

ISSN 1810-634X

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 78 N° 1  
ENERO - MARZO 2012



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**  
**CONSEJO DIRECTIVO**  
**(marzo 2011 - marzo 2013)**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>Presidenta</b>              | : Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo    |
| <b>Vice-Presidente</b>         | : Dr. Emilio Guija Poma                  |
| <b>Secretario General</b>      | : Ing. Quím. Manuel Otiniano Cáceres     |
| <b>Tesorera</b>                | : Ing. Quím. Ana María Osorio Anaya      |
| <b>Secretaria del Consejo</b>  |  |
| <b>Directivo</b>               | : Quím. María Angélica Best de Rodríguez |
| <b>Directora de Biblioteca</b> | : Quím Farm. Gabriela Soriano Chávez     |
| <b>Director Administrativo</b> | : Quím. Neptalí Ale Borja                |
| <b>Vocales</b>                 | : Dr. José Juárez Eyzaguirre             |
|                                | : Quím. Lucía Mondragón Hernández        |
|                                | : Dra. María Luisa Castro de Esparza     |
|                                | : Dra. María del Rosario Sun Kou         |
|                                | : M. Sc. Jorge Eduardo Loayza Pérez      |
|                                | : M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez      |
|                                | : Quím Farm. Nora Herrera Hernández      |

**Comisión de Economía y Finanzas**

Presidente: Dr. José Amiel Pérez

**Comisión de Publicaciones**

Presidente: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

**Comisión de Actuaciones Científicas**

Presidenta: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez

**INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA**  
**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

LABORATORIO DANIEL ALCIDES CARRIÓN S.A.  
UNIÓN DE CERVECERÍAS PERUANAS BACKUS & JHONSTON S.A.  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - UNMSM  
UNIVERSIDAD NORBERT WIENER

**REVISTA**  
**de la**  
**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

(Rev Soc Quím Perú)

**ISSN 1810 - 634X**

**Revista Trimestral**

**Comité Editor**

**Presidente** : Ana María Muñoz Jáuregui

**Editor en Jefe** : Luis Valles Fernández

**Miembros** : Ana Valderrama Negrón

Julio Santiago

**Comité Consultivo**

Beyer, Lothar

**Universidad de Leipzig - Alemania**

Calvo Buendía, Eduardo

**Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú**

Chávez Orellana, Haydee

**Univ. Nac. San Luis Gonzaga - Perú**

García Herbosa, Gabriel

**Universidad Burgos - España**

Gamboa Fuentes, Nadia

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Guija Poma, Emilio

**Universidad Científica del Sur - Perú**

Muñoz Jáuregui, Ana María

**Universidad San Martín de Porres**

Lock Sing, Olga

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Angulo Cornejo, Jorge

**Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú**

Korswagen Ederi, Richard

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Picasso, Gino

**Universidad Nacional de Ingeniería - Perú**

Rueda Sánchez, Juan Carlos

**Pontificia Universidad Católica del Perú**

Rabinovich Jaitin, Daniel

**University of N. Carolina, USA**

Troncoso Corzo, Luzmila

**Facultad de Medicina UNMSM - Perú**

Gutiérrez Correa, Marcel

**Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú**

**Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex**

**Licenciada en EBSCO**

Sede: Av. Nicolás de Aránibar 696 Santa Beatriz – Lima 01

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925 Fax: (511) 265-9049

e-mail: [revsqp@gmail.com](mailto:revsqp@gmail.com) / [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)

Portal web: [www.sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe)

**Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú**

**Certificado N° 95-1567**

---

**Vol 78**

**ENERO - MARZO 2012**

**N°1**

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00



## CONTENIDO

(Vol 78 N° 1 - 2012)

|  |  |    |
|--|--|----|
| -  | <i>Editorial</i> .....   | 1  |
| <b>Trabajos originales</b>                 |  |    |
| -  | Aislamiento y caracterización bioquímica de la bilinearina, un factor activador de protrombina del veneno de la serpiente peruana <i>Bothrops bilineatus</i> (loro machaco), por Edith Rodríguez, Gustavo A. Sandoval, Armando Yarlequé. ....  | 3  |
| -  | Remoción de cromo (VI) empleando carbones preparados por activación química a partir de las astillas de eucalipto, por Carmencita Lavado Meza, María del Rosario Sun Kou, Nidia Recuay Arana. ....   | 14 |
| -  | Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo, por Yarlequé, Mirtha; Ortiz, César; Morante, Yolanda; Yarlequé, Armando. ....  | 27 |
| -  | Análisis proximal, características fisicoquímicas y actividad antimicrobiana del musgo blanco, ( <i>Sphagnum maguellanicum</i> Bril.) proveniente de Junín, Perú, por David Condori, Marco Piñatelli, Rafael Elías, Rosario Rojas. ....  | 37 |
| -  | Purificación y caracterización de bilineatobina, una proteína coagulante del veneno de la serpiente peruana arborícola <i>Bothrops bilineatus</i> (loro machaco), por Gladys Cahuana, Dan Vivas, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé. ....   | 43 |
| -  | Extracción con soluciones neutras y alcalina para el aislamiento de fibra soluble e insoluble a partir de salvado de quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Wild), kiwicha ( <i>Amaranthus caudatus</i> L.) y cañihua ( <i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen), por Carlos A. Ligarda Samanez, Ritva Repo-Carrasco, Christian R. Encina Zelada, Iván Herrera Bernabé, Zory Quinde -Axtell. .... | 53 |
| -  | Fe de erratas .....  | 65 |
| <b>INFORMACIONES</b>                       |  |    |
| <b>A.- De la Sociedad Química del Perú</b> |  |    |
| -  | Conferencias de los “Jueves Científicos” .....   | 66 |
| -  | I Curso de Didáctica en Tópicos Selectos de Química .....  | 66 |
| -  | I Simposio Peruano de Nanotecnología .....   | 66 |
| -  | XXVI Congreso Peruano de Química .....   | 67 |
| <b>B.- Otras informaciones</b>             |  |    |
| -  | "Premio Medalla de Oro Hipólito Unanue" .....  | 68 |
| -  | Seminario taller: “Energía sostenible para todos. Promoviendo la investigación” .....  | 68 |
| -  | Agenda Química Virtual (AQV) .....   | 68 |

---

### Revista Arbitrada

**Derechos Reservados :** Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.

**Nota:** Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

**Los artículos de investigación** son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

**Las comunicaciones cortas** son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

**Las cartas al editor** son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

**Los trabajos de revisión** se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

**Los artículos de enseñanza de la química** son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

**Las notas informativas** corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos impresos y en formato electrónico (disco compacto o al correo electrónico [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 10 dólares por concepto de gastos administrativos, como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:

Cuando todos los autores son socios: S/. 90.00

Cuando todos los autores no son socios: S/. 180.00

Si entre los autores hay socios y no socios: S/. 135.00

Si los autores residen en el extranjero US\$ 100.

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, US\$ 10 por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará a partir de un mínimo de S/. 50.00

The publication of each work is subject to payment of the following ones:

When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/. 90.00

When all the authors are not partners: S/. 180.00

If among the authors there are partners and non partners: S/. 135.00

If the authors reside abroad US \$ 100.

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 10 for each author in excess.

## Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico [sqperu@gmail.com](mailto:sqperu@gmail.com)

1. El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar"). Los decimales deben llevar coma.
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.
4. Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).
5. Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).
6. El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.
7. Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábica seguido de punto. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y List of Journals Indexed in Index Medicus. (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.



## Editorial

### Se busca profesor de química

Quien desee formarse una opinión, la más acertada, sobre la situación de la educación (enseñanza) pública que reciben nuestros jóvenes, que haga un sondeo entre los recién egresados de un colegio estatal. Sus opiniones sobre el curso de química son de lo más desalentadoras, no existe otro curso tan descalificado como éste.

¿Qué es lo que pasa? La respuesta es obvia: simplemente falla el profesor. Un alto porcentaje de los profesores a quienes se les encarga este curso no saben química. Y como nadie puede dar de lo que no tiene, los estudiantes no aprenderán química, y en la elección de su futura profesión no querrán vérselas con la química.

Una prueba de ello es la escasez de postulantes a las Facultades de Educación e Institutos Pedagógicos, en la especialidad de Química. Por lo tanto, el número de pedagogos con esta especialidad será muy escaso. Entonces ¿qué hacer?, ¿existe cura para esta situación?

La química es la única ciencia que tiene su propio lenguaje, la nomenclatura. Su enseñanza en el curso debe empezar desde las primeras clases. No se trata de aprender de memoria las fórmulas de las diferentes sustancias, sino a deducirlas. Bastará para ello tomar como base unos treinta elementos de la tabla periódica, los comúnmente más usados en un curso de Química General.

Así, cuando poco después haya que referirse a las propiedades químicas de las sustancias, éstas se podrán representar por su fórmula; y al hablar de las “reacciones químicas fundamentales”, habrá que escribir la ecuación química correspondiente usando las fórmulas de los reactantes y productos.

Pero además, al igual que las otras ciencias naturales, la Química debe exponerse en base a experimentos. El estudiante debe comprobar por sí mismo lo que dicen el profesor y los textos; debe aprender a manipular equipos y reactivos bajo la tutela de un profesor con experiencia, evitando así riesgos para sí y sus compañeros.

Estos profesores son los profesionales de la Química: ingenieros químicos, químicos farmacéuticos o químicos puros, quienes a lo largo de cinco años de estudios universitarios han realizado muchos trabajos en diferentes laboratorios, como prácticas de los cursos de la especialidad. Además, como profesionales trabajan en laboratorios, en plantas piloto, plantas industriales, realizando análisis químicos, controlando procesos de producción o realizando investigación.

Nadie mejor que ellos para devolverle el prestigio al curso de Química en los colegios. Lo primero que debe exigirse a un profesor es que conozca a fondo el tema que va exponer a sus estudiantes. ¡Que enseñe el que sabe!, y si además sabe enseñar, ¡tanto mejor!

O sea, sí hay cura para esta lamentable situación del curso de Química en los colegios.

Al mejorar así la enseñanza de la química, aumentará el número de postulantes a las Facultades de Educación, en la especialidad y así en un futuro (próximo) tendremos buenos pedagogos enseñando bien el curso de química. La orientación vocacional de muchos jóvenes tiene mucho que ver con la calidad del profesor que tuvo en el colegio.

En muchos países del “primer mundo” el ingreso a la docencia en los colegios es a través de concursos de “oposición”, y la exigencia de una Maestría en la especialidad ya es bastante frecuente.

Lo dicho arriba busca mejorar la calidad del profesor en un plazo no muy largo; pero y que pasa con el currículo?

Quienes peinamos canas desde hace algunos años, no acabamos de creer a qué nivel han descendido los cursos de ciencias en los colegios durante los últimos decenios.

En el “Acuerdo Nacional” se habla de “... profundizar la educación científica...” Diez años después de firmado, sigue siendo letra muerta; ¿hasta cuándo? Hay que revalorizar las ciencias (Química, Física y Biología) en la Secundaria. Estos cursos deberían estar desdoblados en dos cada uno, distribuidos entre los años 3º, 4º y 5º, con unas 5 h semanales (teoría y práctica de laboratorio).

El desarrollo de un país se consigue en base a la educación. Si esto es cierto, qué esperamos en el Perú, tan rico en recursos naturales, para conseguirlo?

Muchos de los países que forman el bloque de los países más ricos, no tienen estas riquezas que sí tiene el Perú. En cambio poseen un alto porcentaje de su población con un nivel de educación profesional excelente.

Luis Valles F.  
Editor

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BILINEARINA, UN FACTOR ACTIVADOR DE PROTROMBINA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO)**

Edith Rodríguez<sup>1</sup>, Gustavo A. Sandoval<sup>1</sup>, Armando Yarleque<sup>1\*</sup>

### **RESUMEN**

A partir del veneno de *Bothrops bilineatus* (loro machaco) se ha detectado y purificado un activador de protrombina al cual se le ha designado con el nombre de bilinearina. Su aislamiento se consiguió en dos pasos cromatográficos en columnas de CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100 SF, equilibradas con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 7,0, purificándola 10,4 veces con un rendimiento de 78,3%, obteniéndose un 7,5% de proteína activa. Asimismo, se determinó que esta enzima es una glicoproteína básica constituida por 2 cadenas polipeptídicas con un peso molecular de 23 kDa, conteniendo 8,4% de carbohidratos asociados. La enzima procoagulante es capaz de atacar directamente la protrombina comercial sin la adición de  $Ca^{2+}$ , ni fosfolípidos, produciendo trombina activa con capacidad de coagular el plasma humano citratado. Además, la fuerte inhibición registrada con los agentes quelantes EDTA y EGTA, reveló que la bilinearina es una metaloproteasa, con una marcada reducción en su actividad enzimática empleando 2-mercaptoetanol. Esta enzima es estable sólo hasta 45 °C, perdiendo 60% de su actividad luego de su exposición a 55 °C. Finalmente, los ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis demostraron que bilinearina es una proteína inmunogénica que produce reacción con el antiveneno botrópico polivalente (INS-Perú).

**Palabras clave:** *Bothrops bilineatus*, veneno, protrombina, coagulación.

## **ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF BILINEARIN, A PROTHROMBIN-ACTIVATOR FACTOR FROM *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO) PERUVIAN SNAKE VENOM**

### **ABSTRACT**

A prothrombin activator, called bilinearin, has been detected and isolated from *Bothrops bilineatus* (loro machaco) snake venom. For its isolation, a combination of two chromatographical steps, CM Sephadex C-50 followed by Sephadex G-100 SF in ammonium acetate buffer 05 M pH 7,0. This enzyme was purified 10,4 times with a yield of 78,3%, and a recovery of 7,5%. Furthermore, it was determined that its molecular weight is 23-kDa, and is formed by 2 polypeptide chains, and 8,4% of attached carbohydrates. Bilinearin is a procoagulant enzyme capable of attacking commercial prothrombin in a direct manner without addition of  $Ca^{2+}$  or phospholipids, producing an active thrombin with clotting activity on human plasma. It was also determined that bilinearin is a metalloprotease because of its

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú

\* E-mail: ayarleque48@gmail.com

strong inhibition by EDTA and EGTA. This enzyme was also inhibited by 2-mercaptoetanol and after exposition to 55°C, although it was only active until 45°C. Finally, bilinearin is an immunogenic protein as demonstrated by its reaction to polyvalent bothropic antivenom (INS-Peru) using immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

**Key words:** *Bothrops bilineatus*, venom, prothrombin, clotting.

## INTRODUCCIÓN

Los activadores de protrombina son proteinasas que promueven la coagulación, actuando en diferentes etapas de este proceso para generar la formación de trombina a partir de la protrombina circulante. El fenómeno de coagulación es el proceso fisiológico de mayor significado como parte de la homeostasis, ya que la formación del coágulo de fibrina es decisiva para evitar el escape de la sangre de un vaso lesionado<sup>1</sup>. Tanto por la vía intrínseca o “lenta” como por la vía extrínseca o “rápida”, se puede formar el complejo activador de protrombina cuyo componente principal es el factor X activado (FXa); es decir, convertido en una proteasa funcional a partir de su zimógeno, siendo los fosfolípidos, el calcio y otros componentes, como los factores V, VII y VIII cofactores del evento, dependiendo de la vía utilizada. Este complejo activador es el responsable de la escisión de la protrombina<sup>2</sup>.

En los venenos de serpientes se ha encontrado proteínas activadoras de la protrombina, las cuales pueden atacar directamente a esta molécula o producir acción sobre el factor X. Adicionalmente, se han descrito algunas proteínas que tienen acción sobre el factor V, para dar lugar a su activación y consiguiente participación no enzimática en el complejo activador de protrombina. En nuestro país, la serpiente venenosa *Bothriopsis bilineata* (loro machaco) es un espécimen arborícola distribuido con mayor frecuencia en los departamentos de Amazonas, Loreto, San Martín y Junín. A partir del análisis bioquímico y de la acción tóxica de su ponzoña se ha logrado identificar y caracterizar algunos de sus componentes, tales como la enzima similar a trombina<sup>3</sup>, la fosfolipasa A<sub>2</sub> y una fibrinogenasa. En el caso de la primera un análisis comparativo entre esa enzima con la de *Lachesis muta*, señalaba claramente que sólo tenía un 20% de su actividad coagulante, por lo que era necesario explorar la existencia de otras proteínas que participaran en la acción coagulante del veneno, probablemente algunos de los factores procoagulantes<sup>4</sup>.

Por este motivo, nos propusimos explorar e identificar un factor activador de protrombina al que hemos denominado bilinearina, siguiendo las pautas de Subcomité de Nomenclatura para Factores Hemostáticos Exógenos de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasis<sup>5</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Veneno

Se empleó veneno liofilizado obtenido a partir de especímenes de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus*, procedentes de la región de Pucallpa, departamento de Ucayali y mantenidos en cautiverio en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural (UNMSM). La extracción del veneno se realizó por presión manual de las glándulas, siendo este fluido tóxico liofilizado y conservado a 4°C hasta su utilización.

### Determinación de proteína

El contenido proteico del veneno crudo así como de las fracciones obtenidas fue cuantificado midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm<sup>6</sup> en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además, se empleó el método de Lowry<sup>7</sup> modificado en nuestro laboratorio<sup>8</sup> utilizando un fotolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, y empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### **Purificación de la bilinearina**

50 mg de veneno liofilizado de *B. bilineata* fueron resuspendidos en buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7,0 y centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue aplicado a una columna de intercambio catiónico en CM Sephadex C-50 (1,1 x 25 cm) equilibrada con el mismo buffer. La elución de los componentes se realizó colectándose fracciones de 1,5 mL en un colector automático LKB. Posteriormente se aplicó el mismo buffer conteniendo NaCl 0,3 M para la elución de las proteínas retenidas en el sistema. En cada fracción obtenida se estimó la actividad procoagulante usando plasma humano citratado. Las fracciones con mayor actividad fueron concentradas y aplicadas a una columna de filtración molecular en Sephadex G-100 SF (1,1 x 25 cm), previamente equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 7,0 y se colectaron fracciones de 1,0 mL. Las fracciones con actividad procoagulante fueron analizadas por electroforesis y usadas para la caracterización de la enzima.

