizada y de las fracciones obtenidas luego de los procesos de ultrafiltración se obtuvo que ambas propiedades se incrementaron de 1.95 a 2.11 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína y de 69.85 a 72.82 por ciento de inhibición, desde el hidrolizado proteico al permeado de 3 kDa, respectivamente, mientras que los valores de IC_{50} disminuyeron de 0.16 mg/mL a 0.09 mg/mL, respectivamente.
- Con la cromatografía de filtración sobre gel se obtuvieron tres fracciones de péptidos, de los cuales, los valores mas importantes de actividad antioxidante y valor de inhibición de la ECA-I se obtuvo con la fracción FIII, seguido de la Fracción F-II, siendo estos de 3.18 y 2.22 $\mu\text{mol TE/mg}$ proteína y, 78.40 y 64.35 por ciento, respectivamente y con valores de IC_{50} de 0.055 y 0.141 mg/mL.
- Con la electroforesis SDS-PAGE, se observó mas de dos bandas peptídicas en las tres fracciones evaluadas. La F-III, estuvo compuesta por péptidos con pesos moleculares entre 1.21 y 3.39 kDa, la F-II entre 1.29 y 5.33 kDa y la F-I entre 1.89 y 4.0 kDa. Donde la F-III compuesta por péptidos de menor tamaño fue la que presentó las mejores propiedades antioxidante, de inhibición de la ECA-I y el menor valor IC_{50} .
- De los resultados obtenidos, se puede destacar que la proteína de cañihua es una fuente promisoriosa para la obtención de péptidos bioactivos beneficiosos a la salud, mediante su empleo como nutracéutico. Además de la promoción de un estilo de alimentación saludable en la que se incluyan productos oriundos de nuestro país como los granos andinos con propiedades funcionales.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación *in vivo* de las actividades biológicas de los péptidos purificados y realizar estudios farmacocinéticos para evaluar la influencia de variables como el tamaño del péptido, el modo de administración y la forma de administración (suspensión, polvo, micela, emulsión, etc.) en la biodisponibilidad de los péptidos.
- Identificar a los péptidos responsables de las actividades antioxidante y antihipertensiva mediante espectrometría de masas.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Abderrahim, F; Huanatico, E; Repo, R; Arribas, S; Gonzales, MC; Condezo, L. 2012. Effect of germination on total phenolic compounds, total antioxidant capacity, Maillard reaction products and oxidative stress markers in canihua (*Chenopodium pallidicaule*). *Journal of Cereal Science* 56(1):410-417.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27:1256–1262.
- Aguilar, V; Vélez, J. 2013. Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7:25 - 34.
- Agyei, D; Ongkudon, CM; Wei, CY; Chan, AS; Danquah, MK. 2016. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing* 98: 244 - 256.
- Aluko, R. 2015. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Reviews of Food Science and Technology* 6: 235 - 262.
- Ambigaipalan, P; Al-Khalifa, AS; Shahidi, F. 2015. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods* 18:1125-1137.
- Arihara, K; Ohata, M. 2006. Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. *In* *Advanced Technologies for Meat Processing*. Toldrá, F. New York, United States of America; Springer.

- Arndt, C; Koritska, S; Bartsch, H; Bachmann, M. 2012. Native polyacrilamide gels. *Methods in Molecular Biology* 869:49-53.
- Arnillas, C; Carranza, C; Mesones, C; Moretti, M; Bueno, O. 2013. Plan estratégico de la Cañihua. Tesis Mg. en Administración Estratégica de Empresas. Lima, Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Arts, I. and P. Hollman. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. Journal of Clinical Nutrition* 81(1):317S–325S.
- AOAC (Association of Analytical Chemists). 1995. *Official methods of analysis*. 15th ed. Washinton, DC: 1298p.
- Asoodeh, A; Mina, Y; Jamshidkhan, CH. 2012. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chemistry* 131:291-295
- Balti, R; Bougatef, A; Sila, A; Guillochon, D; Dhulster, P; Nedjar, N. 2015. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 170:519 – 525.
- Berg, J; Tymoczko, J; Stryer, L. 2015. *Bioquímica*. 6 ed. Barcelona, España. Reverté.
- 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.
- Barret, A; Rawlings, N; Woessner, F. 2012. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 1 ed. London, United Kingdom. Elsevier.
- Bio-Rad Laboratories Inc. 2012. *A guide to polyacrylamides gel electrophoresis and Detection*. United States of America of America, Bulletin N°.

