



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Actividad antimicrobiana de péptidos parcialmente
purificados de las fracciones proteicas de semillas de
kañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedades
Ramis y Cupi-sayhua**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y
Bioquímica

AUTOR

Gladys Angélica MOSCOSO MUJICA

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

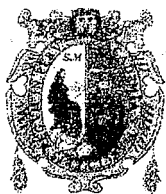
Lima, Perú

2016

Referencia bibliográfica

Moscoso G. Actividad antimicrobiana de péptidos parcialmente purificados de las fracciones proteicas de semillas de kañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) variedades Ramis y Cupi-sayhua [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2016.

743



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Siendo las 15:00 hrs. del 20 de diciembre del 2016 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez, Dra. Norma Julia Ramos Cevallos, y la Dra. María Elena Salazar Salvatierra; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS PARCIALMENTE PURIFICADOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE SEMILLAS DE KAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) VARIEDADES RAMIS Y CUPI-SAYHUA** presentado por la Magister en Ciencias Farmacéuticas **GLADYS ANGÉLICA MOSCOSO MUJICA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Excelente, Diecinueve (19)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Magister en Ciencias Farmacéuticas **GLADYS ANGÉLICA MOSCOSO MUJICA**, el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 17:30 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 17:40 hrs. del 20 de diciembre 2016.

Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte (P.P., D.E.)
Presidenta

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Miembro - Asesor

Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez (P.P., T.C.)
Miembro

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P.Aux., T.C.)
Miembro

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

RESUMEN

La kañiwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) es un grano andino que se cultiva en el altiplano Peruano - Boliviano entre 3000 a 4200 m de altitud, es una dicotiledónea que contiene proteínas entre 15 a 19% y composición balanceada de aminoácidos esenciales, son fuentes potenciales de péptidos bioactivos que podrán emplearse como nutracéuticos y alimentos funcionales.

El presente trabajo de investigación estudió el fraccionamiento proteico y caracterización electroforética de las proteínas de las semillas de kañihua variedades Ramis y Cupi-Sayhua, a través de la evaluación de cinco técnicas de fraccionamiento proteico según la solubilidad de Osborne considerando solventes, metodologías y tiempo de extracción, para obtener fracciones proteicas albuminas, globulinas 7S, globulinas 11S, prolaminas y glutelinas con mayores contenidos proteínicos y rendimientos porcentuales. Posteriormente, se utilizó la concentración 4% (p/v) de las fracciones proteicas de kañihua de ambas variedades, para hidrolizarlas con las enzimas Alcalasa, sistema secuencial Pepsina-pancreatina y Proteasa Ps, en las razones enzima/sustrato (E/S) 1:10, 1:30 y 1:50, se midió el grado de hidrólisis (GH) y la cinética de hidrólisis. A continuación, se determinó la inhibición del crecimiento microbiano de los hidrolizados sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* desde las 0 hasta 24 h mediante espectrofotometría. Luego, se seleccionaron los hidrolizados proteicos con mayor actividad antimicrobiana. Finalmente, se realizó la purificación parcial de los péptidos de estas fracciones por cromatografía de filtración en gel en dos matrices (Sephadex G-25 y G-10), y se volvió a evaluar la inhibición del crecimiento microbiano por espectrofotometría y por difusión en agar.

Los resultados del fraccionamiento proteico de las semillas de kañihua variedades Ramis y Cupi-Sayhua, mostraron el mayor contenido proteico en la harina deslipidizada en comparación a la integral ($P \leq 0,05$), el mayor rendimiento porcentual ($P \leq 0,05$) durante 1 h de extracción secuencial de las fracciones proteicas, se obtuvo con la técnica de Rodríguez *et al.* (2011) para albuminas y glutelinas, y con la técnica de Barba de la Rosa *et al.* (2009) para globulinas y prolaminas. Se encontró en kañihua Ramis y Cupi-Sayhua las concentraciones en albuminas de $15,4 \pm 0,3$ y $15,8 \pm 0,3\%$, globulinas 7S $24,1 \pm 0,5$ y $26,3 \pm 1,0\%$, globulinas 11S $25,7 \pm 1,0$ y $26,7 \pm 1,0\%$, prolaminas $9,6 \pm 0,1$ y $9,9 \pm 0,5\%$ y glutelinas $22,9 \pm 0,1$ y $21,5 \pm 1,4\%$, respectivamente. El perfil electroforético mostró

patrones similares en número de bandas y diferentes en concentración en ambas variedades de cañihua, siendo más intensas en cañihua Cupi-Sayhua.