### **Análisis electroforético**

Se empleó la Electroforesis en Geles de Poli(acrilamida) en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS)<sup>9</sup>. La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 10 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

### **Actividades enzimáticas**

*Actividad procoagulante.*- Se midió la capacidad de coagulación del veneno crudo sobre el plasma humano citratado, obtenido a partir de sangre venosa de personas voluntarias, la cual fue mezclada con citrato de sodio al 3,8% y centrifugada por 20 minutos a 1000 rpm, obteniéndose la fracción sobrenadante correspondiente. Para los ensayos se tomaron 0,2 ml de plasma citratado y 0,1 ml de veneno o de las fracciones obtenidas, incubándose las muestras a 37 °C hasta la obtención del coágulo total y registrándose los tiempos en segundos<sup>10</sup>. Asimismo, se probó la actividad de las mismas muestras sobre una solución de fibrinógeno bovino 5 mg/ml. en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

*Activación del factor II (Formación de trombina).*- La conversión de protrombina a trombina por acción de la bilinearina fue ensayado a partir de solución de protrombina comercial en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, la cual fue combinada con la enzima procoagulante e incubada a 37°C<sup>11</sup>. A intervalos de 5 minutos, se extrajeron alícuotas de la mezcla para ser analizadas tanto por PAGE-SDS como para medir la actividad coagulante de la trombina formada sobre fibrinógeno, BAPNA y Chromozym TH.

*Actividad sobre sustratos sintéticos.*- Se determinó la actividad amidolítica sobre BAPNA (benzoil arginil p-nitroanilida) según el método de Erlanger *et al.*<sup>12</sup>, así como sobre el sustrato Chromozym TH (Tos-Gly-Pro Arginil p-nitroanilida)<sup>13</sup>. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de proteína necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilida por minuto.

### **Determinación de carbohidratos asociados**

Para la determinación de carbohidratos asociados se emplearon las técnicas descritas por Winzler<sup>14</sup> para hexosas y hexosaminas, y por Warren<sup>15</sup> para ácido siálico.

### **Inhibición de la enzima por agentes químicos y físicos**

La tolerancia de la enzima purificada a la temperatura fue determinada entre el rango de 37°C a 70°C, Asimismo, se evaluó el efecto de inhibidores enzimáticos como el EDTA, EGTA y otros agentes químicos como el 2-mercaptoetanol a concentraciones finales de 0,5 a 5 mM. En ambos casos la enzima fue pre-incubada por 15 min. a determinados valores de temperatura o concentración de inhibidores para luego medir su actividad procoagulante sobre plasma humano citratado.

### Ensayos de inmunogenicidad

La inmunogenicidad de la enzima fue valuada mediante las técnicas de inmunodifusión e inmunolectroforesis de acuerdo a Ouchterlony y Nilsson<sup>16</sup>, empleando el antiveneno botrópico polivalente (INS-Perú).

## RESULTADOS

### Aislamiento de la bilinearina

La proteína procoagulante bilinearina fue purificada a través de dos pasos cromatográficos: en CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100 SF, respectivamente; a partir del veneno completo de *Bothrops bilineatus*. En el primer paso se obtuvo 2 picos de proteína eluidos isocráticamente los cuales crecieron de actividad procoagulante y otros 2 picos que eluyeron al aplicarse NaCl 0,3 M, correspondiendo la actividad al segundo pico (figura 1). Al emplearse Sephadex G-100 SF, la enzima fue obtenida en el primer pico de proteína con un  $V_e/V_o$  de 2,26 (figura 2). La evaluación de actividad enzimática sobre Chromozym TH reveló que la proteína aislada fue purificada 10,4 veces con un rendimiento de 78,3% y con una recuperación de proteína activa de 7,5% (tabla 1).

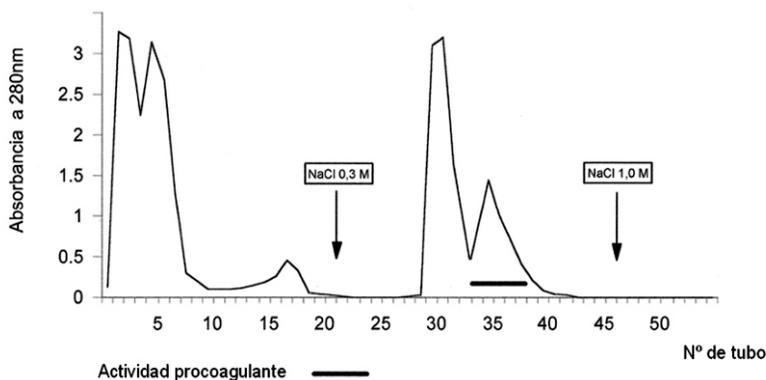


Figura 1. Primer paso de purificación de bilinearina a partir del veneno de *Bothrops bilineatus*. Cromatografía en CM Sephadex C-50

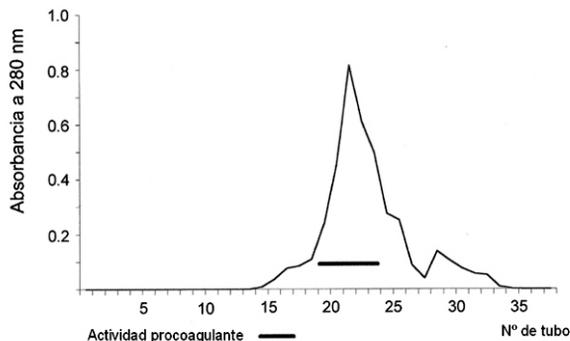


Figura 2. Segundo paso de purificación de bilinearina a partir del veneno de *Bothrops bilineatus*. Cromatografía en Sephadex G-100 SF

Tabla 1. Purificación de la bilinearina a partir del veneno de *Bothrops bilineatus*

| Muestra           | Proteína (mg) | Actividad específica (U/mg) | U.T.A. | Rendimiento (%) | Purificación (veces) |
|-------------------|---------------|-----------------------------|--------|-----------------|----------------------|
| Veneno crudo      | 170,7         | 0,45                        | 76,81  | 100             | 1                    |
| CM Sephadex C-50  | 19,53         | 3,3                         | 64,4   | 83,9            | 7,3                  |
| Sephadex G-100 SF | 12,84         | 4,68                        | 60,09  | 78,3            | 10,4                 |

La actividad específica fue determinada usando Chromozym TH como sustrato

U = unidades de actividad ( $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilida por minuto)

U.T.A. = Unidades Totales de Actividad

### Acción procoagulante de la bilinearina

Los ensayos con la proteína aislada para coagular el plasma humano citratado y el fibrinógeno bovino, respectivamente, mostraron que sólo en el caso del plasma se obtenía coagulación total en un tiempo promedio de 60 seg. cuando se utilizaron  $2,5 \mu\text{g}$  de enzima. En cambio, no se observó coagulación cuando se empleó fibrinógeno bovino  $5 \text{ mg/ml}$ , aun a tiempos mayores de 10 min. Asimismo, los experimentos en los que los productos de hidrólisis fueron capaces de atacar BAPNA, fibrinógeno y Chromozym TH, demostraron que la proteína en estudio es un activador directo de la protrombina, liberando trombina activa sin el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos o cualquier otro factor sanguíneo (tabla 2). Estos resultados concuerdan con los ensayos electroforéticos en los que se verificó la desaparición progresiva de la banda correspondiente a protrombina por acción de bilinearina y en cambio, apareció una nueva banda que es la trombina preformada (figura 3). Por esta razón, podemos afirmar que la bilinearina es una proteína procoagulante que activa directamente al factor II o protrombina por lo que pertenece al grupo I de activadores de protrombina<sup>23</sup>.

Tabla 2. Actividad de trombina a partir de protrombina por acción de bilinearina

| Sustrato                | Actividad específica (U/mg de proteína) |             |
|-------------------------|---|-------------|
|                         | Veneno crudo                            | Bilinearina |
| Plasma humano citratado | 0,59                                    | 6,6         |
| Fibrinógeno bovino      | 0,17                                    | 2,38        |
| BAPNA                   | 0,164                                   | 1,71        |
| Chromozym TH            | 0,45                                    | 4,28        |

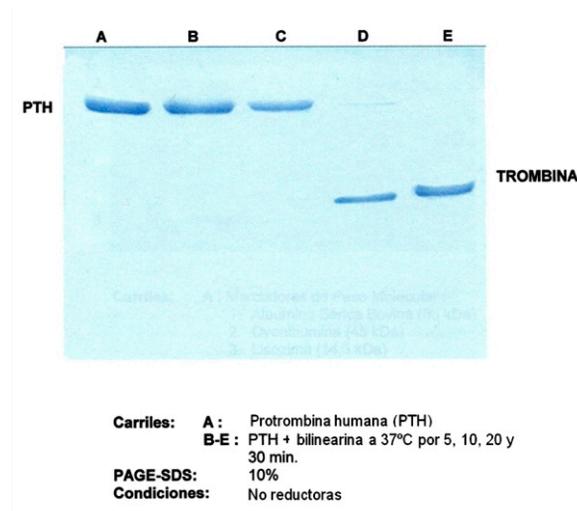


Figura 3. Formación de trombina a partir de protrombina por acción de la bilinearina determinado mediante PAGE-SDS

### Propiedades bioquímicas de la bilinearina

Mediante la técnica de PAGE-SDS se determinó que la bilinearina presenta un peso molecular de 23 kDa, lo que la sitúa en el rango de proteínas de mediano peso molecular. Al realizarse la corrida en presencia de 2-mercaptoetanol, la banda obtenida fue única pero con un peso molecular de 15 kDa (figura 4). Del análisis de carbohidratos asociados a la proteína en estudio, se reveló la presencia de 5,42% de hexosas, 1,45% de hexosaminas y 1,53% de ácido siálico, lo que demuestra que la enzima aislada es una glicoproteína que contiene un total de 8,4% de carbohidratos (tabla 3).

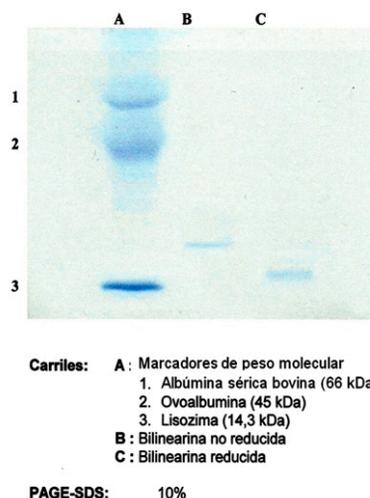


Figura 4. Determinación del peso molecular de la bilinearina mediante PAGE-SDS

Tabla 3. Carbohidratos asociados a la bilinearina

| Compuesto     | Concentración (%) |             |
|---------------|-------------------|-------------|
|               | Veneno crudo      | Bilinearina |
| Hexosas       | 3,2               | 5,42        |
| Hexosamina    | 0,15              | 1,45        |
| Ácido siálico | 2,5               | 1,53        |

### Inhibición por agentes físicos y químicos

La proteína coagulante no modificó su actividad hasta los 45°C; sin embargo, a 55°C se produjo una notable pérdida de actividad al 40% mientras que a 70°C se anuló completamente (tabla 4). Cuando la bilinearina fue tratada previamente con EDTA y EGTA se reveló que es inhibida parcialmente a concentraciones finales de 0,5 mM, mientras que a concentraciones de 5 mM se observó una inhibición total de la actividad procoagulante. En el caso del efecto del 2-mercaptoetanol, dicha actividad sólo se reduce a un 68% cuando se emplea una concentración de 5 mM (tabla 5).

Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad procoagulante de la bilinearina

| Temperatura (°C) | Actividad específica (U/mg) | Inhibición (%) |
|------------------|-----------------------------|----------------|
| 37               | 1,80                        | 0              |
| 45               | 1,79                        | 0              |
| 55               | 0,62                        | 40             |
| 70               | ---                         | ---            |

Tabla 5. Efecto de agentes químicos sobre la actividad procoagulante de la bilinearina

| Inhibidor        | Concentración (mM) | Inhibición (%) |
|------------------|--------------------|----------------|
| EDTA             | 0,5                | 34             |
|                  | 5,0                | ---            |
| EGTA             | 0,5                | 34             |
|                  | 5,0                | ---            |
| 2-mercaptoetanol | 0,5                | 20             |
|                  | 5,0                | 68             |

### Inmunogenicidad de la bilinearina

Las pruebas efectuadas con el veneno crudo y la enzima purificada de *Bothrops bilineatus* frente al suero antibotrópico polivalente, demostraron una marcada reactividad del veneno total, tanto en las pruebas de inmunodifusión como inmunoelectroforesis. En cuando a la enzima en estudio, se observó también reactividad frente al antiveneno, lo que indicaría que el suero contiene inmunoglobulinas anti-bilinearina (figura 5).

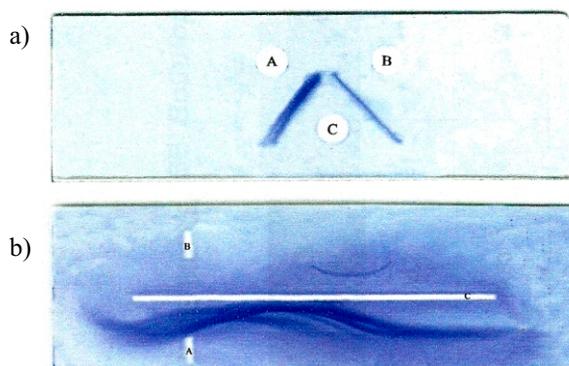


Figura 5. Evaluación de la inmunogenicidad de la bilinearina mediante a) inmunodifusión y b) inmunolectroforesis. (A) Veneno de *B. bilineatus* (20  $\mu$ g). (B) Bilinearina (5  $\mu$ g). (C) Antiveneno botrópico polivalente (INS-Perú)

## DISCUSIÓN

El proceso de coagulación sanguínea es parte del fenómeno de la hemostasis, el cual ocurre en los vertebrados como consecuencia de eventos destinados a evitar el sangrado. En este proceso, el fibrinógeno -proteína fundamental del plasma- es atacado enzimáticamente para convertirlo en fibrina y de ese ataque es responsable la trombina, proteína que se encuentra circulante sólo bajo la forma de su zimógeno, la protrombina. Fisiológicamente se ha demostrado que la ruptura enzimática de la protrombina depende de la formación de un complejo activador, en el que participan el factor Xa asociado a: fosfolípidos, iones calcio y ciertos factores procoagulantes. En cambio, en los venenos ofídicos existen proteasas específicas, conocidas como activadores, que pueden atacar directamente a la protrombina resultando ser enzimas procoagulantes<sup>17</sup>. Por otro lado, se puede producir coagulación si una proteína exógena ataca directamente el fibrinógeno, de modo semejante a como lo hace la trombina; estas son las proteínas coagulantes, también denominadas enzimas similares a trombina, contenidas en numerosos venenos de serpientes, principalmente aquellos de la familia Viperidae<sup>18</sup>. Si consideramos que la coagulación por la vía del ataque del fibrinógeno es un fenómeno directo mientras que, por la vía de la activación de la protrombina requiere por lo menos un paso adicional, podemos asumir que en el caso que un veneno contenga ambos tipos de enzimas, la coagulación no sólo será más intensa sino que probablemente por un tiempo mayor en la circulación<sup>1</sup>. Esto promueve, entonces, la necesidad de identificar plenamente a las enzimas disponibles en cada veneno para explicar sus efectos sobre la coagulación sanguínea.

### Aislamiento de la bilinearina

El procedimiento cromatográfico utilizado permitió purificar a la bilinearina con un valor de 10,4 veces con respecto al veneno crudo, con un elevado rendimiento de 78,3%, habiéndose recuperado 7,5% de proteína activa. En otros venenos de serpientes se ha logrado obtener proteínas activadoras de protrombina de este tipo, por ejemplo a partir del veneno de *Bothrops atrox*; Hofmann y Bon<sup>11</sup> separaron a la batroxarina a través de tres pasos cromatográficos con una purificación de 326 veces, un rendimiento de 5,6% y una recuperación de 0,02%.

Asimismo, del veneno de *A. halyspallas* se aisló una proteína análoga denominada aharina, usando tres pasos cromatográficos con una purificación de 80 veces y un rendimiento de 20%<sup>17</sup>. Así, el procedimiento empleado resultó idóneo, ya que permitió la separación de una nueva proteína, que en este caso se caracterizó por su acción procoagulante.