- Boelsma, E; Kloek, J. 2009. Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *British Journal of Nutrition* 101:776–786.
- Borja, J. 2014. Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus* sp. Tesis Quím. Lima, Perú, UNMSM.
- Bustamante, D. 2014. Caracterización de barras de cereales bañadas en chocolate y enriquecidas con concentrado proteico de papa (*Dosidicus gigas*). Tesis Ing. Arequipa, Perú, UNAS.
- Callisaya, J; Alvarado, J. 2009. Aislados Proteínicos de granos altoandinos Chenopodiaceas; quinua "*Chenopodium quinoa*"- Cañihua "*Chenopodium pallidicaule*" por precipitación isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química* 26.
- Campuzano, G. 2006. La electroforesis de proteínas: más que una prueba de laboratorio. *Inmunología* 5:6. Médica Colombiana.
- Capriotti, A; Caruso, G; Cavaliere, C; Samperi, R; Ventura, S; Zenezini, R; Laganá, A. 2015. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis* 44:205 - 213.
- Carmona, A; Zapata, S. 2016. Efecto de los péptidos bioactivos sobre la salud. Trabajo de Grado Especialistas en Alimentación y Nutrición. Facultad de Ingenierías. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquía, Colombia.
- Carrasco-Castilla, J; Hernandez-Alvarez, A; Jiménez-Martínez, C; Gutierrez-López, G; Dávila-Ortiz, G. 2012. Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews* 4(4):224 – 243.
- Carrasco, C; Guerra, M. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 23(1):42-49.

- Carrillo, J; Candia, M; Lugo, R; Espinoza, E; Noriega, J. 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus* 8:19 - 26.
- Castillo, E; Betancur, D; Segura, M. 2015. Proteínas de *Mucuna pruriens* con potencial de inhibir el sistema Renina-Angiotensina. *Revista Latinoamericana de Hipertensión* 10(1):123-131.
- Chanamé, C; Cruz, M. 2017. Capacidad antioxidante *in vitro* de extractos fenólicos libres y ligados en harinas de quinua (*Chenopodium quinoa*), kiwicha (*Amaranthus caudatus*) y kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Tesis Lic. Lima, Perú, UPC.
- Chang, S; Ismail, A; Yanagita, T; Mohd, N; Hidayat, M. 2015. Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods* 14:63 - 75.
- Chen, J; Liu, S; Ye, R; Cai, G; Wu, Y. 2013. Angiotensin-I converting enzyme (ECA) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of Functional Foods* 5:1684-1692.
- Chen, J; Chen, Y; Xia, W; Xiong, Y; Ye, R. 2016. Grass carp peptides hydrolysed by the combination of Alcalase and Neutrase: Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant activities and physicochemical profiles. *International Journal of Food Science and Technology* 51:499 - 508.
- Cheng, Y; Xiong, Y; Chen, J. 2010. Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 120(1):101- 108.
- Chi, C; Wang, B; Hu, F; Wang, Y; Zhang, B; Deng, S; Wu, C. 2015. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International* 73:124–129.

- Cicero, AFG; Fogacci, F; Colletti, A. 2017. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology* 174(11):1378-1394.
- Cisneros, M. 2017. Purificación de péptidos bioactivos de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) con capacidad antioxidante y antihipertensiva. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Clark, S; Jung, S; Lamsal, B. 2014. *Food Processing: Principles and Applications*. 2 ed. Edition. Chichester, United Kingdom. Wiley.
- Daliri, EB; Lee, B; Oh, D. 2017. Current trends and perspectives on Bioactive Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12:1-12.
- Das, A; Raychaudhuri, U; Chakraborty, R. 2012. Cereal based functional food of Indian subcontinent: A review. *Journal of Food Science and Technology* 49(6):665-672.
- Daskaya-Dikmen, C; Yucetepe, A; Karbancioglu-Guler, F; Daskaya, H; Ozcelik, B. 2017. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients* 9(4): 316.
- Dennison, C. 2013. *A guide to protein isolation*. 2 ed. New York, United States of America. Springer.
- 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
- Encyclopaedia Britannica. Renin-angiotensin system (en línea). Consultado 20 nov. 2017. Disponible en <https://www.britannica.com/science/renin-angiotensin-system>.
- Espinoza, E. 2015. Actividad antihipertensiva y actividad antioxidante de hidrolizados de proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaulle* Aellen). Tesis Mg. Sc. Lima, Perú, UNALM.