Los resultados de la cinética de hidrólisis con las tres enzimas mostró mayor GH en la razón (E/S) 1:10, las albuminas presentaron diferentes tiempos de hidrólisis inicial progresiva e hidrólisis constante, para Alcalasa (2 y 24 h), Pepsina-pancreatina (1 y 3 h) y Proteasa Ps (2 y 9 h). Sin embargo, en las globulinas 7S, globulinas 11S y glutelinas tuvieron similares tiempos de hidrólisis inicial progresiva e hidrólisis constante (0,5 y 9 h) para Alcalasa y Proteasa Ps, y diferentes (2 y 4 h) con Pepsina-pancreatina; los tiempos de hidrólisis con las tres proteasas presentaron diferencias ($P \leq 0,05$). Además, se observó en la hidrólisis total (h_{total}) de las fracciones proteicas de cañihua en ambas variedades, valores de h_{total} entre 7,8 y 9,9%, similares a los reportados para trigo y soya. También, se obtuvo GH obtenidos con Alcalasa en albuminas que fueron variables entre 14 a 54, globulinas 7S entre 15 a 32, globulinas 11S entre 14 a 25, y glutelinas entre 12 y 30. Así mismo, los GH fueron variables con Pepsina-Pancreatina observándose en albuminas entre 22 a 67, globulinas 7S entre 7 a 29, globulinas 11S entre 17 a 31, y glutelinas entre 15 a 40. A diferencia, los GH fueron bajos con Proteasa Ps mostrándose en albuminas entre 4 a 8, globulinas 7S entre 5 a 12, globulina 11S entre 4 a 8, y glutelinas entre 4 a 15.

En los resultados de inhibición del crecimiento microbiano, los hidrolizados de cañihua Ramis y Cupi-Sayhua que presentaron mayor inhibición significativa fueron los obtenidos con el sistema secuencial Pepsina-Pancreatina, seguido de los hidrolizados de Alcalasa y Proteasa Ps. Observándose mayor inhibición del crecimiento significativo sobre *E. coli* y *S. aureus*. Además, los hidrolizados proteicos de cañihua de ambas variedades que presentaron inhibición del crecimiento microbiano mayor a 45% en comparación al control ($P \leq 0,05$), fueron los obtenidos por Alcalasa Glut KS 9 h (1:10) con 88,0% (GH 30%) y Glut KR 9 h (1:10) con 87,3% (GH 16%) sobre *E. coli*; Glob 7S KR 9 h (1:10) con 50,7% (GH 20%) contra *S. aureus*; Glob 11S KR 9 h (1:50) con 65% (GH 15%) sobre *C. albicans*. Los obtenidos por Pepsina-pancreatina Glut KS 4 h (1:10) con 88,7% (GH 40%) y Glut KR 4 h (1:10) con 87,7% (GH 37%) contra *E. coli*; Glob 11S KS 2 h (1:50) con 69,3% (GH 19%) sobre *S. aureus* y Glob 11S KR 2 h (1:10) con 68,3% (GH 23%) contra *C. albicans*. Los obtenidos por Proteasa Ps Alb KR 9 h (1:50) con 49,0% (GH 4%) sobre *C. albicans*. Finalmente, en la purificación parcial de los péptidos de cañihua se mostró incrementó significativo de la inhibición del crecimiento

microbiano en comparación a los hidrolizados proteicos, tanto en la prueba espectrofotométrica como en difusión en agar, siendo el péptido Glut KS 4 h (1:10) el que presentó inhibición frente a *E. coli* y *C. albicans* por debajo de los controles gentamicina y nistatina. Además, este péptido obtenido con el sistema secuencial Pepsina-pancreatina mostró alta inhibición del crecimiento microbiano significativo ($\% \text{ Inh} \leq 95$). Estos resultados, fueron corroborados con la prueba de difusión en agar, donde se observaron los halos de inhibición ($P \leq 0,05$) en comparación a los controles.

Palabras Claves: *Chenopodium pallidicaule* Aellen, kañihua, proteínas, fraccionamiento proteico, hidrolizados proteicos, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The kaniwa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) is an Andean grain that is grown in the Highlands of Peru - Bolivian between 3000 to 4200 m altitude, It is a dicotyledon containing proteins between 15 to 19% and balanced composition of essential amino acids, they are potential sources of bioactive peptides that can be used as nutraceuticals and functional foods.

The present research work studied protein fractionation and characterization of proteins from the seeds of kanihua electrophoretic Ramis and Cupi-Sayhua varieties, through the evaluation of five according to the solubility of Osborne protein fractionation techniques whereas solvents, methodologies, and extraction time, to obtain protein fractions albuminas, globulins 7S, 11S globulins, prolamins and glutelinas with higher protein contents and percentage yield. Subsequently, used concentration 4% (w/v) of protein fractions of kanihua of both varieties, to hydrolyze them with enzymes Alcalasa, System sequential Pepsina-pancreatina and Proteasa Ps, enzyme/substrate reasons (E/S) 1:10, 1:30 and 1:50, measured the degree of hydrolysis (GH) and the kinetics of hydrolysis. Then it was determined the inhibition of microbial growth of hydrolysates on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* from the 0 to 24 h by spectrophotometry. Then, we selected protein hydrolysates with increased antimicrobial activity. Finally, partial purification of peptides of these fractions was performed by filtration chromatography gel in two arrays (Sephadex G-25 and G-10), and turned to assess the inhibition of microbial growth by spectrophotometry and by diffusion on agar.