### Propiedades de la bilinearina

Nuestros experimentos -tratando la protrombina con bilinearina y luego determinando la actividad del producto enzimático sobre los sustratos para trombina (tabla 2) - demuestran fehacientemente que estábamos frente a un activador de protrombina. Dado que bilinearina coagula el plasma sin requerir la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  ni fosfolípidos exógenos, nuestra enzima correspondería al grupo I de los activadores de protrombina, grupo en el cual también se encuentra la ecarina obtenida de la serpiente africana *Echis carinatus*, proteína responsable de severos desórdenes en la coagulación por consumo de fibrinógeno<sup>20</sup>. Se ha demostrado que la acción enzimática de los activadores del grupo I se verifica por cortes en la protrombina humana a nivel de Arg320-Ile321 y en el caso de la protrombina bovina a nivel de Arg323-Ile324, generando en ambos casos meizotrombina, la cual se convierte en trombina por un proceso autocatalítico<sup>21</sup>. Posteriormente, se determinó que la bilinearina posee un peso molecular de 23 kDa (figura 3) el cual corresponde a las macromoléculas de mediano peso que se encuentran en venenos de serpientes tal como ocurre con las proteinasas I y II de *Lachesis muta*<sup>22</sup>. De igual manera, el hecho de que la bilinearina muestre valores de peso molecular marcadamente distintos para la proteína reducida y no reducida es una firme demostración que nuestra proteína es un dímero de 23 kDa conformado por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 15 kDa cada una. Así también, hemos demostrado que la bilinearina es una glicoproteína que contiene un total de 8,4% de carbohidratos asociados, habiéndose reportado para ecarina un 16% distribuido en proporciones cercanas entre hexosas, hexosamina y ácido siálico<sup>20</sup>. Adicionalmente, hemos demostrado que la bilinearina es una metaloproteinasas, pues la pre-incubación con los agentes quelantes EDTA y EGTA reducen progresivamente su actividad hasta anularla si se utiliza 5 mM de los reactivos mencionados (tabla 5). Así podemos mencionar una diferencia básica entre los activadores de protrombina, ya que todos los pertenecientes al grupo I, incluyendo ahora la bilinearina, son metaloproteinasas a diferencia de las proteinasas de los grupos II y III, que suelen ser serino o tiolproteinasas<sup>23</sup>. Finalmente, las pruebas de inmunogenicidad frente al antiveneno botrópico polivalente han dejado en claro que el veneno total posee determinantes antigénicos capaces de formar líneas o arcos de precipitación con el antiveneno, lo que significa que este antídoto es capaz de neutralizar las proteínas típicas de un veneno botrópico<sup>24</sup>. Asimismo, la reactividad encontrada con bilinearina bajo las mismas condiciones sugiere que esta proteína es susceptible a la neutralización por el antiveneno<sup>25</sup>.

### CONCLUSIONES

La presente investigación ha permitido purificar y caracterizar un activador de protrombina o bilinearina del veneno de *Bothrops bilineatus*, el cual ataca a la protrombina convirtiéndola en trombina sin requerimiento de ningún co-factor, por lo que la enzima en estudio pertenece al grupo I de dichos activadores. Se trata de una glicoproteína básica homodimérica y antigénica a juzgar por su reactividad frente al antiveneno botrópico polivalente (INS-Perú).

### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este estudio agradecen a la International Foundation for Science (Suecia) por el apoyo financiero brindado para la línea de investigación sobre proteínas coagulantes de venenos de serpientes peruanas en la cual está inmersa esta investigación. Con este trabajo experimental, uno de los autores (E.R.) obtuvo su grado de magíster en bioquímica en la UNMSM.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Kini RM. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:195-208.
2. Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-9.
3. Cahuana G. Características de un enzima coagulante aislada del veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* "loro machaco" y su comparación con una coagulasa bacteriana. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. 1996. UNMSM. Lima - Perú.
4. Rodríguez E, Cahuana G, Sandoval GA, Yarleque M, Yarleque A. Preliminar evaluation of coagulant activity of *Bothrops bilineatus* Peruvian snake venom "loro machaco". *Rev Soc Quim Peru*. 2010; 76(2):131-7.
5. Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):200-4.
6. Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
8. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quim Perú*. 1985;52(3):151-63.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
10. Yarlequé A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sánchez N, Hyslop S, *et al*. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989;27(11):1189-97.
11. Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. *Biochemistry*. 1987;26(3):772-80.
12. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
13. Friberger P. Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1982;162:1-298.
14. Winzler RJ. Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochemical Anal*. 1955;2:279-311.
15. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*. 1959;234(8):1971-5.
16. Ouchterlony O, Nilsson L. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. 1967;I: 655-660.
17. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.

18. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial-UNMSM; 2000.
19. Zhang Y, Lee WH, Gao R, Xiong YL, Wang WY, Zhu SW. Effects of Pallas' viper (*Agkistrodon halys pallas*) venom on blood coagulation and characterization of a prothrombin activator. *Toxicon*. 1998 Jan;36(1):143-52.
20. Schieck A, Kobnalik F, Habermann E. The prothrombin-activating principle from *Echis carinatus* venom. I. Preparation and biochemical properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1972;272(4):402-16.
21. Stocker K: Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker K (ed): *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, CRC Press, 1990, pp 97-160.
22. Rodríguez E, Yarlequé A. Purification and biochemical characterization of two proteinases from *Lachesis muta*, snake. *Toxicon*. 1990;28:261.
23. Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon*. 2005;45(8):1133-45.
24. Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
25. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.

## REMOCIÓN DE CROMO (VI) EMPLEANDO CARBONES PREPARADOS POR ACTIVACIÓN QUÍMICA A PARTIR DE LAS ASTILLAS DE EUCALIPTO

Carmencita Lavado Meza<sup>a\*</sup>, María del Rosario Sun Kou<sup>b</sup>, Nidia Recuay Arana<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se prepararon dos tipos de carbones activados a partir de astillas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) mediante activación química usando hidróxido de potasio (KOH) y ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) como agentes activantes. Estos materiales fueron preparados con una razón de impregnación de 1,0g/gca, a la temperatura de carbonización de 600°C con un flujo de N<sub>2</sub> de 100 cm<sup>3</sup>/min. Los carbones activados fueron caracterizados mediante FTIR, adsorción de N<sub>2</sub> a 77 K y medida de los grupos ácidos superficiales. Se evaluó la capacidad de adsorción de Cr(VI) en soluciones acuosas y en este proceso se analizó también la influencia de la concentración inicial y el pH de la solución. Los resultados cinéticos se ajustaron mejor al modelo de pseudo segundo orden y los resultados de las isoterms se correlacionaron mejor con el modelo de Langmuir, indicando que la adsorción se llevó a cabo en centros activos energéticamente homogéneos. Los mejores resultados se obtuvieron con el carbón activado P1/600, con una capacidad de adsorción 75,2 mg/g a pH=2.

**Palabras clave:** carbón activado, activación química, adsorción de Cr(VI), tratamiento de aguas.

## CHROMIUM (VI) ADSORPTION WITH ACTIVATED CARBONS PREPARED FROM WOOD CHIPS OF EUCALIYTUS BY CHEMICAL ACTIVATION

### ABSTRACT

Two types of activated carbons from chips of eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill) were prepared by chemical activation using potassium hydroxide (KOH) and phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) as activating agents. These materials were prepared with an impregnation ratio of 1,0 g/gca, carbonization temperature of 600°C with a N<sub>2</sub> flow of 100 cm<sup>3</sup>/min. Activated carbons were characterized by FTIR, N<sub>2</sub> adsorption at 77 K and measurement of surface acid groups. We evaluated the adsorption capacity of Cr (VI) in aqueous solutions and in the process we also analyzed the influence of the initial concentration and pH of the solution. The kinetic results were adjusted better to the pseudo second order model and the results of the isotherms were correlated better with the Langmuir model, indicating that the adsorption is carried out in homogeneous energetically active centers. The best results were obtained with activated carbon P1/600 with an adsorption capacity of 75,2 mg/g at pH=2.

**Key words:** activated carbon, chemical activation, adsorption of Cr (VI), water treatment.

---

<sup>a\*</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro del Perú, Av. Mariscal Castilla km 5, El Tambo, Huancayo, e-mail: calmeza@hotmail.com

<sup>b</sup> Dpto. de Ciencias- Sección Química. Pontificia Universidad Católica del Perú. Av. Universitaria 1801-San Miguel - Lima 32.

## INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal tóxico que en aguas residuales se encuentra principalmente en las formas iónicas: trivalente Cr(III) y hexavalente Cr(VI)<sup>1</sup>, dependiendo del pH de la solución, siendo el Cr(VI) el más tóxico y el que tiene mayor movilidad en solución, mientras que el Cr(III) no es dañino a bajas concentraciones y su movilidad es baja, ya que el Cr(OH)<sub>3</sub> es poco soluble<sup>2</sup>. Particularmente, el Cr(VI) tiene efectos carcinogénicos en animales y mutagénicos en humanos y bacterias. La contaminación del agua por cromo, generalmente, se debe a los efluentes industriales no tratados, generados por la minería, las industrias de curtiembre, galvanoplastia, y en la producción de acero, cemento, colorantes, material fotográfico y pinturas corrosivas<sup>3</sup>. La legislación peruana establece un límite máximo permisible (LMP) de Cr(VI) en los efluentes industriales de 0,1 ppm y de 0,05 ppm en agua potable. El cromo puede removerse empleando diversos métodos como: reducción, precipitación química, intercambio iónico y adsorción, siendo este último método uno de los más empleados por su versatilidad y bajo costo.

El carbón activado es un material que posee excelentes propiedades adsorbentes debido a que exhibe una alta área superficial, gran porosidad y presenta diversos grupos funcionales ácidos y básicos en su superficie<sup>4</sup>. Estudios realizados por diversos grupos de investigación<sup>(4-7)</sup> muestran que el carbón activado es un excelente material adsorbente en la remoción de sustancias orgánicas como fenoles, pesticidas, y aminos o nitratos, así como de diversos metales pesados en solución como Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, As<sup>3+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Hg<sup>2+</sup>.

Los carbones activados pueden ser preparados a partir de materiales ricos en carbono como los materiales lignocelulósicos<sup>8</sup>, tales como cáscara de coco, pepas de aceituna, bagazo de caña de azúcar, etc.; muchos de estos materiales, en la actualidad, son considerados desechos agrícolas. Con el fin de reducir los costos de producción, mayormente se buscan materiales económicos y disponibles en la región. Teniendo en cuenta lo anterior, para este trabajo se seleccionó como materia prima el *Eucalyptus globulus* Labill, que es una especie de eucalipto abundante en el Perú, especialmente en el valle del Mantaro. El presente estudio tuvo por objetivos la preparación y caracterización de carbones activados a partir de astillas de eucalipto, mediante activación química con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y KOH, y su aplicación como material adsorbente en la retención de Cr(VI) presente en soluciones acuosas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Preparación del material adsorbente

Se prepararon dos carbones activados, los cuales diferían en la solución impregnante empleada (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y KOH), siguiendo el procedimiento reportado por Lavado *et al.*<sup>5</sup>, y Bendezú *et al.*<sup>7</sup>. Se utilizó un método de impregnación por vía húmeda, a una relación de 1,0 g/g<sub>ca</sub> [masa de agente activante (g) / masa de carbón activado (g<sub>ca</sub>)], seguido de un proceso de carbonización que se llevó a cabo en un reactor de lecho fijo, a la temperatura de 600°C, durante 1 hora con flujo continuo de N<sub>2</sub> de 100 cm<sup>3</sup>/min. Finalmente, los carbones obtenidos fueron lavados con abundante agua destilada, secados en una estufa por 24 horas a 80°C y tamizados con malla 200 para tener un tamaño uniforme de partícula. Los carbones impregnados con KOH y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, fueron identificados como K1/600 y P1/600, respectivamente.

### Caracterización de los materiales

La caracterización textural de los carbones activados se realizó por adsorción de N<sub>2</sub> a la temperatura de 77K, utilizando un equipo Micromeritics modelo GIQ-UPV. Los materiales

fueron previamente desgasificados a 200°C por un tiempo de 12 h, con el objeto de eliminar el agua fisisorbida y posibles impurezas que hubiera en la superficie del sólido. Para la determinación del área superficial y volumen de microporos se utilizaron las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET)<sup>9</sup> (Ec.1) y de Dubinin-Radushkevich (D-R) (Ec.2):

$$\frac{1}{[V(P_0/P) - 1]} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (1)$$

$$\log N = \log N_m - D \log^2 (P/P_0) \quad (2)$$

Donde:

V es el volumen adsorbido por gramo de muestra (cm<sup>3</sup>/g). V<sub>m</sub> es el volumen adsorbido para la formación de la monocapa por gramo de muestra (cm<sup>3</sup>/g). P es la presión del nitrógeno adsorbido en el equilibrio (atm). P<sub>0</sub> es la presión de saturación del nitrógeno en condiciones normales (atm). P/P<sub>0</sub> es la presión relativa. C es la constante BET relacionada con el calor de adsorción. N es la cantidad de moléculas adsorbidas por gramo de muestra (moléculas/g). N<sub>m</sub> es la cantidad de moléculas adsorbidas para la formación de una monocapa por gramo de muestra (molécula/g). D es la constante relacionada con el coeficiente de afinidad y la temperatura.

El estudio de los grupos funcionales presentes en la materia prima (astillas de eucalipto) y en los carbones activados se realizó por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR). El equipo instrumental utilizado fue un Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 1600T. Para cada ensayo se prepararon pastillas de carbón activado mezclado con KBr, las muestras fueron analizadas en un rango espectral de 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>. La determinación de los grupos ácidos se basa en el hecho de que una base fuerte, como el NaOH, neutraliza los centros ácidos presentes en la superficie del carbón activado.

La determinación de estos grupos ácidos superficiales se llevó a cabo siguiendo el método Boehm, descrito por Aygün *et al*<sup>10</sup>. Se mezcló 0,25g de carbón activado con 50 mL NaOH 0,05 M (estandarizado con biftalato ácido de potasio, KHP); esta mezcla se agitó por 24 horas a una velocidad de 100 rpm; después se extrajo 20 mL de la solución remanente y se tituló con 0,05M de HCl (estandarizado con la solución 0,05M de KOH), usando como indicador azul de bromocresol. El punto final fue determinado por el viraje de un color azul a verde en la solución. Los resultados fueron expresados en mmolH<sup>+</sup>/g carbón activado.

### Proceso de adsorción de Cr(VI)

El estudio inicial del proceso se realizó con la determinación de la cinética de adsorción para establecer el tiempo de contacto necesario para lograr las condiciones de equilibrio. Se utilizó una relación de masa de carbón/volumen de solución de 50mg/50mL. Durante el proceso de adsorción a diferentes intervalos de tiempo, se separaron pequeñas alícuotas de 1 mL a las cuales, después, se determinó el contenido de Cr(VI) por espectroscopía UV, usando 1,5 mL de difenil carbazida como agente complejante a una longitud de onda de 540 nm<sup>11</sup>. Las curvas cinéticas se obtuvieron graficando la capacidad de adsorción a tiempo t (q<sub>t</sub>) versus tiempo.

La determinación de las isotermas de adsorción de las muestras de carbón activado se llevó a cabo en un sistema batch a la temperatura de 18°C y pH =5, ambos parámetros constantes, estas condiciones fueron determinadas mediante ensayos previos. Luego, en frascos erlemeyer de 250mL, se colocaron 50 mL de soluciones estándar de Cr(VI) preparadas a partir

de la sal dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a distintas concentraciones iniciales (5, 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L de Cr(VI)) y se pusieron en contacto con 50 mg del carbón activado a evaluar, con agitación constante por un espacio de 3 horas (tiempo establecido previamente para lograr las condiciones de equilibrio). Al cabo de este tiempo, la solución fue filtrada y se analizó la concentración remanente del Cr(VI) en la solución en equilibrio. Para determinar la capacidad de adsorción en el equilibrio ( $q_e$ ) de los carbones activados se utilizó la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{(C_o - C_e)V}{M} \quad (3)$$

Donde:

$q_e$  es la capacidad de adsorción en el equilibrio ( $mg_{Cr(VI)}/g_{CA}$ ).  $C_o$  es la concentración inicial (mg/L).  $V$  es el volumen de la solución de Cr(VI).  $C_e$  es la concentración en el equilibrio (mg/L) luego de la adsorción y  $M$  es la masa del adsorbente (g).

Para el estudio de la influencia del pH se varió este parámetro desde 1 hasta 7 (utilizando soluciones de  $HNO_3$  y  $NaOH$  según sea el caso), manteniendo constantes la temperatura y concentración inicial de la solución de Cr(VI).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la materia prima:

Para esta caracterización se utilizó el análisis próximo, el cual es una técnica que sirve para determinar el contenido porcentual de material volátil, carbono fijo y cenizas. En la tabla 1, se muestran los resultados obtenidos del análisis próximo de las astillas de eucalipto.

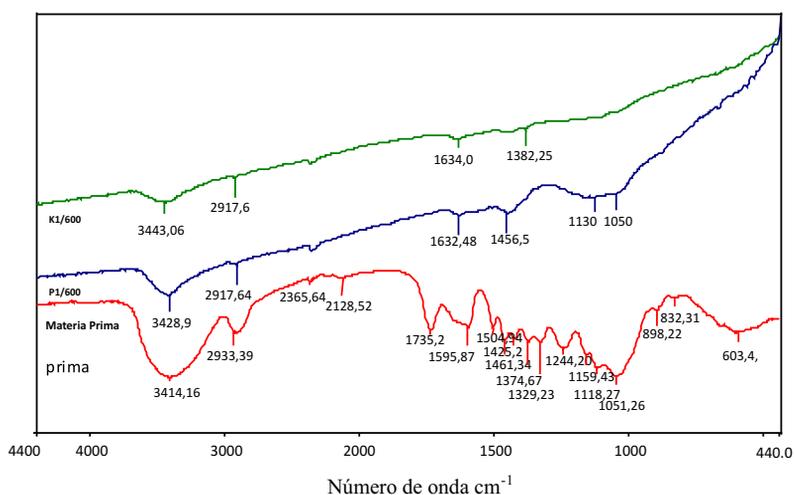
La determinación de cenizas es importante, debido a que la cantidad y naturaleza de estas afectan el desempeño del material como adsorbente. El resultado del análisis próximo muestra que la materia prima elegida es rica en carbón fijo, y tiene un bajo contenido de cenizas lo que la hace adecuada como material precursor para la preparación de carbones activados.