- Fanali, S; Haddad, P; Poole, C; Riekkola, M. 2017. Liquid Chromatography. Volume 2. Applications. Amsterdam, Netherlands. Elsevier.
- FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura y alimentación. Neglected Crops 1492 from a different perspective. Plant Production and Protection Series 26. ISBN 92-5-103217-3
- FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura y alimentación), UNU (Universidad de las Naciones Unidas) y OMS (Organización Mundial de la Salud). 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series 935).
- Fukusawa, K; Hata, T; Ono, Y; Hirose, J. 2011. Metal preferences of zinc-binding motif on metalloproteases. Review Article. Journal of Amino Acids. s.p (7 p.)
- Gallego, D.; Russo, L.; Kerbab, K.; Landi, M. y Rastrelli, R. 2014. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) and *Chenopodium quinoa* (quinoa) seeds. Emir. Journal of Food Agriculture 26 (7):609-615
- 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 activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates. Food Chemistry 203:367 - 374.
- García-Nebot; MJ; Recio, I; Hernandez-Ledesma, B. 2014. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. Food Chem Toxicol 65:155–161.
- Girgih, AT; He, R; Hasan, FM; Udenigwe, CC; Gill, TA; Aluko, RE. 2015. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. Food Chemistry 173:652-659.
- Gomes, A; Cardoso, C; Manólio, S. 2016. Amaranth. Volumen 1. Encyclopedia of Food and Health. United States of America. Elsevier.

- González, 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.
- González, E; Marina, M; García, M. 2014. Plum (*Prunus domestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: extraction method and peptides characterization. *Journal of Functional Foods* 11:428-437.
- Guerrero, M; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Science & Technology* 50:1815 - 1822.
- Gu, Y; Wu, J. 2016. The potential of antioxidative and anti-inflammatory peptides in reducing the risk of cardiovascular diseases. *Current Opinions in Food Science* 8:25 - 32.
- Guang, C; Phillips, R. 2009. Purification, activity and sequence of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of peanut flour. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:10102–10106.
- Guevara, F. 2016. Los péptidos bioactivos una alternativa natural para disminuir riesgos causados por hipertensión arterial en humanos. Tesis Lic. Medellín, Colombia. Corporación Universitaria Lasallista.
- Guo, L; Harnedy, P; Li, B; Zhang, Z; Hou, H; zhao, X; Fitzgerald, R. 2015. *In vitro* assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Science and Food Agriculture* 95(7):1514 - 1520.
- Guo, Y; Pan, D; Tanokura, M. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 114:328 - 333.

- Harada, K; Maeda, T; Hasegawa, Y; Tokunaga, T; Koizumi, T. 2010. Antioxidant activity of fish sauces including puffer (*Lagocephalus wheeleri*) fish sauce measured by the oxygen radical absorbance capacity method. *Molecular medicine reports* 3:663-668.
- He, R; Girgih, A; Rozoy, E; Bazinet, L; Ju, X; Aluko, R. 2016. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry* 197(A):1008 - 1014.
- He, F. 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol Bio101*: e80. DOI: 10.21769/BioProtoc.80.
- Hernández-Ledsma, B; del Mar, C; Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165:23-35.
- Herrera, FG; Ruiz, JC; Acevedo, JJ; Betancur, DA; Segura, MR. 2014. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry* 49(10):1691-1698.
- Herrero, A. 2010. Desarrollo de membranas poliméricas con propiedades antifouling. Proyecto de Fin de Carrera de Ingeniería Técnica Industrial. Departamento de ciencia e Ingeniería de Materiales e Ingeniería Química. Universidad Carlos III de Madrid. Madrid, España.
- Ho, Chi; Mussinan, C; Shahidi, F; Tratas, E. 2013. Nutrition, functional and sensory properties of Foods. Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom.
- Houston, M. 2013. The role of nutrition, nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 19 (1):32-49.
- Huamán, N. 2011. Evaluación de la difusividad térmica en granos de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Allen) sometidos a tratamiento térmico. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú, UNALM.

- INIA (Instituto Nacional de Investigación y extensión agraria). 2004. Estación Experimental Illpa INIA. Boletín Informativo. Proyecto Cultivos Andinos ILLPA – INIA – 406.
- Iwaniak, A; Minkiewicz, P. 2008. Biologically active peptides derived from proteins. A Review. Polish Journal of Food Nutrition and Science 58(3):289 - 294.
- Jaimes, J; Restrepo, D; Acevedo, D. 2014. Preparación y determinación de las propiedades funcionales del concentrado proteico de Trupillo (*Prosopis juliflora*). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 12(1):144-152.
- Janson, J. 2012. Protein Purification. Principles, high resolution methods and applications. Third Edition. John Wiley & Sons. New Jersey. EE.UU.
- Juárez, S; Quispe, M. 2016. Aceptabilidad y evaluación proteica de galletas integrales elaboradas con harina de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), lactosuero y salvado de trigo. Tesis Lic. Arequipa, Perú. UNSA.
- Karaś, M; Jakubczyk, A; Szymanowska, U; Złotek, U; Zielińska, E. 2017. Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. International Journal of Food Science and Technology 52(2):291-305.
- Kalman, D. 2014. Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. Foods 3(3):394 - 402.
- Kim, S; Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. Journal of Functional Foods 2:1 – 9.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2007. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. Current Pharmaceutical Design 13:829 – 843.
- Kou, X; Gao, J; Xue, Z; Zhang, Z; Wang, H; Wang, X. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. LWT Food Sci. Technol. 50:591-598.