The results of protein fractionation of the seeds of kanihua varieties Ramis and Cupi-Sayhua, they showed the higher protein content in flour deslipidizada in comparison to the integral ($P \leq 0.05$), the highest percentage yield ($P \leq 0.05$) during 1 h of sequential extraction of protein fractions, He was obtained with the technique of Rodriguez et to the. (2011) for albuminas and glutelinas, and with the beard of the rose et technique to the. (2009) to globulins, prolamins. The concentrations found in Ramis and Cupi-Sayhua kanihua in albuminas of 15.4 ± 0.3 and $15.8 \pm 0.3\%$, S globulin 24.1 ± 0.5 and $26.3 \pm 1.0\%$, 11S globulins 25.7 ± 1.0 and $26.7 \pm 1.0\%$, prolamins 9.6 ± 0.1 and $9.9 \pm 0.5\%$ and glutelinas 22.9 ± 0.1 and $21.5 \pm 1.4\%$, respectively. The electrophoretic profile showed patterns similar to number of bands and different in concentration in both varieties of kanihua, being more intense in Cupi-Sayhua kanihua. The results of the kinetics of hydrolysis with three enzymes

showed greater GH in reason (I/O) 1: 10, you albuminas them showed different times of initial progressive hydrolysis and hydrolysis constant, Alcalasa (2 to 24 h), Pepsina-pancreatina (1 and 3 h) and Proteasa Ps (2 and 9 h). However, in globulins 7S, 11S globulins and glutelinas had similar initial progressive hydrolysis and hydrolysis constant (0.5-9 h) times for Alcalasa and Proteasa Ps, and different (2-4 h) with Pepsina-pancreatina; the three protease hydrolysis times showed differences ($P \leq 0.05$). In addition, observed in the total (htotal) hydrolysis of protein fractions of kanihua in both varieties, values htotal between 7.8 and 9.9%, similar to those reported for wheat and soy. Also, GH was obtained with Alcalasa in albuminas they were variables between 14-54, globulins 7S between 15 to 32, globulins 11S between 14 to 25, and glutelinas between 12 and 30. Likewise, the GH were variables with Pepsina-Pancreatina was observed in albuminas between 22 to 67, globulins 7S 7 to 29, globulins 11S between 17 to 31, and glutelinas between 15 to 40. In contrast, the GH were lower with Proteasa Ps showing in albuminas between 4 to 8, globulins 7S between 5 to 12, globulin 11S between 4 to 8, and glutelinas between 4 to 15.

In results from inhibition of microbial growth, kanihua Ramis and Cupi-Sayhua who presented more significant inhibition hydrolysates they were obtained with sequential system Pepsina-Pancreatina, followed by Alcalasa and Proteasa Ps hydrolysates. Noting greater inhibition of the significant growth of *e. coli* and *S. aureus*. In addition, hydrolysates protein kanihua of both varieties that showed inhibition of microbial growth greater than 45% compared to the control ($P \leq 0.05$), they were obtained by Alcalasa Glut KS 9 h (1:10) with 88.0% (GH 30%) and Glut KR 9 h (1:10) with 87.3% (GH 16%) on *e. coli*; Glob 7S KR 9 h (1:10) with 50.7% (GH 20%) against *S. aureus*; Glob 11S KR 9 h (1:50) with 65% (GH 15%) of *C. albicans*. Those obtained by Pepsina-pancreatina Glut KS 4 h (1:10) with 88.7% (GH 40%) and Glut KR 4 h (1:10) with 87.7% (GH 37%) against *e. coli*; Glob 11S KS 2 h (1:50) with 69.3% (GH 19%) of *S. aureus* and Glob 11S KR 2 h (1:10) with 68.3% (GH 23%) against *C. albicans*. Those obtained by protease Ps Alb KR 9 h (1:50) with 49.0% (GH 4%) of *C. albicans*. Finally, in the partial purification of peptides from kanihua showed significant inhibition of microbial growth in comparison to the protein hydrolysates, increased both in Spectrophotometric test as in diffusion in agar, being the peptide Glut KS 4 h (1:10) who presented inhibition against *e. coli* and *C. albicans* below controls gentamicin and Nystatin. In addition, this peptide retrieved with the sequential system Pepsina-pancreatina showed high (Inh $\leq 95\%$)

significant microbial growth inhibition. These results were corroborated with the diffusion test in agar, where were the halos of inhibition ($P \leq 0.05$) compared to controls.

Keywords: *Chenopodium pallidicaule* Aellen, kanihua, proteins, protein fractionation, hydrolyzed protein, antimicrobial activity.