**Tabla 1.** Caracterización de las astillas de eucalipto.

|             | % peso |
|-------------|--------|
| Humedad     | 9,11   |
| Volátiles   | 9,56   |
| Cenizas     | 16,55  |
| Carbón fijo | 64,78  |

**Caracterización de los carbones activados: Espectroscopía Infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR):** Los grupos funcionales ácidos y básicos presentes en la superficie de los carbones activados desempeñan un rol importante en la adsorción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Ellos le confieren al carbón propiedades hidrofílicas porque incrementan la interacción específica ion - dipolo y dipolo - dipolo<sup>12</sup>. En la figura 1 se muestra los espectros FTIR del precursor (astillas de eucalipto) y de los carbones activados preparados P1/600 y K1/600. El espectro del precursor presenta una banda ancha a  $3414,16\text{ cm}^{-1}$  que es atribuida a grupos hidroxílicos (O-H), así como dos picos intensos en  $2933,39$  y  $1244,20\text{ cm}^{-1}$  debido a la

vibración de tensión y flexión en el plano, respectivamente, atribuidos a la presencia de  $-\text{CH}_2-$  y C-O en ésteres ( $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ), estos grupos son característicos en la celulosa<sup>13</sup>. Además, las bandas, debido a la flexión en el plano en 1461,34 y flexión simétrica en 1374  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de C-H y  $\text{CH}_3$ , respectivamente. También se localizaron las siguientes bandas atribuidas a las vibraciones de tensión: 1595,87; 1504,94 y 1425,21  $\text{cm}^{-1}$  propias de C=C; se observa que la banda a 1504,94 es más fuerte que a 1595,87  $\text{cm}^{-1}$ ; esto es característico en anillos aromáticos<sup>15</sup>.



**Figura 1.** Espectros infrarrojos con transformadas de Fourier de la materia prima y de los carbones activados: P1/600 y K1/600.

Otras señales presentes son: 1735,28  $\text{cm}^{-1}$  en C=O atribuido a la presencia de aldehídos y lactonas; 1051,26  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo C-O en fenoles (C-OH, primarios), 1118,27  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a C-O en fenoles (C-OH secundarios), 1159,43  $\text{cm}^{-1}$  en C-O-C. Por último, tres bandas debido a la vibración de flexión fuera del plano en 898,22 y 832,31  $\text{cm}^{-1}$  debido al enlace C-H en los derivados del benceno y en 603  $\text{cm}^{-1}$  debido al O-H; esta banda normalmente se encuentra a 605  $\text{cm}^{-1}$  pero está desplazada por los enlaces de hidrógeno que están rodeando al grupo O-H. Todas las bandas mencionadas son características en materiales lignocelulósicos<sup>12</sup>.

Comparando los espectros FTIR de los carbones K1/600 y P1/600 con el de la materia prima, se puede apreciar la desaparición de las bandas de absorción pertenecientes a los grupos carboxílicos, carbonilos, éteres y cetónicos, lo que hace claro el efecto de la temperatura en la estructura química del precursor. En el FTIR de los carbones, estos espectros se puede observar las bandas de absorción atribuidas a la presencia de grupos O-H, 3443,06; 3428,97  $\text{cm}^{-1}$  en las muestras de K1/600 y P1/600, respectivamente, las cuales son más intensas en P1/600. Estos grupos funcionales OH serían los responsables de la carga superficial de los carbones activados en estudio y en donde posiblemente se produce la adsorción de las especies de cromo.

Adicionalmente, el carbón activado P1/600 presenta las bandas características de los compuestos fosforados (fosfatos y polifosfatos) a 1030 y 1050  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente; estos compuestos fosforados provendrían del agente activante, lo que le conferiría un carácter más ácido al carbón P1/600 en comparación al K1/600. Estos resultados están en concordancia con la mayor capacidad de adsorción que presenta la muestra P1/600. De acuerdo a los resultados del estudio de FTIR se puede establecer que el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y el KOH inducen a cambios químicos importantes en la estructura del precursor (astillas de eucalipto) durante la descomposición pirolítica. Los estudios realizados por Molina Sabio *et al.*<sup>14</sup> relacionados con la activación química de material lignocelulósico para obtener los carbones activados, mostraron que la descomposición pirolítica a alta temperatura promueve la deshidratación y favorece la conversión de los compuestos alifáticos a aromáticos, obteniéndose carbones activados de carácter principalmente poliaromático donde el grupo funcional principal es el OH, lo que está en concordancia con los resultados aquí mostrados.<sup>1, 3</sup>

#### **Caracterización textural y determinación de grupos ácidos:**

El análisis de las propiedades texturales de los carbones activados se realizó a través de la determinación y análisis de las isotermas de adsorción de  $\text{N}_2$  en el sistema sólido-gas y utilizando las ecuaciones BET y DR indicadas anteriormente. A la temperatura de 77K se midió la cantidad de  $\text{N}_2$  gaseoso (adsorbato) retenido por las muestras sólidas de carbón (adsorbentes), desde 0,02 hasta presiones relativas cercanas a 1. Para la determinación de los grupos ácidos se empleó el método Boehm siguiendo el procedimiento explicado anteriormente. En la tabla 2 se encuentra los resultados obtenidos de las muestras P1/600 y K1/600.

El análisis de la tabla indica que la activación química con ácido fosfórico forma un carbón activado con mayor área superficial, con una mayor formación de microporos ( $V_g$ ), a la misma temperatura de activación y razón de impregnación.

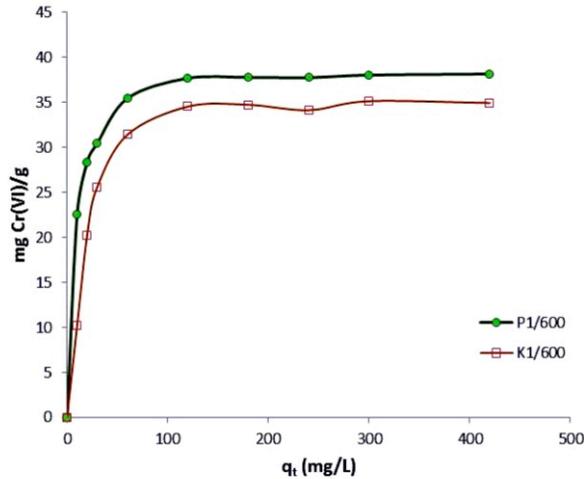
**Tabla 2.** Caracterización textural y contenido de grupos ácidos de los carbones activados K1/600 y P1/600

| Carbón activado | Estructura del poro                                  |                                     |                                     | $V_T$<br>( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) | Grupos ácidos<br>(Boehm)<br>mmol $\text{H}^+/\text{g}$<br>carbón<br>activado |
|-----------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
|                 | Área<br>superficial<br>BET ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) | $V_g$<br>( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) | $V_m$<br>( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) |                                     |  |
| K1/600          | 519,2  | 0,20                                | 0,01                                | 0,22                                | 0,87   |
| P1/600          | 761,1  | 0,37                                | 0,063                               | 0,41                                | 1,87   |

Asimismo, se puede observar que el carbón activado P1/600 presenta mayor cantidad de grupos ácidos expresados en  $\text{mmolH}^+/\text{g}$  en comparación con el carbón K1/600. Esta mayor cantidad de centros ácidos puede deberse a la protonación de la superficie del carbón en contacto con el  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , que puede ceder hasta  $3\text{H}^+$  por cada molécula de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  formando sitios Bronsted (ácidez protónica), donde los  $\text{H}^+$  se unen a un oxígeno de la red formando el OH. Al realizarse la calcinación, por encima de los  $400^\circ\text{C}$ , se produce la deshidroxilación de los sitios Bronsted formando agua y generando centros ácidos Lewis (aceptor de electrones), los cuales tienen una mayor fortaleza ácida. Este resultado concuerda con los espectros infrarrojos mostrados en la figura 1, donde se establece que el P1/600 presenta una superficie más ácida que el carbón activado K1/600. La mayor cantidad de grupos ácidos favorecería la adsorción del Cr(VI)

### Proceso de adsorción de cromo:

**Cinéticas de adsorción:** En la figura 2 se muestra el efecto del tiempo de contacto adsorbato-adsorbente sobre la adsorción de Cr(VI) sobre los carbones activados K1/600 y P1/600, respectivamente.



**Figura 2.** Efecto del tiempo sobre la capacidad de adsorción de Cr(VI) en los carbones activados K1/600 y P1/600

Se observa que el valor de la capacidad de adsorción ( $q_e$ ) aumenta con el incremento del tiempo de contacto; se alcanzó el equilibrio aproximadamente en 120 minutos.

Una vez alcanzado el equilibrio las curvas de ambas figuras se hacen constantes. Un similar comportamiento fue reportado por Karthikeyan *et al.*<sup>11</sup> quienes trabajaron con carbones activados a partir de aserrín de madera para la remoción de Cr(VI) y obtuvieron un tiempo de contacto óptimo de 300 minutos. De acuerdo a los resultados mostrados, se estableció un tiempo de contacto de 3 horas para todos los ensayos de adsorción posteriores.

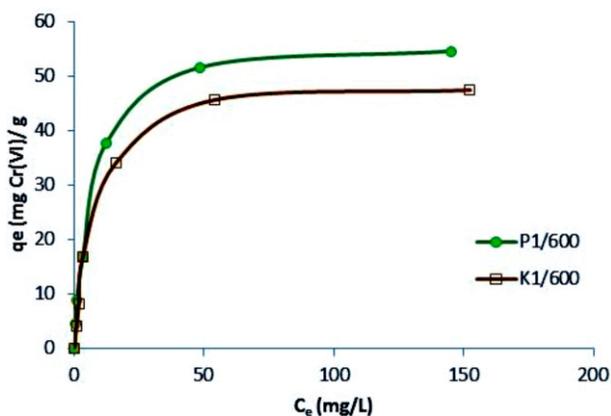
**Influencia de la concentración inicial sobre la capacidad de adsorción de Cr(VI):** La tabla 3 ilustra la dependencia del proceso de remoción de Cr(VI) a diferentes concentraciones iniciales ( $C_0$ ) de Cr(VI) y pH inicial de 5.

**Tabla 3.** Efecto de la concentración inicial sobre la adsorción de Cr(VI)

| $C_0$ (mg/L) | $q_e$ (mg Cr(VI)/g c.a) |        |
|--------------|-------------------------|--------|
|              | K1/600                  | P1/600 |
| 5            | 4,17                    | 4,62   |
| 10           | 8,24                    | 9,02   |
| 20           | 16,79                   | 16,78  |
| 50           | 34,08                   | 34,28  |
| 100          | 45,73                   | 51,66  |
| 200          | 47,51                   | 54,65  |

Se observa que la capacidad de remoción ( $q_e$ ) del metal es altamente dependiente de la concentración, conforme la concentración inicial se incrementa  $q_e$  hace lo mismo hasta mantenerse casi constante luego de una concentración inicial de 100 mg/L, lo cual se explicaría por la saturación de los centros de adsorción.

**Isotermas de adsorción (sólido-líquido):** Las isotermas de adsorción describen la manera como interactúa el adsorbato con la superficie del material adsorbente, en este caso el carbón activado; las isotermas fueron obtenidas graficando la capacidad de adsorción ( $q_e$ ) expresado en mg de Cr(VI)/g, versus la concentración del Cr(VI) en equilibrio ( $C_e$ ) (figura 3).



**Figura 3.** Isoterma de adsorción de Cr(VI) sobre el carbón activado (a)P1/600 y (b) K1/600, pH=5, relación masa de carbón/volumen = 50 mg/50mL.

En la figura 3 se aprecia que ambas isotermas tienen un comportamiento similar del tipo L de acuerdo con la clasificación de Giles<sup>15</sup>, dado que la curvatura inicial de la isoterma se va separando a medida que se incrementa el valor de  $C_e$ , lo que estaría indicando que las moléculas de adsorbato (Cr(VI)) tienen más dificultad para encontrar un sitio activo de adsorción. La capacidad de adsorción se incrementa hasta casi alcanzar una condición estable de 47,5 y 54,55 mg Cr(VI)/g en los carbones activados K1/600 y P1/600, respectivamente.

**Correlación de los valores experimentales con los modelos de isotermas:** Los modelos de Langmuir y Freundlich son los más frecuentemente empleados para describir la relación entre la cantidad de adsorbato retenido y su concentración en el equilibrio en los sistemas de adsorción sólido - líquido.

El modelo de Langmuir asume que la adsorción ocurre uniformemente en los sitios activados de la superficie del adsorbente, con la formación de una monocapa donde el calor de adsorción es constante para todos los sitios y que no existe interacción entre las moléculas adsorbidas. La ecuación lineal del modelo de Langmuir es expresada del siguiente modo:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_0 b} + \frac{C_e}{Q_0} \quad (4)$$

Donde:

$C_e$  es la concentración en el equilibrio (mg/L);  $q_e$  representa la capacidad de adsorción en el equilibrio (mg Cr(VI)/g);  $Q_0$  es la máxima cantidad de metal que puede ser adsorbido en la monocapa;  $b$  es la constante relacionada a la energía de adsorción (L/mg).

Los valores de  $Q_0$  y  $b$  se hallaron luego de graficar  $C_e/q_e$  versus  $C_e$  (figura 4). En el modelo de la isoterma de Freundlich se hace uso de una ecuación empírica, considerando que las energías de adsorción son heterogéneas y varían de acuerdo a la superficie cubierta. La forma lineal del modelo de Freundlich es la siguiente

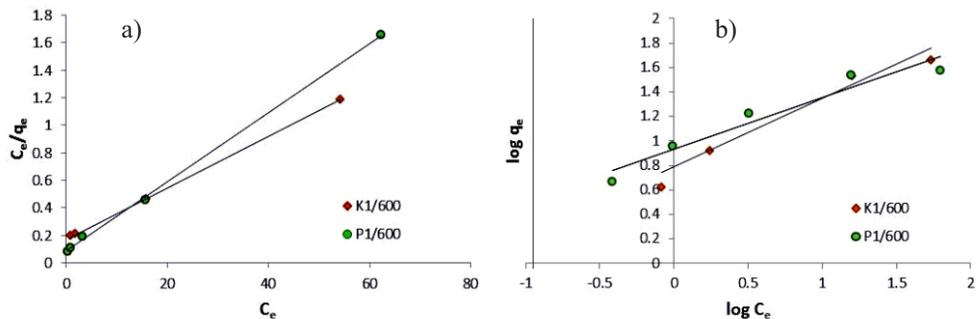
$$\log q_e = \log K_F + (1/n)\log C_e \quad (5)$$

Donde, las constantes  $K_F$  y  $n$  representan los factores que afectan la capacidad e intensidad de la adsorción, respectivamente, y son indicativos de la retención favorable del metal sobre la superficie del adsorbente. Estos valores se hallaron luego de graficar  $\log q_e$  versus  $\log C_e$  (figura 4).

En la tabla 4 se puede observar las constantes de ambos modelos hallados a partir de las ecuaciones linealizadas de las isotermas de la figura 4. Donde el carbón P1/600 presenta el más alto valor de  $Q_0$  en la monocapa (56,82 mg/L) en comparación con su homólogo K1/600

**Tabla 4.** Constantes de los modelos de Langmuir y Freundlich

| Carbón activado | Constantes de Langmuir |            |        | Constantes de Freundlich |      |        |
|-----------------|------------------------|------------|--------|--------------------------|------|--------|
|                 | $Q_0$ (mg/L)           | $b$ (L/mg) | $R^2$  | $K_F$                    | $n$  | $R^2$  |
| K1/600          | 50,25                  | 0,13       | 0,9993 | 8,99                     | 2,18 | 0,888  |
| P1/600          | 56,82                  | 0,17       | 0,9994 | 6,75                     | 2,33 | 0,9362 |



**Figura 4.** Correlación de los datos experimentales empleando (a) el modelo de Langmuir, (b) el modelo de Freundlich para los carbones activados K1/600 y P1/600.

Examinando las correlaciones se observa que los valores experimentales se ajustan mucho mejor al modelo de Langmuir, lo que se ve reflejado en los coeficientes de correlación cuyos valores fluctúan entre 0,9976 y 0,9993, lo cual permite establecer que el proceso de adsorción se realiza en centros activos energéticamente homogéneos.

**Correlación de los datos cinéticos:** En el proceso de adsorción los parámetros cinéticos proporcionan importante información para el diseño y modelamiento del proceso, así como predicen el grado de adsorción.

Los datos experimentales obtenidos de  $q_t$  y el tiempo de contacto fueron correlacionados en base a dos modelos diferentes: el modelo de Lagergren, o modelo de seudo primer orden y el modelo de seudo segundo orden, detallados a continuación:

- Ecuación de Lagergren o modelo de seudo primer orden:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (6)$$

- Ecuación de seudo segundo orden:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (7)$$

Donde:

$k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $k_2$  ( $\text{g/mg min}$ ) son las constantes de velocidad de seudo primer y segundo orden, respectivamente,  $q_e$  y  $q_t$  son las capacidades de adsorción ( $\text{mg/g}$ ) en el equilibrio y a un tiempo  $t$ , respectivamente.

Las constantes  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) fueron halladas de la pendiente y del intercepto de las respectivas ecuaciones linealizadas, como se aprecia en la tabla 5. Los valores de  $k_2$  se utilizaron para calcular la velocidad inicial ( $h$ ) determinada por:

$$h = k_2 q_e^2 \quad (8)$$

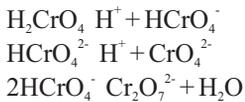
Luego de aplicar los modelos sobre los resultados experimentales de ambos carbones activados se observa que, de acuerdo al factor de correlación  $R^2$ , el modelo de seudo segundo orden es el que mejor predice el comportamiento de estos datos, por lo que éste podría ser aplicable para todo el proceso de adsorción. Esto también permite establecer que el Cr(VI) se quimisorbe sobre la superficie de los carbones activados K1/600 y P1/600. Similar comportamiento fue reportado en los trabajos realizados por Karthikeyan *et al.*<sup>11</sup> y Kobyá<sup>16</sup>.