- Kumagai, H. 2010. Wheat proteins and peptides. *In*: Mine. Y; Li-Chan, E; Jiang, B. (Eds). Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals. Oxford, United Kingdom. Wiley.
- La Rosa, R; Anaya, E; Flores, Z; Bejarano, M; Brito, L; Pérez, E. 2016. Germinación de *Chenopodium palliduale* Aellen "Kañiwa" bajo diferentes condiciones de salinidad y temperatura. *The Biologist* 14(1):5 - 10.
- Lassoued, I; Mora, L; Barkia, A; Aristoy, M; Nasri, M; Toldra, F. 2015. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics* 128:8–17.
- Lee, C. 2017. A simple outline of methods for protein isolation and purification. *Endocrinology and Metabolism*. 32(1): 18 - 22.
- Lemes, A; Sala, L; da Costa, J; Cavalcante, A; Buranelo, M; Fernandes, K. 2016. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Science* 17 (6):950.
- Li, C; Matsui, T; Matsumoto, K; Yamasaki, R; Kawasaki T. 2002. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *Journal of Peptide Science* 8:267–274.
- Liu, R; Xing, L; Fu, Q; Zhou, G; Zhang, W. 2016. A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidant* 5(3):32.
- Liu, J; Jin, Y; Lin, S; Jones, GS; Chen, F. 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 175:258- 266
- Lowry, O; Rosebough, N; Lewistarr, A; Randall, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemical* 193:265 – 275.

- Luna, D; Mojica, L; de Mejia, E; Mendoza, S; Loarca, G. 2014. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. Food Research International.
- Ma, Y; Xiong, Y; Zhai, J; Zhu, H; Dziubla, T. 2010. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein. Food Chemistry 118:582 - 588.
- Mäkinen, S. 2014. Production, isolation and characterization of bioactive peptides with antihypertensive properties from rapeseed and potato protein. Tesis Doc. Turku, Finland, Turku University.
- Malaguti, M; Dinelli, G; Leoncini, E; Bregola, V; Bosi, S; Cicero, AF. 2014. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. International Journal of Molecular Science 15:21120–21135.
- Maldonado, A; Jorrín, J. 2010. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* (en línea). Consultado 18 abr. 2018. Disponible en <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>.
- Mane, S; Jamdar, S. 2017. Purification and identification of Ace-inhibitory peptides from poultry viscera protein hydrolysate. Journal of Food Biochemistry. 41:2275 - 2285.
- Manoharan, S; Suriza, A; Abdullah, N. 2017. Structural characteristics and antihypertensive effects of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in the Renin-Angiotensin and Kallikrein kinin systems. African Journal of Traditional, complementary and alternative medicines 14(2):383 - 406.
- McLellan, T. 1982. Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. Analytical Biochemistry 126: 94 - 99.

- Michaud, A; Acharya, K; Masuyer G, Quenech'du, N; Gribouval, O; Moriniere, V; Gubler, M; Corvol, P. 2014. Absence of cell surface expression of human ACE leads to perinatal death. *Human Molecular Genetics* 23:1479 – 1491.
- Miguel, M; Hernández-Ledesma, B; López-Fandiño, R; Recio, I. 2012. Bioactive peptides. *In: Nollet LM, Toldrá F, editors. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. Florida, United States of America. CRC Press.*
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). 2017. Serie de estadísticas de producción agrícola (en línea). Consultado 09 abr. 2018. Disponible en http://frenteweb.minagri.gob.pe/sisca/?mod=consulta_cult.
- Mohanty, D; Jena, R; Choudhury, PK; Pattnaik, R; Mohapatra, S; Saini, MR. 2016. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties* 19:837 – 846.
- Moller, NP; Scholz-Ahrens, KE; Roos, N; Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition* 47:171–182.
- Montoya, A; Gómez, M; Reyes, C; Milán, J; González, E. 2015. Identification of Bioactive Peptide sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of Chronic Diseases. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* 14:139 - 158.
- Mora, L; Escudero, E; Fraser, P; Aristoy, M; Toldrá, F. 2014. Proteomic Identification of Antioxidant Peptides from 400 to 2500 Da Generated in Spanish Dry-Cured Ham Contained in a Size-Exclusion Chromatography Fraction. *Food Research International* 56:68–76.
- Moreno, L. 2016. Estudio de la estabilidad de la C-Ficocianina. Tesis Ing. Almería, España, Universidad de Almería.

- Mosquera, M. 2014. Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. Tesis Doc. Madrid, España, UCM.
- Muhamyankaka, V; Shoemaker, C; Nalwoga, M; Zhang, X. 2013. Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. International Food Research Journal 20(5):2227-2240.
- Mulero, J; Zafrilla, P; Martinez-Cacha, A; Leal, M; Avellan, J. 2013. Péptidos bioactivos. Clinical Investigation Arteriosclerosis. 23 (5):219 – 227.
- Müller, W. 2008. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la vida. Editorial Barcelona, España. Reverté.
- Navarro, R; Herrera, C; Zúñiga, R; Enrione, J; Guzmán, F; Matiacevich, S; Astudillo, C. 2017. Quinoa proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) fractionated by ultrafiltration using ceramic membranes: The role of pH on physicochemical and conformational properties. Food and bioproducts processing 102:20-30.
- Nelson, D; Cox, M. 2015. Lehninger Principios de bioquímica. Sexta Edición. Editorial Barcelona, España. Omega.
- Nongonierma, A; Le, MS; 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.
- Norris, R; FitzGerald, RJ. 2013. In Hernández-Ledezma. Bioactive Food Peptides in Health and Disease. Croatia. Hseih.
- Ochoa, K. 2017. Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para obtener peptides bioactivos. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú, UNALM.
- Ojiugo, F. 2014. Bioactive molecules in plant foods. New York, United States of America. Nova Science.

- Orozco, C; Albarrán, G; Esteban, R; García, S. 2008. Ultrafiltración de Caldos de Fermentación. *Información Tecnológica* 19:37-44.
- Pérez, M; Soriano, J; Ponce, E; Díaz, L. 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *NACAMEH* 9(2):77-96.
- Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: functionality and production. *Agro Food Industry Hi-Technology* 17:24–26.
- Pirie, N. 2011. *Food Protein Sources*. Cambridge, United Kingdom. Cambridge University Press.
- Polaina, J; MacCabe, A. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, function and applications*. Dordrecht, The Netherlands. Springer.
- Przybylski, R. Firdaous L. Châtaigné G. Dhulster P. Nedjar N. 2016. Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry* 211:306–313.
- Quirós del Bosque, A. 2007. *Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su disponibilidad*. Tesis Doc. Madrid, España, Universidad Autónoma de Madrid.
- Ramírez, M. 2015. *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience.
- Repo-Carrasco, R; Acevedo, A; Alvarez, J; Kallio, H. 2009. Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) grain, extrudate and bran. *Plant Foods for Human Nutrition* 64:94 - 101.
- Rosas, M; Pastelín, G; Vargas, G; Martínez, J; Lomelí, C; Mendoza, C; Lorenzo, A. 2008. Guías clínicas para la detección, prevención, diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial sistémica en México. *Archivos de cardiología de México* 78(2) (en línea).

Consultado 30 nov. 2017. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402008000600001&lng=es&nrm=iso.

Saraswathy, N; Ramalingam, P. 2011. Introduction to proteomics. In: concepts and Techniques in Genomics and Proteomics. Woodhead Publishing Limited.

Sarmadi, B; Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31: 949-1956.

Schägger, H; von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166(2):368 - 379.

Segura-Campos, M; Chel, L; Betancur, D. 2013. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona, España. Omniascience.

Selamassakul, O; Laohakunjit, N; Kerdchoechuen, O; Ratanakhanokchai, K. 2016. A novel multi-biofunctional protein from brown rice hydrolysed by endo/endo-exoproteases. *Food & Function* 7:2635 – 2644.

Shoenlechner, R; Siebenhandl, S; Berghofer, E. 2008. Pseudocereals. In: *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Arendt, EK; Dal Bello, F. (Eds.). Elsevier Academic Press. Amsterdam, The Netherlands.

Sienkiewicz, E; Jarmołowska, B; Krawczuk, S; Kostyra, E; Kostyra, H; Bielikowicz, K. 2009. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *International Dairy Journal* 19:252–257.

Silva-Sanchez, C; de la Rosa AP; Leon-Galvan, MF; de Lumen, BO; de Leon-Rodriguez, A; de Mejia, EG. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1233 – 1240.

- Singh, B. Vij, S., Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides* 54: 171-179.
- Sorensen, H; Sorensen, S; Bjerregaard, C; Michaelsen, S. 2007. *Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis*. New York, United States of America. Royal Society of Chemistry.
- Statpoint Technologies Inc. 2006. *Statgraphics Centurion Versión XV*. E.U.A: Stat Point, Inc.
- Sun, J; He, H; Xie, BJ. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6646–6652.
- Torres-Fuentes, C; Alaiz, M; Vioque, J. 2011. Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry* 129:485 - 490.
- 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.
- Udenigwe, C., Aluko, E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science* 71 (1):11-24.
- Valenzuela, C; Abugoch, L; Tapia, C; Gamboa, A. 2013. Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science and Technology* 48:843 - 849.
- Vallabha, VS; Tiku, PK. 2014. Antihypertensive peptides derived from soy protein by fermentation. *International Journal of Peptides Research and Therapeutics* 20:161 – 168.
- Van Platernik, C; Janssen, HG; Horsten, R; Haverkamp, J. 2006. Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 830:151–157.