**Tabla 5.** Constantes de los modelos de pseudo primer y segundo orden

| Carbón activado | Seudo primer orden             |        | Seudo segundo orden |                 |        |
|-----------------|--------------------------------|--------|---------------------|-----------------|--------|
|                 | $k_1$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $R^2$  | $k_2$<br>g/mg min   | $h$<br>mg/g min | $R^2$  |
| P1/600          | 0,0156                         | 0,8894 | 0,0039              | 5,97            | 0,9999 |
| K1/600          | 0,005                          | 0,6915 | 0,0019              | 2,53            | 0,9983 |

Si se compara la velocidad inicial de adsorción (h) de ambos carbones se aprecia que la muestra P1/600 presenta una mayor velocidad de adsorción de Cr(VI) en comparación con K1/600; esto estaría asociado a la mayor difusión interna del adsorbato que presenta este carbón, lo cual está asociado a la mayor área superficial, volumen de microporos y a la mayor cantidad de grupos ácidos que presenta el carbón activado P1/600 en comparación con K1/600.

**Influencia del pH de la solución sobre la adsorción de Cr(VI):** El pH se puede considerar el parámetro más importante que influye en la capacidad de adsorción de un adsorbato sobre la superficie del carbón activado<sup>5</sup>, ya que influye grandemente en las interacciones electrostáticas superficiales entre el carbón activado y las diferentes especies químicas puestas en contacto<sup>(17,18)</sup>. En este estudio el adsorbato fue el cromo, el cual existe en diferentes estados de oxidación y su estabilidad depende del pH del sistema<sup>(16,18)</sup>. El equilibrio que existe entre las diferentes especies iónicas de cromo es como sigue:



De acuerdo a Karthikeyan *et al.*<sup>11</sup> la especie dominante del Cr(VI) a pH 2,0 es el  $\text{HCrO}_4^-$ ; a medida que el pH se incrementa la concentración de  $\text{HCrO}_4^-$  disminuye y empiezan a aparecer otras especies como  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ . La figura 5 muestra la influencia del pH sobre la capacidad de remoción de Cr(VI) a diferentes concentraciones iniciales.

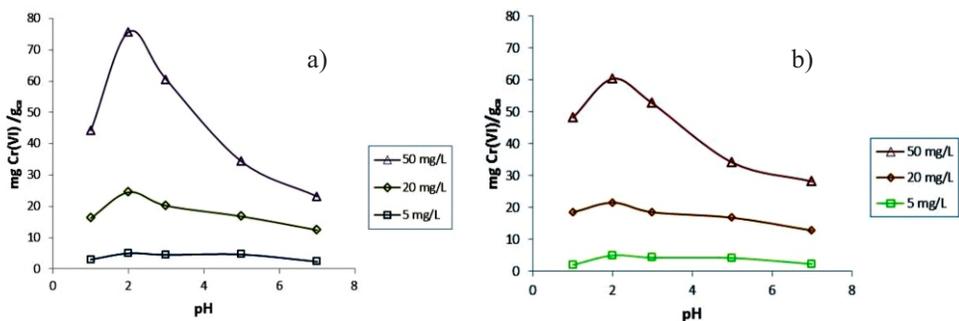


Figura 5. Influencia del pH en la remoción de Cr(VI) sobre los carbones activados (a) P1/600, (b) K1/600

En ambas figuras se puede observar que para una concentración inicial de 50 mg/L, la máxima remoción se alcanza a pH = 2, disminuyendo su valor en forma gradual conforme el pH se incrementa; las otras curvas obtenidas a menores concentraciones iniciales tienen la misma tendencia. La máxima adsorción se alcanza a pH ácido; este comportamiento se debería al incremento de los iones  $\text{H}^+$  superficiales en el carbón, lo que significaría que la superficie de los carbones queden cargados positivamente conllevando a una fuerte atracción electrostática entre las especies de cromo cargadas negativamente y las cargas superficiales positivas del carbón activado. A medida que el pH se incrementa de 5 a 7 el grado de protonación de la

superficie del carbón se reduce gradualmente; además, existiría una competencia por los sitios de adsorción entre los iones OH y las especies de Cr(VI) presentes lo que se ve reflejado en la disminución de la capacidad de adsorción. A pH menores a 2 se observa que la capacidad de adsorción disminuye; esto se debería a que, a este pH, la especie predominante es el  $H_2CrO_4$ <sup>(16,18)</sup>.

El carbón activado P1/600 presentó la mayor capacidad de adsorción con un valor de 75,2 mg/g a pH=2 en comparación con su homóloga K1/600 que alcanzó una capacidad de adsorción de 60,68 mg/g al mismo pH. Un comportamiento similar se observó en el trabajo reportado por Kharthikeyan *et al.*<sup>11</sup> quienes usaron carbones activados con  $H_3PO_4$  preparados a partir de aserrín de madera (*Hevea brasiliensis*), estos investigadores reportaron para sus carbones una capacidad de remoción de 42 mg Cr(VI)/g<sub>ca</sub> a un pH=2.

### CONCLUSIONES

- Se logró obtener carbones activados con buenas capacidades adsorbentes de Cr(VI) a partir de astillas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), mediante activación química con  $H_3PO_4$  y KOH.
- Los resultados de la caracterización indicaron que los carbones activados presentaron micro y mesoporosidad y altas áreas superficiales: 761 m<sup>2</sup>/g para la muestra P1/600 y 519 m<sup>2</sup>/g para la muestra K1/600. Se identificó la presencia de los grupos funcionales hidroxilos y se determinó una mayor cantidad de grupos ácidos superficiales en el carbón activado P1,0/600.
- La variable de mayor influencia sobre la capacidad de adsorción de Cr(VI) fue el pH. Se obtuvo la máxima remoción a un pH=2. Se estableció que el proceso de adsorción se dio por interacción electrostática entre el adsorbato y superficie del carbón activado.
- Los resultados experimentales de las isotermas se correlacionaron mejor con el modelo de Langmuir, el cual representa una adsorción en monocapa, y permite establecer que el proceso de adsorción del Cr(VI) se realiza en centros activos, energéticamente homogéneos.
- El modelo cinético que describió mejor el proceso de adsorción fue el de pseudo segundo orden, lo que indica que se produce una quimisorción del Cr(VI) sobre el carbón activado. El carbón activado que presentó una mayor velocidad de adsorción fue el P1/600.
- Con los carbones preparados se lograron capacidades de adsorción de Cr(VI) bastante altas [75,2 mg/g y 60,68 mg/g para las muestras P1/600 y K1/600, respectivamente]. La mayor capacidad de remoción de Cr(VI) del carbón activado P1/600 estaría asociada a la mayor área superficial y a la presencia de mayores grupos ácidos en su superficie en comparación con la muestra K1/600.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ing. Nicolás Román Cabello del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional del Centro del Perú y a la Sección Química, Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de investigación. Asimismo, se hace extensivo el agradecimiento a los doctores Javier Herguido, Pilar Pina y Gemma Gómez de la Universidad de Zaragoza-España, por los análisis de área superficial y distribución de poros realizados a las muestras de carbón activado.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Leyva, R.; Flores, J.; Díaz, P. y Berber, M. Adsorción de cromo (VI) en solución acuosa sobre fibra de carbón activado. *Información Tecnológica*. 2008, 19, 27-33.
2. Selvi, K.; Pattabhi, S. y Kadirvelu, K. Removal of Cr(VI) from aqueous solution by adsorption onto activated carbon. *Biores. Technol.* 2001, 80, 87-89.
3. Grau, M. "Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana". Mexico: McGraw Hill Interamericana; 2003.
4. Mohanthy, K.; Jha, M.; Meikap, B.C.; Biswas, M.N. Preparation and Characterization of Activated Carbons from Terminalia Arjuna Nut with Zinc Chloride Activation for the Removal of Phenol from Wastewater. *Ind. Eng. Chem.* 2005, 44, 4128-4138.
5. Lavado, C., Sun Kou, M.R.; Bendezú, S. Adsorción de plomo de efluentes industriales usando carbones activados con  $H_3PO_4$ . *Rev Soc Quím Perú*. 2010, 76 (2), 165-178.
6. Selomuya C.; Meeyoo, V.; Amal, R. Mechanismes of Cr(VI) removal from water by various types of activated carbons. *Journal Chem Techn & Biotechn.* 1999, 74, 904-910.
7. Bendezú, S.; Oyague, J.; Romero, A.; García, R.; Muñoz, Y.; Escalona, N. Chromium adsorption from tannery effluents by activated carbons prepared from coconut shells by chemical activation with KOH and  $ZnCl_2$ . *J. Chil. Chem. Soc.* 2005, 50 (4), 677-684.
8. Khezami, L.; Chetouani, B.; Taouk, B.; Capart, R. Production and characterization of activated carbon from wood components in power: cellulose, lignin, xylan. *Powder Technology*. 2005, 157, 48-56.
9. Brunauer, S. P.; Emmett, H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* 1939, 61(2), 309-319
10. Aygün, A.; Yenisoy-Karakas, B.; Duman, I. Production of granular activated carbon from fruit stones and nutshells and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2003, 66, 189-195.
11. Kharthikeyan, T.; Rajgopal, S.; Rose M. Chromium(VI) adsorption from aqueous solution by Hevea Brasiliensis sawdust activated carbon. *Journal of Hazardous B.* 2005, 124, 192-199.
12. Puziy, A.M.; Poddubnaya, O.I.; Martinez Alonzo, A.; Suarez García, F.; Tascón, J. Surface chemistry of phosphorus-containing carbons of lignocellulosic origin. *Carbon* 2005, 43, 2857-2868.
13. Guo, Y.; Rockstraw, D. Physical and chemical properties of carbon synthesized from xylan, cellulose, and Kraft lignin by  $H_3PO_4$  activation, *Carbon* 2006, 44, 1464-1475.
14. Molina Sabio, M.; Rodríguez Reinoso, F. Role of chemical activation in the development of porosity, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eg. Aspects*. 2004, 241, 15-25.
15. Giles, H.; D' Silva, A.; Easton I. A general Treatment Classification of Solute Adsorption Isotherm, Part II. Experimental Interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1974, 47, 776-768.
16. Kobya, M. Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by adsorption onto hazelnut shell activated carbon: kinetic and equilibrium studies. *Bioresource Technology* 2004, 91, 317-321.
17. Kaustubha, M.; Mousam J.; Meikap, B.; Biswas, M. Removal of chromium(VI) from dilute aqueous solutions by activated carbon developed from Terminalia arjuna nuts activated with zinc chloride. *Chemical Engineering Science*. 2005, 60, 3049-3059
18. Selomuya, C.; Meeyoo, V.; Amal, R. Mechanismes of Cr(VI) removal from water by various types of activated carbons various. *J Chem Techn & Biotechn.* 1999, 74, 904-910.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE VENENOS DE SERPIENTES DE DIFERENTES REGIONES DEL MUNDO

Yarlequé Mirtha<sup>1\*</sup>, Ortiz César<sup>1</sup>, Morante Yolanda<sup>1</sup> y Yarlequé Armando<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se ha investigado el contenido proteico y algunas actividades enzimáticas de 15 muestras de veneno de serpientes de la familia Viperidae y 4 de la familia Elapidae. El análisis proteico se realizó con los métodos colorimétricos de Lowry y Bradford y además se evaluaron las actividades de 5'nucleotidasa, proteasa, coagulante y amidolítica, así como la acción procoagulante. De la evaluación de estos parámetros se obtuvo valores elevados de proteínas cercanos o iguales al 100 % en los venenos de elápidos tales como en *Naja nigricollis* y *Naja mossambica*, así como *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox* y *Hemachatus haemachatus* (Fam. Viperidae). La actividad 5'nucleotidasa estuvo presente en la mayoría de las muestras analizadas, mientras que, se detectó una elevada actividad procoagulante en el veneno de *Dendroaspis angusticeps*. La actividad proteolítica fue más elevada en los venenos de la familia Viperidae correspondiendo los de mayor actividad a *Crotalus atrox* y *Calloselasma rhodostoma*. En el caso de la actividad amidolítica y de la actividad coagulante los venenos que mostraron una mayor actividad fueron los de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*, en tanto que ninguno de los venenos elapídicos mostraron dichas actividad. Esta investigación ha permitido establecer claras diferencias bioquímicas entre todos los venenos estudiados.

**Palabras clave:** Veneno, serpiente, enzimas, proteínas, regiones.

## COMPARATIVE ESTUDY OF SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE VENOMS SNAKE FROM DIFERENTS WORLD REGIONS

### ABSTRACT

The protein content and some enzymatic activities were investigated in 15 samples of venom snake belong to the Viperidae family and 4 to Elapid family. The protein analysis was performed by Lowry and Bradford colorimetric methods and 5'nucleotidase, protease, amidolytic coagulant and procoagulant activities were evaluated. As results, high protein content close to 100% were registered in venom of *Naja nigricollis* and *Naja mossambica* (Fam. Elapidae), as well as *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox* and *Hemachatus haemachatus* (Fam. Viperidae). 5' nucleotidase activity was detected in the majority of venoms, whilest a high procoagulante activity was observed in the venom of *Dendroaspis angusticeps*. In regards to, proteolytic activity was the most higher in the venoms of *Crotalus atrox* and *Calloselasma rhodostoma*. In the case of amidolytic and coagulant activities, the venoms from *Lachesis muta* and *Bothrops atrox* registered the high activities, however, any elapids venoms showed these activities. According to this research, some biochemical characteristics in each samples was determinated.

**Key words:** Venom, snake, enzymes, proteins, regions.

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular. ICBAR. Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

\* E-mail: ayarleque38@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

Las serpientes venenosas abarcan aproximadamente unas 300 especies en todo el mundo, estando distribuidas en 4 familias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae y Colubridae, teniendo esta última solo unas pocas especies venenosas<sup>1, 2</sup>. Las serpientes que ocasionan mayor incidencia de envenenamientos pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae, donde las primeras contienen una ponzoña elevadamente neurotóxica, mientras que las serpientes de la familia Viperidae generan severos daños locales y sistémicos que incluyen edema, hemorragia, hipotensión, trastornos en la coagulación sanguínea y necrosis<sup>2</sup>.

Los efectos biológicos generados en un envenenamiento son consecuencia del tipo de toxinas que contiene la ponzoña del animal. Así tenemos a las enzimas, componentes del veneno cuya acción está estrechamente asociada a la toxicidad. Por ejemplo, se ha detectado en varios venenos actividad 5' nucleotidasa, la cual estaría implicada en procesos como el bloqueo de la síntesis de ATP por degradación selectiva del AMP, hipotensión y lesiones en el músculo cardíaco por acción de la liberación de derivados adenílicos<sup>3</sup>. Por su parte, las metaloproteasas están ampliamente asociadas a los procesos de hemorragia, degradando a los componentes de la matriz extracelular y favoreciendo la extravasación de fluidos, lo que a su vez genera hipotensión en los vasos sanguíneos<sup>4</sup>. En cuanto a la acción coagulante, los venenos de vipéridos han mostrado contener enzimas similares a trombina, las cuales coagulan el fibrinógeno plasmático, produciendo microcoágulos que, a su vez, son digeridos por el sistema fibrinolítico del animal o del paciente, dando lugar a una coagulación intravascular diseminada inicial seguida de una desfibrinación y la consecuente incapacidad de la sangre para coagularse<sup>5</sup>.

Si bien los efectos producidos por los venenos de serpientes indican que en las ponzoñas de las especies de la familia Viperidae existe un elevado contenido enzimático, mientras que en los de la familia Elapidae predominan principalmente polipéptidos no enzimáticos con acción neurotóxica<sup>2</sup>, muchas especies pueden presentar peculiaridades, por lo que requieren ser analizadas cuidadosamente. Es así que nosotros decidimos realizar un estudio comparativo del contenido proteico y de algunas actividades enzimáticas, en muestras de venenos de serpientes procedentes de América, Asia, Europa y África.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico

Se emplearon venenos liofilizados de serpientes de las familias Viperidae y Elapidae de diferentes zonas de África, América, Europa y Asia (tabla 1). Los venenos de las serpientes *Lachesis muta*, *Bothrops atrox* y *Bothrops pictus* corresponden a ejemplares peruanos y fueron donados por el Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú. Por otro lado, los venenos de *Agkistrodon piscivorus*, *Calloselasma rodhostoma*, *Crotalus adamanteus*, *C. atrox*, *Bitis arietans*, *Cerastes cerastes*, *Vipera aspis aspis*, *Macrovipera deserti* (antes *Vipera lebetina deserti*), *Daboia russelli* (antes *Vipera russelli russelli*), *Hemachatus haemachatus*, *Naja mossambica* y *N. nigricollis* fueron donados por los Laboratorios de Toxinas y Animales Venenosos (LATOXAN) de Francia. Con respecto al veneno de *Dendroaspis angusticeps* fue donado por el Dr. Ever Karlsson del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Uppsala-Suecia. Asimismo, los venenos de *Bitis gabonica* y *B. nasicornis* fueron donados por el Dr. Neville Marsh, del Departamento de Fisiología del Queen Elizabeth College, de la Universidad de Londres-Inglaterra. Finalmente, el veneno de *Crotalus durissus terrificus* fue donado por el Dr. JC Vidal, del Instituto de Neurobiología de Buenos Aires, Argentina.