- Vavricka, S; Burri, E; Beglinger, C; Degen, L; Manz, M. 2009. Serum Protein Electrophoresis: An underused but very useful test. *Digestion* 79:203 - 210.
- Velásquez, M. 2018. Hidrólisis Enzimática de la proteína de kiwicha (*Amaranthus caudatus* Linneaus) para obtener péptidos con propiedades antioxidante y antihipertensiva. Tesis Mg.Sc. Lima, Perú, UNALM.
- Vercruyse, L; Van Camp, J; Smagghe, G. 2005. Ace inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8106 - 8115.
- Vignesh, R; Srinivasan, M; Jayaprabha, MA; Badhul, H. 2012. The functional role of fish protein hydrolysate derived bioactive compounds in cardioprotection and antioxidative functions. *International Journal of Pharmacy and Biological Science* 3(1):560 - 566.
- Voet, D; Voet, G. 2006. *Bioquímica*. 3 ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana.
- Walters, R. 2013. Pseudocereals: Super Foods, or Pantry Hokum (en línea). Consultado 01 dic. 2017. Disponible en <http://open-furrow.soil.ncsu.edu/Documents/UTW/Psedocereals.pdf>.
- Wang, Q; Li, W; He, Y; Ren, D; Kow, F; Song, L; YU, X. 2014. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhainensis*). *Food Chemistry* 145:991-996.
- Wheeler, D; Chrambach, A; Ashburn, P; Jovin, T. 2004. Discontinuous buffer systems operative at pH 2.5 - 11.0 and 25 °C. *Electrophoresis* 25:973 - 974.
- 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.

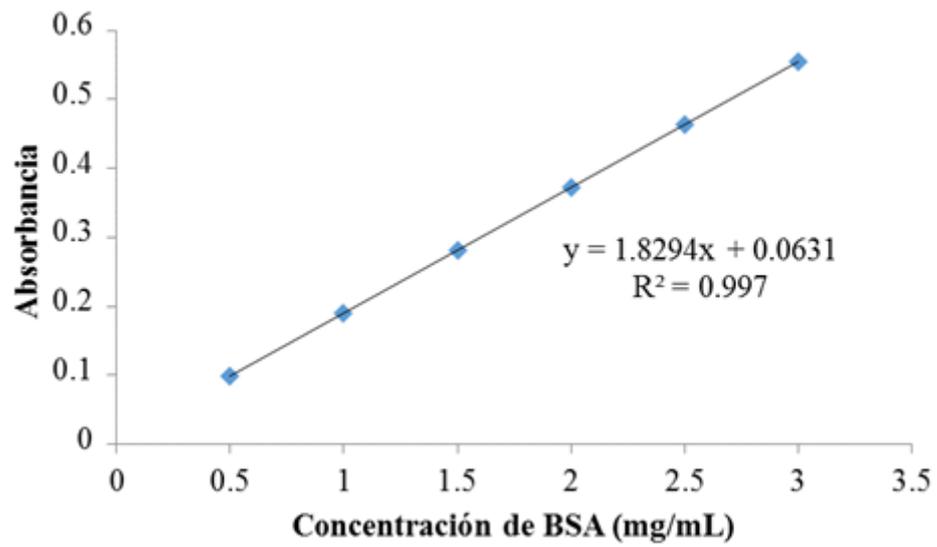
- Wu, J; Aluko, R; Muir, A. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 15:125-130.
- Yada, R. 2017. *Proteins in Food Processing*. 2 ed.. Cambridge, United Kingdom. Woodhead Publishing
- Yamamoto, D; Takai, S; Miyazaki, M. 2007. Prediction of interaction mode between a typical ACE inhibitor and MMP-9 active site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354:981–984.
- Yin, N; Brimble, MA; Harris, PW; Wen, J. 2014. Enhancing the oral bioavailability of peptide drugs by using chemical modification and other approaches. *Medicinal Chemistry* 4:763–769.
- Yousr, M; Howell, N. 2015. Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 16(12):29161-29178.
- Yu, J; Hu, Y; Xue, M; Dun, Y; Li, S; Peng, N; Liang, Y; Zhao, S. 2016. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(7):1216 - 1223.
- Zhang, T; Li, Y; Miao, M; Jiang, B. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry* 128:28 - 33.
- Zhang, J; Zhang, H; Wang, L; Guo, X; Wang, X; Yao, H. 2010. Isolation and identification of antioxidative peptide from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry* 119:226 - 234.

Zhou, D., Zhu, B., Qiao, L., Wu, H., Li, D., Yang, J., Murata, Y. 2012. *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discushannai* Ino) viscera. Food and Bioproducts Processing 90:148–154.

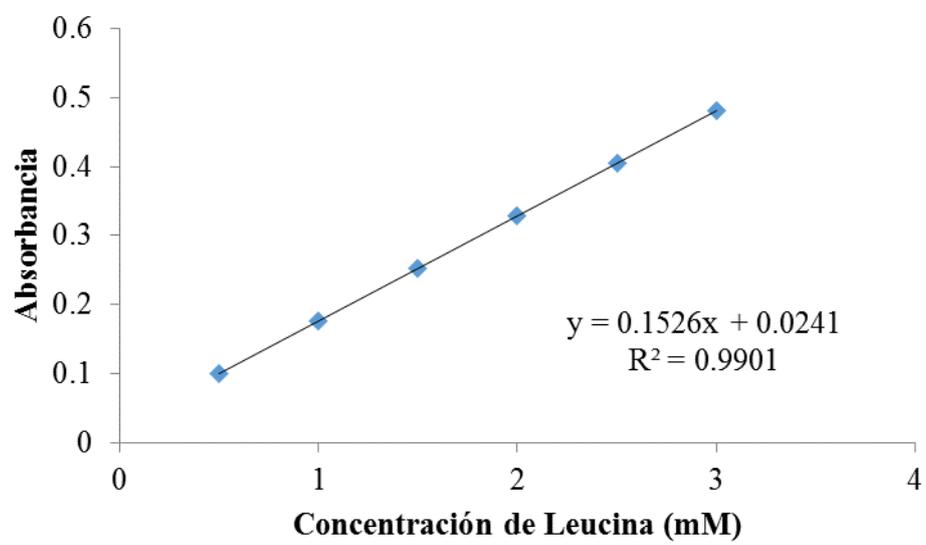
Zhuang, H; Tang, N; Yuan, Y. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. Journal of Functional Foods 5:1810-1821.

VIII. ANEXOS

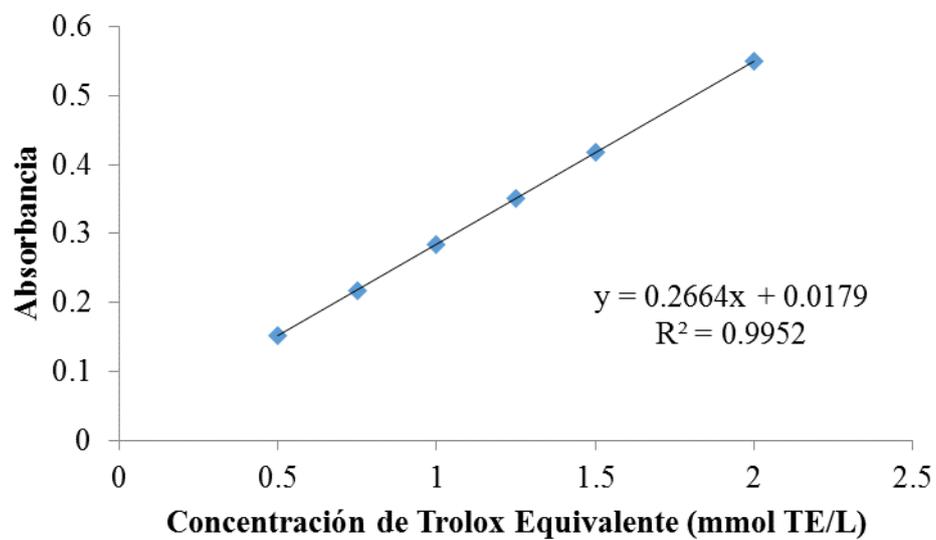
ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE



ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE LEUCINA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRADO DE HIDRÓLISIS



ANEXO 3: CURVA ESTÁNDAR DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS⁺



ANEXO 4: ANOVA SIMPLE –ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL CPC Y HPC

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 2

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.61228	1	2.61228	1955.79	0.0000
Intra grupos	0.00534267	4	0.00133567		
Total (Corr.)	2.61762	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CPC	3	0.620333	X
HPC	3	1.94	X

ANEXO 5: ANOVA SIMPLE –ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR *CUT OFF*

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0816123	3	0.0272041	27.90	0.0001
Intra grupos	0.00780133	8	0.000975167		
Total (Corr.)	0.0894137	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HPC	3	1.94	X
Permeado 10 kDa	3	2.06	X
Permeado 3 kDa	3	2.11	X