**Tabla 1.** Serpientes empleadas en este estudio

| <b>Nombre científico</b>  | <b>Nombre común</b>   | <b>Procedencia</b>     |
|---|---|------------------------|
| <i>Lachesis muta</i>  | Bushmaster, shushupe  | Perú - Sudamérica      |
| <i>Bothrops atrox</i>   | Fer-de-Lance, jergón  | Perú - Sudamérica      |
| <i>Bothrops pictus</i>  | Jergón de la costa  | Perú - Sudamérica      |
| <i>Agkistrodon piscivorus</i>   | Water moccasin, moccasin de agua  | USA - Norteamérica     |
| <i>Crotalus adamanteus</i>  | Eastern diamondback rattlesnake, cascabel de espalda diamantada deleste   | USA - Norteamérica     |
| <i>Crotalus atrox</i>   | Western diamondback rattlesnake, Cascabel de espalda diamantada de loeste | USA - Norteamérica     |
| <i>Calloselasma rhodostoma</i>  | Malayan pit viper, víbora de Malasia                                      | Tailandia - Asia       |
| <i>Crotalus durissus terrificus</i>                                   | South American rattlesnake, Cascabel sudamericana                         | Argentina - Sudamérica |
| <i>Bitis arietans</i>   | Puff ader, serpiente escaladora   | Mali - África          |
| <i>Bitis gabonica</i>   | Gaboon viper, víbora de galón   | Gabón - África         |
| <i>Bitis nasicornis</i>   | Rhinoceros viper, víbora rinoceronte                                      | Uganda - África        |
| <i>Cerastes cerastes</i>  | Horned viper, víbora cornuda  | Túnez - África         |
| <i>Vipera aspis aspis</i>   | European asp, víbora europea  | Francia - Europa       |
| <i>Macrovipera deserti</i><br>(antes <i>Vipera lebetina deserti</i> ) | Levantine viper, víbora del medio oriente                                 | Argelia - África       |
| <i>Daboia russelli</i> (antes <i>Vipera russelli russelli</i> )       | Russell's viper, víbora de Russell  | Pakistán - Asia        |
| <i>Dendroaspis angusticeps</i>  | Green mamba, mamba verde  | Kenya - África         |
| <i>Hemachatus haemachatus</i>   | African Ringlairs cobra, cobra anillada de África                         | África                 |
| <i>Naja nigricollis</i>   | Black-necked cobra, cobra   | Benín - África         |
| <i>Naja mossambica</i>  | Cobra de mossambica   | Tanzania - África      |

### Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02<sup>6</sup>. Además, se empleó el método de Lowry<sup>7</sup> y el método de Bradford<sup>8</sup> modificados en nuestro laboratorio, utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb y un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02, respectivamente; empleando, en ambos casos, albumina sérica bovina como proteína estándar.

### Actividades enzimáticas

#### Actividad 5' Nucleotidasa

Para esta enzima se empleó el método de determinación de fosfatos modificado en este laboratorio<sup>9</sup> en el cual se emplearon: 0,5 ml del sustrato 5'-AMP, 0,5 ml de Buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y 0,1 ml de veneno (1mg/ml). Luego de correr la reacción por 10 minutos a 37°C se adicionó 0,5 ml de ácido perclórico 1 M y para luego agregar 1,5 ml del reactivo de fósforo. Después de 60 minutos de reposo a temperatura ambiente se midió la concentración

de fosfatos libres a 820 nm. La actividad específica fue calculada por los microgramos de fósforo liberado por minutos por miligramo de proteína (U/mg).

#### *Actividad proteolítica*

Se empleó el método de Takahashi y Osaka<sup>10</sup> modificado por Loayza *et al.*<sup>11</sup>, para lo cual se utilizó 1 ml de caseína al 2%, 0,5 ml de Buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,5 y 0,1 ml de veneno (1mg/ml), incubándose a 37°C por 15 minutos y deteniéndose la reacción con 1,5 ml de ácido tricloro acético 0,44 M. Luego, se procedió a determinar la presencia de productos ácido-solubles a 280 nm, calculándose la actividad específica midiendo los microgramos de L-tirosina liberados por minuto por miligramo de proteína (U/mg).

#### *Actividad amidolítica*

Se determinó por el método de Erlanger<sup>12</sup> midiendo la hidrólisis que producen las serinoproteasas, principalmente la enzima similar a trombina, sobre el sustrato cromogénico benzil-arginil-p-nitroanilida (BAPNA). La mezcla de reacción contenía 1 ml de BAPNA 0,9 mM, 0,9 ml de Buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,1 y 0,1 ml de veneno (1mg/ml). Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C se adicionó 1 ml de ácido acético al 60% y la liberación de p-nitroanilina fue medida a 405 nm. La actividad específica fue calculada por los micromoles de p-nitroanilina liberados por minuto por miligramo de proteína (U/mg).

#### *Actividad coagulante*

Se siguió el método descrito por Copley<sup>13</sup>, usando plasma humano citratado o fibrinógenos humano o bovino comerciales (5 mg/ml). 0,2 ml del plasma o fibrinógeno y 0,1 ml de solución salina 0,9 % fueron preincubados por 5 minutos a 37 °C para luego agregar 0,1 ml del veneno (1mg/ml) e inmediatamente registrar el tiempo que tarda el sustrato en coagularse. Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizados. Además, se calculó la potencia coagulante (NIH unidades/mg) sobre fibrinógeno humano para los venenos que fueron capaces de coagular el fibrinógeno en un tiempo no mayor a 100 segundos<sup>14</sup>.

#### *Actividad procoagulante*

Los venenos que no mostraron efecto coagulante sobre fibrinógeno y plasma humano citratado fueron sometidos al análisis de su acción procoagulante<sup>15</sup>. Para ello, se midió el tiempo de recalcificación del plasma citratado de los preincubados que contenían la mezcla de reacción para actividad coagulante, adicionándose 0,1 ml CaCl<sub>2</sub> 25 mM. Se utilizó una regla de tres simple inversa, considerando como 100% el tiempo normal de recalcificación.

## RESULTADOS

### **Cuantificación de proteínas**

Los resultados mostrados en la tabla 2 indican que los venenos de serpiente, tanto de la familia Viperidae como Elapidae, corresponden a soluciones de naturaleza proteica, conteniendo en la mayoría de casos un porcentaje de proteína mayor al 50%. El veneno del víperido con mayor contenido proteico, según los métodos colorimétricos, fue el de *C. adamanteus* con un 100 y 93% de proteínas según los métodos de Lowry y Bradford, respectivamente; mientras que los venenos de los elápidos con mayor contenido proteico fueron los de *N. nigricollis* y *N. mossambica* habiéndose registrado, según los dos métodos colorimétricos usados, valores mayores al 100%. Asimismo, entre todos los venenos analizados, el que registró el menor valor de proteínas fue el de *Dendroaspis angusticeps* cuyo porcentaje estuvo en el rango de 55-58%.

Tabla 2. Contenido proteico de los venenos estudiados

| Veneno                              | Contenido proteico (mg/ml) en una solución de veneno a 1 mg/ml |            |               |
|-------------------------------------|--|------------|---------------|
|                                     | Abs. 280 nm  | Met. Lowry | Met. Bradford |
| <b>Familia Viperidae</b>            |  |            |               |
| <i>Lachesis muta</i>                | 1,62   | 0,64       | 0,71          |
| <i>Bothrops atrox</i>               | 1,30   | 0,68       | 0,71          |
| <i>Bothrops pictus</i>              | 1,25   | 0,66       | 0,69          |
| <i>Agkistrodon piscivorus</i>       | 0,78   | 0,57       | 0,65          |
| <i>Crotalus adamanteus</i>          | 1,38   | 1,00       | 0,93          |
| <i>Crotalus atrox</i>               | 1,46   | 0,86       | 1,04          |
| <i>Calloselasma rhodostoma</i>      | 0,86   | 0,86       | 0,82          |
| <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 1,45   | 0,81       | 0,31          |
| <i>Bitis arietans</i>               | 1,82   | 0,86       | 0,86          |
| <i>Bitis gabonica</i>               | 1,69   | 0,46       | 0,57          |
| <i>Bitis nasicornis</i>             | 2,55   | 0,59       | 0,71          |
| <i>Cerastes cerastes</i>            | 1,35   | 0,79       | 0,61          |
| <i>Vipera aspis aspis</i>           | 1,44   | 0,96       | 0,88          |
| <i>Macrovipera deserti</i>          | 1,27   | 0,87       | 0,95          |
| <i>Daboia russelli</i>              | 1,24   | 0,97       | 0,68          |
| <b>Familia Elapidae</b>             |  |            |               |
| <i>Dendroaspis angusticeps</i>      | 0,41   | 0,55       | 0,58          |
| <i>Hemachatus haemachatus</i>       | 1,10   | 0,96       | 1,23          |
| <i>Naja nigricollis</i>             | 1,23   | 1,14       | 1,36          |
| <i>Naja mossambica</i>              | 1,73   | 1,11       | 1,22          |

### Actividades enzimáticas

#### Actividad 5'Nucleotidasa

Esta actividad mostró ser más elevada en los veneno de *Lachesis muta* (65,3 U/mg), *N. mossambica* (40,5 U/mg) y *H. haemachatus* (30,2 U/mg), mientras que los venenos de *A. piscivorus*, *C. adamanteus*, *B. gabonica*, *V. aspis aspis* y *D. angusticeps* no presentaron esta actividad. En el resto de venenos la actividad vario en el rango de 1,3-17,4 U/mg (tabla 3).

#### Actividad proteolítica

Como se observa en la tabla 3, la ponzoña de la mayoría de serpientes de la familia Viperidae contiene proteasas cuya actividad es mayor que en la familia Elapidae, los cuales presentan una actividad proteolítica muy limitada. Exceptuando a los venenos de *C. adamanteus*, *C. durissus terrificus*, *B. gabonica*, *V. aspis aspis* y *Daboia russelli* que mostraron valores bajos, semejantes a los venenos elápidos en estudio, la de actividad proteolítica de los demás vipéridos estuvo en el rango de 19,7 a 81,9 U/mg, correspondiendo los valores más elevados a *C. atrox* y *C. rhodostoma*, los cuales tuvieron una actividad de 81,9 y 69,9 U/mg, respectivamente.

#### Actividad amidolítica

Esta actividad sólo fue detectada en venenos de serpientes de la familia Viperidae y estuvo en un rango muy variable correspondiendo los valores más elevados a los de *L. muta* y *B. atrox*, que fueron de  $97,7 \times 10^{-3}$  y  $52,2 \times 10^{-3}$ , respectivamente, mientras que los valores más bajos correspondieron a los venenos de *B. gabonica*, *C. cerastes* y *D. russelli*, los cuales fueron de  $2,5 \times 10^{-3}$ ,  $2,2 \times 10^{-3}$  y  $1,1 \times 10^{-3}$ , respectivamente (tabla 3).

Tabla 3. Actividad enzimática de los venenos estudiados

| Veneno                                  | Actividad específica (U/mg) |              |                                     |
|---|-----------------------------|--------------|-------------------------------------|
|   | 5' Nucleotidasa             | Proteolítica | Amidolítica<br>(x 10 <sup>3</sup> ) |
| <b>Familia Viperidae</b>                |                             |              |                                     |
| <i>Lachesis muta</i>                    | 65,3 ± 4,3                  | 26,3 ± 1,9   | 97,7 ± 5,5                          |
| <i>Bothrops atrox</i>                   | 17,4 ± 0,5                  | 24,1 ± 0,9   | 52,2 ± 3,8                          |
| <i>Bothrops pictus</i>                  | 9,5 ± 0,3                   | 8,42 ± 0,4   | 13,4 ± 6,9                          |
| <i>Agkistrodon piscivorus</i>           | NP                          | 19,7 ± 1,1   | 36,0 ± 1,3                          |
| <i>Crotalus adamanteus</i>              | NP                          | 9,1 ± 1,7    | 36,9 ± 2,2                          |
| <i>Crotalus atrox</i>                   | 1,6 ± 0,4                   | 81,9 ± 1,8   | 8,79 ± 0,5                          |
| <i>Calloselasma<br/>rhodostoma</i>      | 17,3 ± 0,3                  | 69,9 ± 0,3   | 6,0 ± 0,2                           |
| <i>Crotalus durissus<br/>terrificus</i> | 1,3 ± 0,2                   | 3,4 ± 0,2    | 8,5 ± 0,6                           |
| <i>Bitis arietans</i>                   | 6,5 ± 0,2                   | 20,1 ± 0,9   | 8,5 ± 0,3                           |
| <i>Bitis gabonica</i>                   | NP                          | 6,0 ± 0,7    | 2,5 ± 0,0                           |
| <i>Bitis nasicornis</i>                 | 8,4 ± 0,3                   | 16,9 ± 2,1   | 28,0 ± 1,3                          |
| <i>Cerastes cerastes</i>                | 3,3 ± 0,2                   | 25,4 ± 1,8   | 2,2 ± 0,2                           |
| <i>Vipera aspis aspis</i>               | NP                          | 11,6 ± 0,4   | 4,2 ± 0,1                           |
| <i>Macrovipera deserti</i>              | 1,3 ± 0,2                   | 20,6 ± 0,8   | 6,5 ± 0,4                           |
| <i>Daboia russelli</i>                  | 1,9 ± 0,5                   | 5,1 ± 0,8    | 1,1 ± 0,1                           |
| <b>Familia Elapidae</b>                 |                             |              |                                     |
| <i>Dendroaspis<br/>angusticeps</i>      | NP                          | 5,3 ± 1,2    | NP                                  |
| <i>Hemachatus<br/>haemachatus</i>       | 30,2 ± 0,9                  | 5,7 ± 0,4    | NP                                  |
| <i>Naja nigricollis</i>                 | 8,6 ± 0,1                   | 8,6 ± 0,8    | NP                                  |
| <i>Naja mossambica</i>                  | 40,5 ± 2,2                  | 7,4 ± 0,4    | NP                                  |

± desviación estándar (n=3).

NP: no presentó

*Actividad coagulante*

La tabla 4 muestra que la mayoría de los venenos de la familia Viperidae contienen enzimas capaces de coagular el plasma citratado y los fibrinógenos comerciales, aunque algunos venenos muestran afinidad sólo por algunos de ellos. Así, los venenos con mayor actividad coagulante corresponde a los de *L. muta* y *B. atrox*, los cuales poseen mayor actividad sobre plasma, siendo sus valores de 2,5 y 1,4, respectivamente, poseyendo, además, una potencia coagulante de 15,3 para *L. muta* y de 3,6 para *B. atrox*. Así también, los valores más bajos fueron de los venenos de *B. pictus*, *C. adamanteus*, *C. durissus terrificus*, *C. rhodostoma* y *B. gabonica*. En cuanto a los venenos de *B. nasicornis* y *D. russelli* no presentaron actividad coagulante, sin embargo, cuando estos venenos fueron sometidos a mayor tiempo de incubación con los sustratos, lograron coagular tanto el plasma como el fibrinógeno humano. El resto de víperidos, así como todos los elápidos no mostraron actividad coagulante.

**Tabla 4.** Actividad coagulante de los venenos estudiados

| Veneno                              | Actividad específica (U/mg)                          |                    |                    | Potencia coagulante (NIHu/mg) |
|-------------------------------------|--|--------------------|--------------------|-------------------------------|
|                                     | Plasma humano  | Fibrinógeno humano | Fibrinógeno bovino |                               |
| <b>Familia Viperidae</b>            |  |                    |                    |                               |
| <i>Lachesis muta</i>                | 2,5  | 0,4                | 0,2                | 15,3                          |
| <i>Bothrops atrox</i>               | 1,4  | 0,2                | 0,2                | 3,6                           |
| <i>Bothrops pictus</i>              | 0,1  | 0,05               | 0,05               | NP                            |
| <i>Agkistrodon piscivorus</i>       | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Crotalus adamanteus</i>          | 0,2  | 0,1                | 0,05               | 0,8                           |
| <i>Crotalus atrox</i>               | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Calloselasma rhodostoma</i>      | 2,0  | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 0,4  | 0,2                | 0,1                | 1,1                           |
| <i>Bitis arietans</i>               | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Bitis gabonica</i>               | 0,1  | 0,04               | 0,01               | NP                            |
| <i>Bitis nasicornis</i>             | 0,003  | 0,001              | NP                 | NP                            |
| <i>Cerastes cerastes</i>            | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Vipera aspis aspis</i>           | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Macrovipera deserti</i>          | NP   | NP                 | NP                 | NP                            |
| <i>Daboia russelli</i>              | 0,003  | 0,001              | NP                 | NP                            |
| <b>Familia Elapidae</b>             | No presentaron capacidad de coagular ningún sustrato |                    |                    | NP                            |

NP: no presentó

*Actividad procoagulante*

Se puede observar en la tabla 5 que el veneno de *C. cerastes* es capaz de acelerar el tiempo de recalcificación del plasma con un valor de 288%, lo que indica una elevada actividad procoagulante. Por otra parte, el veneno de *D. angusticeps* produce el mismo tiempo de coagulación al obtenido sin adición de veneno (100%), mientras que *V. aspis aspis*, *C. atrox* y *Macrovipera deserti* alargan el tiempo de recalcificación con valores de 159, 400 y 420 segundos.

**Tabla 5.** Venenos con actividad procoagulante.

| Muestras                       | Tiempo de coagulación (s) | Actividad (%) |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|
| CaCl <sub>2</sub> 25mM         | 121                       | 100           |
| <i>Cerastes cerastes</i>       | 42                        | 288           |
| <i>Dendroaspis angusticeps</i> | 120                       | 101           |
| <i>Vipera aspis aspis</i>      | 159                       | 76            |
| <i>Crotalus atrox</i>          | 400                       | 30            |
| <i>Macrovipera deserti</i>     | 420                       | 29            |

## DISCUSIÓN

El veneno de serpientes se caracteriza por ser una mezcla compleja rica en proteínas, dentro de las cuales destacan las enzimas<sup>5</sup>. Las toxinas del veneno probablemente evolucionaron a partir de proteínas endógenas con funciones fisiológicas normales que fueron reclutadas dentro del proteoma del veneno antes de la radiación de las serpientes avanzadas<sup>16</sup>. Nosotros hemos encontrado que este contenido proteico es especialmente elevado en las serpientes de la familia Elapidae (tabla 2), cuya ponzoña se conoce está compuesta principalmente de neurotoxinas<sup>2</sup>, péptidos de bajo peso molecular que se encuentran en cantidades apreciables en el veneno total.

Si se tiene en cuenta la alta sensibilidad de los métodos de Lowry y Bradford y de que están en función directa con la exposición de los enlaces peptídicos, se puede inferir que proteínas más pequeñas, pero con mayor número de moléculas, darían valores más altos que los que podríamos encontrar con proteínas de alto peso molecular, en las cuales, ocupando el mismo espacio que una cierta cantidad de péptidos, existe una menor proporción de los enlaces CO-NH disponibles para la reacción. Además, hay que considerar que en los venenos de los vipéridos son frecuentes las asociaciones de proteínas con carbohidratos (glicoproteínas), donde estos últimos pueden reducir el grado de sensibilidad de las reacciones colorimétricas.