ANEXO 6: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE LA ECA - I POR *CUT OFF*

Variable dependiente: Inhibición de la ECA - I (por ciento)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.84333	2	4.42167	2.44	0.2352
Intra grupos	5.445	3	1.815		
Total (Corr.)	14.2883	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ECA.HPC	2	69.85	X
ECA.Permeado 10 kDa	2	71.0	X
ECA.Permeado 3 kDa	2	72.8	X

ANEXO 7: ANOVA SIMPLE – VALOR IC₅₀ POR CUT OFF

Variable dependiente: Valor IC₅₀ (mg/mL)

Factor: *Cut off*

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.005149	2	0.0025746	42.48	0.0063
Intra grupos	0.000181	3	0.0000606		
Total (Corr.)	0.005331	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
IC ₅₀ Permeado 3 kDa	2	0.0885	X
IC ₅₀ Permeado 10 kDa	2	0.13215	X
IC ₅₀ HPC	2	0.15965	X

ANEXO 8: ANOVA SIMPLE – ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR PICOS

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Picos

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.54078	2	3.27039	3047.26	0.0000
Intra grupos	0.00643933	6	0.00107322		
Total (Corr.)	6.54722	8			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AAOX.F-I	3	1.097	X
AAOX.F-II	3	2.21633	X
AAOX. F-III	3	3.18333	X

ANEXO 9: ANOVA SIMPLE –INHIBICIÓN DE LA ECA - I POR PICO

Variable dependiente: Inhibición de la ECA - I (por ciento)

Factor: Pico

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3903.97	2	1951.98	765.48	0.0001
Intra grupos	7.65	3	2.55		
Total (Corr.)	3911.62	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
% ECA. F-I	2	18.65	X
% ECA - I. F-II	2	64.35	X
% ECA - I. F-III	2	78.4	X

ANEXO 10: ANOVA SIMPLE – IC₅₀ DE LOS PICOS

Variable dependiente: IC₅₀ (mg/mL)

Factor: Pico

Número de observaciones: 4

Número de niveles: 2

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00737022	1	0.00737022	54.66	0.0178
Intra grupos	0.000269685	2	0.000134842		
Total (Corr.)	0.00763991	3			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F-III	2	0.05465	X
F-II	2	0.1405	X

ANEXO 11: SIMPLE – AAOX DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN

Variable dependiente: Actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Etapa

Número de observaciones: 18

Número de niveles: 6

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.66317	5	1.33263	1218.32	0.0000
Intra grupos	0.013126	12	0.00109383		
Total (Corr.)	6.67629	17			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F-I	3	1.097	X
HPC	3	1.94	X
Permeado 10 kDa	3	2.05567	X
Permeado 3 kDa	3	2.078	X
F-II	3	2.21633	X
F-III	3	3.18333	X

ANEXO 12: ANOVA SIMPLE – INHIBICIÓN DE LA ECA – I DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN

Variable dependiente: Inhibición de la ECA - I (por ciento)

Factor: Etapa

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 6

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4822.83	5	964.567	441.96	0.0000
Intra grupos	13.095	6	2.1825		
Total (Corr.)	4835.93	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F-I	2	18.65	X
F-II	2	64.35	X
HPC	2	69.85	X
Permeado 10 kDa	2	71.0	X
Permeado 3 kDa	2	72.8	X
F-III	2	78.4	X

ANEXO 13: ANOVA SIMPLE – IC₅₀ DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN

Variable dependiente: IC₅₀ (mg/mL)

Factor: Pico

Número de observaciones: 10

Número de niveles: 5

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0145647	4	0.00364116	40.32	0.0005
Intra grupos	0.000451495	5	0.000090299		
Total (Corr.)	0.0150161	9			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F-III	2	0.05465	X
Permeado 3 kDa	2	0.0885	X
Permeado 10 kDa	2	0.13215	X
F-II	2	0.1405	XX
HPC	2	0.15965	X

ANEXO 14: ABREVIATURAS DE NOMBRES DE AMINOÁCIDOS

ABREVIATURA	NOMBRE
A, Ala	Alanina
C, Cys	Cisteína
D, Asp	Ácido Aspártico
E, Glu	Glutamina
F, Phe	Fenilalanina
G, Gli	Glicina
H, His	Histidina
I, Ile	Isoleucina
K, Lys	Lisina
L, Leu	Leucina
M, Met	Metionina
N, Asn	Asparagina
T, Thr	Treonina
P, Pro	Prolina
Q, Gln	Glutamina
R, Arg	Arginina
S, Ser	Serina
V, Val	Valina
W, Trp	Triptófano
Y, Tyr	Tirosina