Es necesario considerar que la reacción de Bradford y el método de Lowry cuantifican microgramos de proteína en el orden de 0,5 a 10, por lo que constituye métodos apropiados para esta valoración. En cuanto a la absorbancia UV a 280 nm, si bien es cierto es el procedimiento más rápido y usado para la cuantificación de proteínas, podemos considerarlo como un método referencial en el caso de los venenos ofídicos, puesto que, este material biológico puede contener adicionalmente polinucleótidos, péptidos y pigmentos con anillos heterocíclicos que incrementan la absorbancia a 280 nm<sup>17</sup>.

En concordancia con estudios previos<sup>18</sup>, nosotros hemos logrado encontrar actividad de 5'nucleotidasa en las dos familias estudiadas, no hallando ninguna correspondencia entre los niveles de actividad y el grupo de venenos ofídicos analizados. La variabilidad en esta actividad enzimática no sólo parece corresponder a diferencias entre especies, sino también, entre ejemplares de la misma especie, ya que en contraste con lo encontrado por Hurst y Butler<sup>19</sup> y Williams *et al.*<sup>20</sup>, quienes lograron aislar la 5'nucleotidasa de los venenos de *A. piscivorus* y *C. adamanteus*, nosotros no detectamos esta actividad en dichos venenos.

Por su parte, la actividad proteolítica fue más elevada en vipéridos que en elápidos, lo cual es un reflejo de las diferencias en las sintomatologías producidas por cada familia de serpientes. En general, el envenenamiento por vipéridos se caracteriza por sus efectos locales tales como edema, hemorragia y necrosis, además de producir alteración de la hemostasia, procesos en los cuales las proteasas juegan un rol fundamental<sup>4</sup>. Sin embargo, en elápidos estas alteraciones son menores, preponderando una interrupción de las funciones normales del sistema nervioso en donde la línea de acción de las proteasas es limitada o nula<sup>2</sup>.

La acción coagulante y procoagulante de los venenos de serpientes corresponden a estrategias evolutivas que colaboran con los procesos de parálisis y digestión de la presa<sup>14</sup> y es una característica de muchos envenenamientos ocasionados por mordeduras de vipéridos y algunos elápidos<sup>4</sup>. Sin embargo, nuestros resultados indican que los venenos analizados de elápidos carecen de acción coagulante, así como de actividad amidolítica. Es interesante remarcar que los venenos de las serpientes *L. muta* y *B. atrox* poseen una elevada capacidad de coagular los fibrinógenos y de escindir al BApNA, lo cual estaría evidenciando la presencia serinoproteasas, especialmente enzimas similares a trombina, proteínas que ya han sido

aisladas y caracterizadas en nuestro laboratorio<sup>14,21</sup>. Por otro lado, la actividad procoagulante de *C. cerastes* fue elevada indicando que este veneno posee componentes involucrados en la alteración de la cascada de coagulación.

### CONCLUSIONES

Los venenos de las serpientes investigadas y que proceden de diferentes regiones del mundo son sustancias con elevado y variado contenido proteico y que poseen varios tipos de enzimas preponderando en el caso de venenos de vipéridos las actividades coagulante y proteolítica, mientras que la actividad 5'nucleotidasa se encuentra tanto en venenos de vipéridos como de elápidos, lo que demuestra la variada estrategia que las serpientes pueden adoptar en favor de su alimentación, y por ende, de su supervivencia.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente estudio agradecen la colaboración de las instituciones y los científicos que lo apoyaron a través de la donación de los venenos y el asesoramiento que nos brindaron.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of the western hemisphere. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates; 2004.
2. Warrell D. Snake bite. *Lancet*. 2010; 375: 77-88.
3. Campos S., Yarlequé A. 5'Nucleotidasa en el veneno de la serpiente *Lachesis muta L.* *Boletín de la Sociedad de Química del Perú*. 1974; 3, 202-212.
4. Sánchez E., Gabriel L, Gontijo S., Gremski L., Veiga S., Evangelista K, Eble J., Richardson M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus venom*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007; 468, 193-204.
5. Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en los venenos de serpientes peruanas. *Boletín del Consejo Superior de Investigaciones*. 2004; 54, 12-15.
6. Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*, 1941; 310: 384-421.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193 (1): 265-275.
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-256.
9. Heredia, V.; Campos, S. y Yarlequé, A. Actividad de una 5' Nucleotidasa en el veneno de *Bothrops atrox* (L) "jergón". *Acta Científica Venezolana*. 1982; 33: 333-337.
10. Takahashi T, Ohsaka A. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochem Biophys Acta*. 1970; 198(2): 293-307.
11. Loayza, S.; Morante, Y.; Campos, S. y Yarlequé, A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*. 1985; 52 (3): 151-163.
12. Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Ochem, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of Tripsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 95: 271.

13. Copley, A. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos Res.* 1973; 2: 487-508.
14. Yarlequé A. Enzima similar a la Trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*: Aislamiento, caracterización bioquímica y acción biológica. Tesis doctoral de la UNMSM, Lima-Perú. 1987, 14-17.
15. Yarlequé A., Heredia V., Arbaiza E., Zavaleta A. Estudios electroforéticos y acción procoagulante del veneno de *Loxocoles laeta*. Diagnóstico. 1986; 17: 39-45.
16. Fry, B.G. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 2005; 15, 403-420.
17. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Fondo Editorial, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2000.
18. Russell F. Pharmacology of animal venoms. *Clin Pharmacol Ther.* 1967; 8, 849.
19. Hurts R., Butler G. The chromatographic separation of fosfates in snake venoms. *J Biochem.* 1951; 193, 91-96.
20. Williams E., Sung G., Laskowski M. Action of venom phosphodiesterase on deoxyribonucleic acid. *JBiol Chem.* 1961; 236, 1130-1134.
21. Sandoval G., Lazo F., Rodriguez E., Yarlequé A., Zingali R. Identificación molecular y actividad sobre sustratos cromogénicos de la venombina A del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Rev Peru Biol.* 2010; 17 (3): 365-370.

## ANÁLISIS PROXIMAL, CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL MUSGO BLANCO (*Sphagnum maguellanicum* Brid.) PROVENIENTE DE JUNÍN, PERÚ

David Condori<sup>a</sup>, Marco Piñatelli<sup>b</sup>, Rafaela Elías<sup>c</sup>, Rosario Rojas<sup>a\*</sup>

### RESUMEN

En las zonas altoandinas del Perú crece abundantemente el musgo *Sphagnum maguellanicum*, el cual es cosechado y secado por las comunidades de Junín para ser luego exportado a bajo precio, principalmente como sustrato para el cultivo de orquídeas. El objetivo del presente estudio fue el determinar la composición química proximal, las principales características fisicoquímicas y la actividad antibacteriana del musgo *Sphagnum maguellanicum* procedente de Junín; así como el de realizar un estudio preliminar de su capacidad de adsorción del ion metálico Cu<sup>+2</sup>; con miras a identificar su potencial para el desarrollo de productos derivados con mayor valor agregado.

Se encontró que el musgo peruano posee un pH ácido (4,5 - 6,0), gran capacidad de absorción de agua (hasta 47 veces su peso seco a las 24 horas), buena adsorción de iones cobre, gran cantidad de fibra y carbohidratos; así como una buena actividad antimicrobiana *in vitro* contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Estas características hacen de este musgo un posible candidato para el desarrollo de filtros removedores de metales y bacterias.

**Palabras clave:** musgo, *Sphagnum maguellanicum*, antimicrobiano, análisis proximal

## PROXIMATE COMPOSITION, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF WHITE MOSS (*Sphagnum maguellanicum* Brid.) FROM JUNÍN, PERÚ

### ABSTRACT

In the highlands of Peru grows abundantly *Sphagnum maguellanicum* moss, which is harvested and dried by the communities of Junín, to be exported at a low price, mainly as substrate for the culture of orchids. The objective of the present study was to determine the proximate chemical composition, the main physico-chemical characteristics and the antibacterial activity of *Sphagnum maguellanicum* from Junín; as well as to carry out a preliminary study of its metallic ion Cu<sup>+2</sup> adsorption capacity; with the aim of identifying its potential for the development of derived products with greater added value. We found for the Peruvian moss acid pH values (4,5 - 6,0), great absorptivity of water (up to 47 times its dry weight after 24 hours), good metallic ion adsorption, high content of fiber and carbohydrates; as well as a good antimicrobial activity *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and

---

<sup>a</sup> Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia;

<sup>b</sup> Inkamoss;

<sup>c</sup> Laboratorio de Ecotoxicología, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia

\* Autor de correspondencia: rosario.rojas@upch.pe, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú, Tel +51 1 3190000 Anexo 2705

*Streptococcus faecalis*. These characteristics make Peruvian moss a possible candidate for the development of filters for the removal of metals and bacteria.

**Key words:** moss, *Sphagnum maguellanicum*, antimicrobial, proximate composition

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el género *Sphagnum* comprende más de 150 especies de musgos, con una distribución particular debida a las condiciones ambientales y de suelos que les confieren características morfológicas y fisicoquímicas propias.<sup>1</sup>

En general, las especies de musgo *Sphagnum* se caracterizan por su gran capacidad de absorción de humedad,<sup>2</sup> captación de metales pesados<sup>3</sup> y actividad antibacteriana<sup>4</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la potencia de estas actividades depende de la especie estudiada y del lugar de procedencia del musgo.<sup>1</sup>

Hasta el momento se han reportado para el Perú cuatro especies, siendo la de mayor abundancia la especie *Sphagnum maguellanicum*, la cual crece en las zonas altoandinas, con altos índices de humedad, precisamente donde se encuentra la población más pobre del país. El musgo se cosecha a mano, luego se seca en tendales, se prensa y empaca para ser comercializado en el mercado internacional, utilizándose principalmente como retenedor de agua, como sustrato de propagación para el cultivo de orquídeas, decoración de maceteros y empaquetado de flores o portainjertos.<sup>2</sup>

Este recurso natural, de alto valor ambiental y gran potencial económico, actualmente no es aprovechado en forma sostenible. Es por lo tanto necesario desarrollar, mediante la investigación, una alternativa que les permita a las comunidades altoandinas aprovechar el recurso en forma sostenida, convirtiendo así al *Sphagnum*, hoy aprovechado sólo como materia prima, en un instrumento para el mejoramiento de calidad de vida.

El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química proximal, las principales características fisicoquímicas y la actividad antibacteriana del *Sphagnum maguellanicum* procedente de Junín; así como el de realizar un estudio preliminar de su capacidad de adsorción del ion metálico Cu<sup>+2</sup> con miras a identificar su potencial para el desarrollo de productos derivados con mayor valor agregado.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Colección e identificación de muestra

Se colectó dos muestras, de aproximadamente 200 g cada una, de musgo fresco, las cuales fueron puestas a secar a temperatura ambiente y bajo sombra. Las muestras fueron colectadas en abril del 2011 en la región de Junín, e identificadas por la Ing. Dominga Zúñiga.

### Densidad aparente

Las muestras de gametofitos fueron colocadas en un frasco de volumen conocido. Posteriormente, este frasco destapado fue secado en una estufa (45°C) hasta peso constante. Por último, para obtener la densidad de la muestra se anotó su peso seco y éste se dividió por el volumen del frasco.<sup>1</sup> Este análisis se realizó por triplicado.

### Determinación de pH y conductividad

Los valores de pH y conductividad se obtuvieron exprimiendo 0,5 g de cada una de las muestras de musgo rehidratado. A continuación se midió el pH y conductividad del líquido obtenido, por medio de un pH-metro (Thermo Electron Corp.) y un conductímetro (Cole Palmer Instrument Co.), respectivamente.<sup>1</sup> Estos ensayos fueron realizados por triplicado.

### Capacidad de absorción de agua

Para este ensayo<sup>1</sup> se realizó primero el secado de las muestras en una estufa a 105°C por 10

minutos y luego a 80°C por varias horas, hasta obtener un peso constante. Para medir la captación de agua por los gametofitos del musgo, se colocó 1 g de muestra seca en un vaso de precipitados de 250 mL previamente pesado. Luego se añadió 100 mL de agua destilada y se dejó reposar por 30 segundos. Transcurrido este tiempo, se escurrió el musgo con un colador y se procedió a colocarlo en el vaso de 250 mL. Finalmente se determinó el peso del agua captada por 1 g de musgo seco.

En un segundo ensayo se siguió el procedimiento anterior, pero esta vez se puso en contacto el musgo con el agua destilada por un período de 24 horas. Cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

### **Ensayo de retención de Cu<sup>+2</sup>**

Una de las muestras de musgo fue molida finamente hasta obtener partículas de 8 mm. Un gramo de dicha muestra fue colocada en un erlenmeyer y expuesta a 200 mL de una solución de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (100 mg/L). La mezcla fue mantenida bajo agitación (100 rpm) por un período de 72 horas, al cabo de las cuales se procedió a filtrar. El filtrado obtenido fue sometido a análisis por ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo) para determinar la concentración remanente de Cu<sup>+2</sup>; mientras que la cantidad del ion metálico retenido por el musgo fue calculada por diferencia de concentraciones.<sup>5</sup> Este ensayo fue repetido 5 veces.

### **Análisis químico proximal**

Se determinó el contenido de humedad, grasas, proteínas, cenizas y fibra cruda de acuerdo a procedimientos estándares de la AOAC.<sup>6</sup> Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. El contenido de carbohidratos fue calculado por diferencia (100% menos el contenido de los otros componentes ya mencionados).

### **Preparación de extractos**

El extracto acuoso del musgo se obtuvo por cocimiento por 30 minutos de 20 g de musgo seco con 100 mL de agua destilada; mientras que el extracto etanólico se obtuvo por maceración a temperatura ambiente de 20 g de musgo en 100 ml de etanol por 3 días. Los extractos obtenidos fueron sometidos a filtración y evaporación total del solvente. Finalmente, los extractos crudos obtenidos se diluyeron en sus respectivos solventes a una concentración de 80 mg/mL.

### **Actividad antimicrobiana de los extractos**

Los microorganismos de ensayo fueron 2 bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus faecalis* ATCC 10536 y dos bacterias gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Proteus vulgaris*.

Cada uno de los cultivos fue repicado en medio TSA (DIFCO); luego incubados en estufa a 37°C por 24 horas. A partir de esos cultivos jóvenes se prepararon los inóculos por suspensión en agua peptonada estéril al 0,1%, equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mac Farland (10<sup>8</sup> UFC/mL).

La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo utilizando el método disco-placa-cultivo, con discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y 0,6 mm de espesor.<sup>7</sup> Estos discos fueron impregnados con 20 µL de los respectivos extractos (equivalente a 1,6 mg del extracto crudo), dejándose luego evaporar el solvente a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó el sulfato de estreptomina (500 UI/mL) impregnando en los discos 20 µL. Éstos se colocaron sobre la superficie de una placa con agar de 100 µL del inóculo. Luego fueron incubados a 37°C por 24 horas, después de las cuales se procedió con la lectura de los diámetros de las zonas de inhibición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los rangos de las principales características fisicoquímicas obtenidas para dos muestras de *S. maguellanicum* colectado en Junín. El musgo se destaca por tener una densidad muy baja, un pH en rango ácido y una capacidad de absorber agua, a las 24 horas, de hasta 46 veces con respecto a su peso seco.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del musgo *Sphagnum maguellanicum*

| Análisis                         |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| Densidad aparente                | 0,02175 - 0,02615 g/mL |
| pH:                              | 4,5 - 6,0              |
| Conductividad :                  | 182,7 - 197,2 $\mu$ S  |
| Captación de agua (30 segundos): | 16 - 21 ml/g           |
| Captación de agua (24 horas):    | 30 - 46 ml/g           |

Vásquez<sup>1</sup> evaluó muestras de *Sphagnum maguellanicum* chileno proveniente de 4 localidades (Los Ulmos, Cordillera Perlada, Quilquico y Lago Vargas), obteniendo como resultados valores de pH (3,82 - 4,11) más ácidos y captaciones de agua menores (22 a 27 veces su peso seco a las 24 horas) que el musgo peruano. No hay diferencia en los otros parámetros fisicoquímicos evaluados en ambos musgos.

En el presente trabajo se hizo un estudio exploratorio sobre la capacidad del musgo para retener iones como el  $\text{Cu}^{+2}$ . Se obtuvo que por cada gramo de musgo *S. maguellanicum* se puede absorber hasta 19,3 mg de dicho ion metálico. Estos resultados sugieren que el musgo podría ser un buen candidato para el desarrollo de filtros removedores de metales; sin embargo, se precisa realizar estudios más detallados sobre la cinética de adsorción del ion cobre, así como de otros iones metálicos.

La tabla 2 muestra los resultados del análisis químico proximal del musgo *Sphagnum maguellanicum* proveniente de Junín, el cual contiene una gran cantidad de fibra cruda (39,1 - 43,3%) y carbohidratos (30,0 - 36,9%), que explican su gran capacidad de absorber agua

**Tabla 2.** Análisis Proximal del musgo *Sphagnum maguellanicum*

| Análisis      | Contenido (%) <sup>(*)</sup> |
|---------------|------------------------------|
| Proteína      | 1,9 – 2,2                    |
| Fibra         | 39,1 – 43,3                  |
| Cenizas       | 4,7 – 6,0                    |
| Grasas        | 0,4 – 0,5                    |
| Carbohidratos | 30,0 – 36,9                  |
| Humedad       | 15,6 – 19,4                  |

(\*)Base húmeda

La procedencia del musgo afecta la composición química del mismo. Por ejemplo, el musgo *S. maguellanicum* proveniente de Chile destaca por su mayor contenido de fibra (56,0%) y menor contenido de carbohidratos (20,9%)<sup>8</sup>, en comparación con el musgo peruano. Los autores sugieren la aplicación del *Sphagnum* como fibra dietaria en la preparación de productos de panadería.<sup>9-10</sup> Sin embargo, según Vásquez<sup>1</sup>, las muestras de *S. maguellanicum* provenientes de cuatro diferentes localidades de Chile mostraron contenidos de fibra cruda (39,2 - 47,1) similares a las obtenidas en el presente trabajo.

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso y etanólico de *S. maguellanicum*, obteniéndose que ambos poseen muy buena actividad contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*) y nula actividad contra las gram negativas. En el test de difusión en agar, la actividad de ambos extractos contra los gérmenes gram positivos es, inclusive, similar a la del antibiótico estándar estreptomycin (tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Sphagnum maguellanicum*

| Microorganismo                | Diámetro de inhibición de crecimiento (mm) |                    |                                   |
|-------------------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
|                               | Extracto acuoso                            | Extracto etanólico | Estreptomicina (Control positivo) |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 20   | 18                 | 18                                |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 18   | 16                 | 16                                |
| <i>Escherichia coli</i>       | -  | -                  | 15                                |
| <i>Proteus vulgaris</i>       | -  | -                  | 11                                |

Montenegro y colaboradores<sup>11</sup> encontraron que el musgo *S. maguellanicum* de Chile posee actividad contra un amplio espectro de bacterias, como por ejemplo: *Azotobacter vinelandii*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus*.

### CONCLUSIONES

El musgo *Sphagnum maguellanicum*, proveniente de las comunidades de Junín posee un pH ácido, gran capacidad de absorción de agua (hasta 47 veces su peso seco), buena adsorción de iones cobre, gran cantidad de fibra y carbohidratos; así como una buena actividad antimicrobiana *in vitro*, especialmente contra bacterias gram positivas. Estas características hacen del musgo peruano un posible candidato para el desarrollo de filtros removedores de metales y bacterias.

### AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo gracias al auspicio del FINCyT (Proyecto 118-10-FINCyT-PITEI-2010: Desarrollo de productos con valor agregado a partir del *Sphagnum* (musgo blanco) proveniente de comunidades de la región de Junín).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Vásquez, J. Características anatómicas, propiedades físico-químicas y capacidad de retención de agua en gametofitos de *Sphagnum maguellanicum* Brid. en un gradiente longitudinal. Tesis Título Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 2008, 130 pp.
2. Tapia, C. Crecimiento y productividad del musgo *Sphagnum maguellanicum* Brid. en turberas secundarias de la provincia de Llanquihue, Chile. Tesis Licenciatura en Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 2008, 83 pp.
3. Ho, Y.S., McKay, G. The kinetics of sorption of divalent metal ions onto *Sphagnum moss* peat. *Water Research*. 2000, 34, 735-742.
4. Singh, M., Rawat, A.K.S., Govindarajan, R. Antimicrobial activity of some Indian mosses. *Fitoterapia*. 2007, 78, 156-158.
5. Kobya, M., Demirbas, E., Senturk, E., Ince, M. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. *Bioresource Technology*. 2005, 96, 1518-1521.
6. AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis, 18<sup>th</sup> Edition, Revision 3. Washington DC. USA., 2010.
7. Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1992, 35, 275-283.
8. Villarroel, M., Biolley, E., Yáñez, E., Peralta, R. Caracterización químico nutricional del musgo *Sphagnum maguellanicum*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2002, 52, 393-399.
9. Villarroel, M., Acevedo, C., Yáñez, E., Biolley, E. Propiedades funcionales de la fibra del musgo *Sphagnum maguellanicum* y su utilización en la formulación de productos de panadería. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2003, 53, 400-407.
10. Villarroel, M., Reyes, C., Hazbun, J., Karmelic, J. Optimización de una formulación de queques (cakes) con características funcionales a partir de almidones resistentes, *Sphagnum maguellanicum* y harina desgrasada de avellana (*Gevuina avellana* Mol). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2007, 57, 56-61.
11. Montenegro, G., Portaluppi, M.C., Salas, F.A., Díaz M.F. Biological properties of the Chilean native moss *Sphagnum maguellanicum*. *Biological Research*. 2009, 42, 233-237.

## PURIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE BILINEATOBINA, UNA PROTEÍNA COAGULANTE DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA ARBORÍCOLA *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO)

Gladys Cahuana<sup>a</sup>, Dan Vivas<sup>b\*</sup>, Edith Rodríguez<sup>b</sup>, Armando Yarleque<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se ha purificado una enzima coagulante del veneno de la serpiente arborícola *Bothrops bilineatus*, denominada bilineatobina, mediante dos pasos cromatográficos sobre Sephadex G-100 y CM-Sephadex C-50, respectivamente, utilizando en ambos casos como buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La enzima fue purificada 24,8 veces con un rendimiento de 16%. El peso molecular obtenido por cromatografía de exclusión molecular fue de 40 kDa mientras que por PAGE-SDS se obtuvo 45 kDa. Se trata de una proteína monomérica con al menos un puente disulfuro y debido a su actividad coagulante sobre el plasma humano citratado, fibrinógeno bovino así como el sustrato cromogénico BApNA; se trataría de una enzima similar a trombina. La actividad amidolítica fue estable hasta los 50°C y el pH óptimo fue de 7,5. La enzima es inhibida por PMSF, lo que sugiere que se trata de una serinoproteasa y su inhibición por la heparina señala una mayor semejanza funcional con la trombina que con proteínas homólogas de otros venenos ofídicos.

**Palabras clave:** Enzima coagulante, veneno, serpiente, *Bothrops bilineatus*. bilineatobina

## PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF BILINEATOBIN, A CLOTTING ENZYME ISOLATED FROM THE VENOM OF THE ARBOREAL PERUVIAN SNAKE *Bothrops bilineatus* (LORO MACHACO)

### ABSTRACT

A clotting enzyme was purified from *Bothrops bilineatus* arboreal snake venom, called bilineatobin, using Sephadex G-100 followed by CM Sephadex C-50, in both two cases with 0,05 M ammonium acetate buffer pH 6,0. The enzyme was purified 24,8 fold with 16% of yield. The molecular weight obtained by molecular exclusion chromatographic was 40 kDa while by SDS-PAGE was 45 kDa. It is a monomeric protein with at least one disulfide bond and because its coagulant activity on fibrinogen, citrated human plasma as well as chromogenic substrate BApNA would be a trombin like enzyme. The amidolytic activity was stable until 60°C and optimum pH was 7,0. In addition the enzyme is inhibited by PMSF suggesting that is a serine proteinase and its inhibition by heparin indicates greater functional similarity to the protein thrombin counterparts in other ophidian poisons.

**Key words:** Coagulant enzyme, venom, snake, *Bothrops bilineatus*. bilineatobin

<sup>a</sup> Dirección actual: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)- Universidad Pablo de Olavide, CIBERDEM, Sevilla-España, gmcahmac@upo.es

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. devivasr@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El Perú posee una variada fauna ofídica, en donde se incluye más de 30 especies de serpientes venenosas o víboras; la mayoría de estas pertenecientes a la familia Viperidae que se distribuyen en la costa sierra y selva de nuestro país<sup>1</sup>.

Una sintomatología clásica en el envenenamiento causado por la mordedura de estas serpientes, conocido como ofidismo, es la alteración del sistema homeostático que se manifiesta, en última instancia, en la aceleración o el retraso en el tiempo de coagulación sanguínea de la persona afectada. Esto se debe a la presencia de enzimas en el veneno que actúan a nivel de la cascada de coagulación, agregación y/o adhesión plaquetaria, fibrinógeno o fibrina<sup>2</sup>.

Dentro de este panorama, es muy conocida la presencia de las enzimas similares a trombina (TLE, del inglés thrombin like enzyme). Las TLEs son serinoproteasas que actúan sobre las moléculas del fibrinógeno produciendo monómeros de fibrina de forma parecida a la trombina<sup>3,4</sup>. Sin embargo, hay diferencias, sobre todo de tipo funcional, entre las TLEs y la trombina; la más importante es que las TLEs sólo pueden degradar una de las cadenas de la molécula del fibrinógeno (A $\alpha$  o B $\beta$ ) produciendo de esta manera un coágulo inestable que es rápidamente removido por los procesos fibrinolíticos secundarios conduciendo a una incoagulabilidad sanguínea.<sup>2,5</sup>

No obstante, las TLEs han despertado interés en el campo farmacológico, ya que pueden ser empleadas como herramientas terapéuticas, principalmente en el tratamiento de los trastornos homeostáticos<sup>5</sup>. Además, estas moléculas no son usualmente inhibidas por la heparina, principal inhibidor de la trombina, lo que permite el análisis de los niveles de fibrinógeno en sangre heparinizada<sup>2</sup>.

A la fecha se han caracterizado más de 50 TLEs procedentes de diversos venenos ofídicos, de las cuales cinco pertenecen a especies peruanas. *Bothrops bilineatus* es una serpiente arborícola llamada comúnmente loro machaco. Tiene interés estudiar los principales componentes del veneno de esta serpiente porque se considera que al alimentarse de aves y otras especies de alto movimiento, su ponzoña debe contener principios altamente selectivos para inmovilizarlas. Por tanto, en esta investigación se describe a una enzima similar trombina denominada bilineatobina recientemente caracterizada.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

Se utilizó veneno liofilizado de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* de la zona del alto Marañón, Departamento de Amazonas, a partir de ejemplares mantenidos en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la UNMSM.

Las sustancias: Fibrinógeno bovino, benzoil arginil p-nitroanilida (BAPNA), benzoil arginil etil-éster (BAEE) y tosyl arginil metil-éster (TAME) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company- USA. El plasma humano citratado fue obtenido de sangre venosa de personas saludables voluntarias.

### Purificación de la enzima

60 mg de veneno liofilizado fueron disueltos en 1,5 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 6,0, separándose los restos insolubles por centrifugación a 4000 rpm, por 10 min a 20°C. El sobrenadante fue aplicado a una columna de filtración molecular Sephadex G-100 SF (1,5 x 46,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La elución se realizó a temperatura ambiente recolectándose fracciones de 2 ml. La cuantificación de proteínas de

cada fracción fue realizada midiendo su absorbancia a 280 nm; la actividad enzimática de cada fracción fue determinada analizando su actividad amidolítica sobre BApNA.

Las fracciones con actividad amidolítica fueron juntadas (7 mL) y aplicadas a una columna de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50 (1,1 x 18,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 6,0. La elución se realizó a 25°C; se colectaron fracciones de 2 mL; aquellas fracciones con actividad amidolítica fueron reunidas y utilizadas para la caracterización bioquímica de la enzima.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS)**

Fue llevada a cabo usando el método de Laemmli<sup>6</sup> bajo condiciones reductoras, utilizando una cámara vertical MINI-GELSystem (Sigma); las corridas se realizaron por 45 min a 100 voltios. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los estándares de peso molecular usados fueron: albúmina sérica bovina (66 kDa), pepsina (34,7 kDa), y lisozima (14,3 kDa).

### **Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión**

Fue calculado de acuerdo al método de Andrews (1965)<sup>7</sup> mediante el uso de una columna de Sephadex G-100 (1,5 cm x 46,5 cm) usando como proteínas patrones: albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12,4 kDa).

### **Actividad coagulante**

Se prepararon mezclas de reacción en tubos (50 x 75 mm) que contenían 0,2 mL de plasma humano citratado o fibrinógeno bovino (5mg/mL en buffer Tris HCl 0,05M pH 7,4), adicionándose luego 0,05 mL de la enzima. La mezcla se incubo a 37°C midiéndose el tiempo de coagulación total en segundos. La actividad específica corresponde a la inversa del tiempo de coagulación sobre la cantidad de proteína empleada en mg.

### **Actividad amidolítica**

La actividad sobre BApNA fue determinada por el método de Erlanger y col. (1961)<sup>8</sup>. Para la mezcla de reacción se colocó 2 mL de BApNA  $9 \times 10^{-4}$  M, 0,45 mL de buffer Tris HCl 0,05M a pH 7,5 y 0,5 mL de la enzima, incubándose por 10 min a 37°C y agregando luego 0,5 mL de ácido acético al 60%. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm. Se calculó la actividad específica por la cantidad de micromoles de p-nitroanilina liberada por minuto por mg de proteína.

### **Actividad esterásica**

Se determinó por el método de Schwert y Takenaka (1965)<sup>9</sup>, utilizando 0,1 mL de TAME y BAEE 4mM y 2,8 mL de buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,5. Esta mezcla se incubó por 3 min a 37°C adicionándose luego 0,1 mL de la enzima y registrándose los incrementos de absorbancia a 247 nm.

### **pH óptimo**

Se utilizó buffer acetato de amonio 0,05M en un rango de pH de 6,0 a 7,0 y buffer Tris HCl 0,05M, en un rango de 7,5 a 9,0 y con intervalos de 0,5 unidades. Para esta prueba se utilizó BApNA como sustrato, midiéndose la actividad en los valores de pH indicados.

### **Termoestabilidad**

Se colocaron 110  $\mu$ L de la enzima en viales de plástico con tapa a temperaturas de 37, 45, 60, 75 y 90 °C, respectivamente, siendo luego enfriados bruscamente y mantenidos en un depósito con hielo por 3 minutos y luego se midió la actividad amidolítica con 50  $\mu$ L de la proteína tratada.

### Acción de algunos agentes químicos

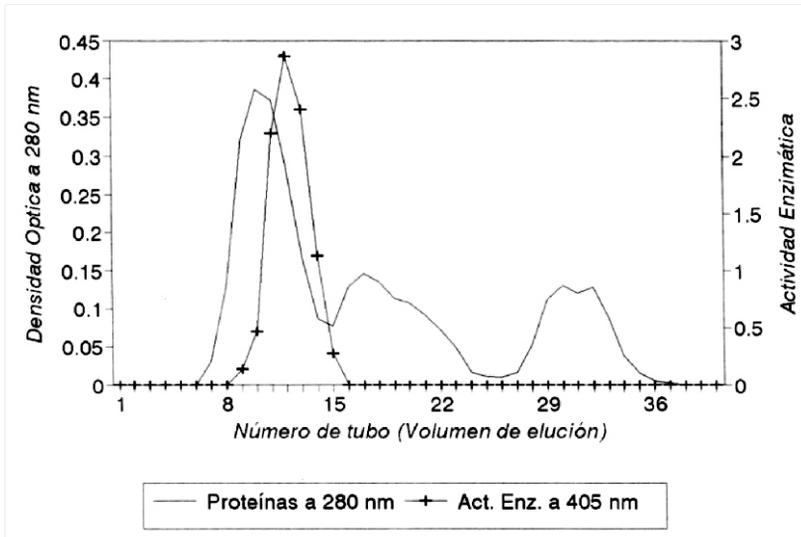
La enzima purificada (110  $\mu$ L) fue preincubada con 50  $\mu$ L de inhibidores proteolíticos: EDTA, TLCK, mercaptoetanol, yodoacetato, inhibidor de tripsina de soya, hirudina, antitrombina III, PMSF y heparina en rangos variables de concentración. La actividad residual fue determinada sobre BApNA a 405 nm.

## RESULTADOS

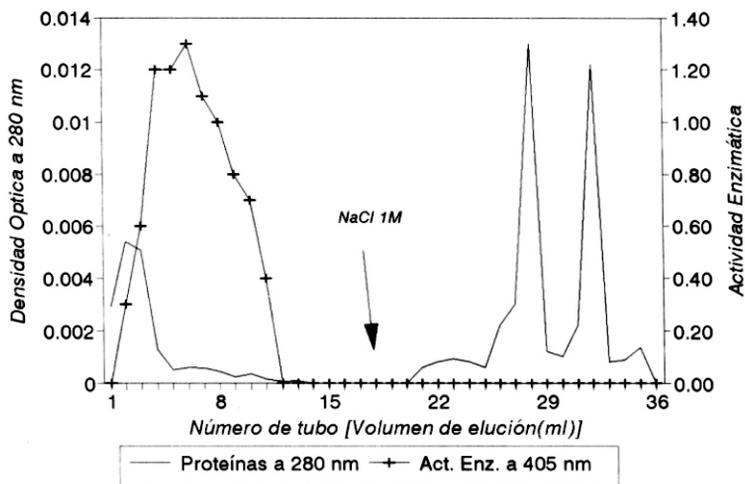
### Purificación de la enzima

Al pasar el veneno de *Bothrops bilineatus* por una columna de Sephadex G-100 se obtuvo tres picos mayores de proteína; la actividad amidolítica fue detectada en la caída del primer pico (figura 1), recuperándose un total de 12,15 mg que representa el 19,17% de la proteína total aplicada. Estas fracciones fueron juntadas y aplicadas a una columna de intercambio catiónico CM- Sephadex C-50, donde se resolvió un solo pico en el volumen isocrático y dos cuando se realizó la elución con 0,6 M de NaCl; en este segundo paso la actividad amidolítica se presentó en el pico de proteína de elución isocrática (figura 2) lográndose recuperar 0,410 mg de proteína que representa un 0,64% de la proteína total.

Cuando la segunda fracción con actividad amidolítica fue analizada por PAGE-SDS (figura 3) bajo condiciones reductoras (con el agente 2- $\beta$ -mercaptoetanol) se obtuvo una sola banda homogénea con un patrón de migración equivalente a los 45 kDa. Asimismo, al evaluar el peso molecular de la proteína por medio de cromatografía de filtración molecular, se obtuvo un valor de 40 kDa (figura 4).

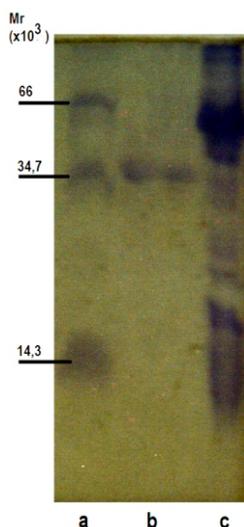


**Figura 1.** Primer paso de purificación de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus* por cromatografía de filtración molecular G-100.

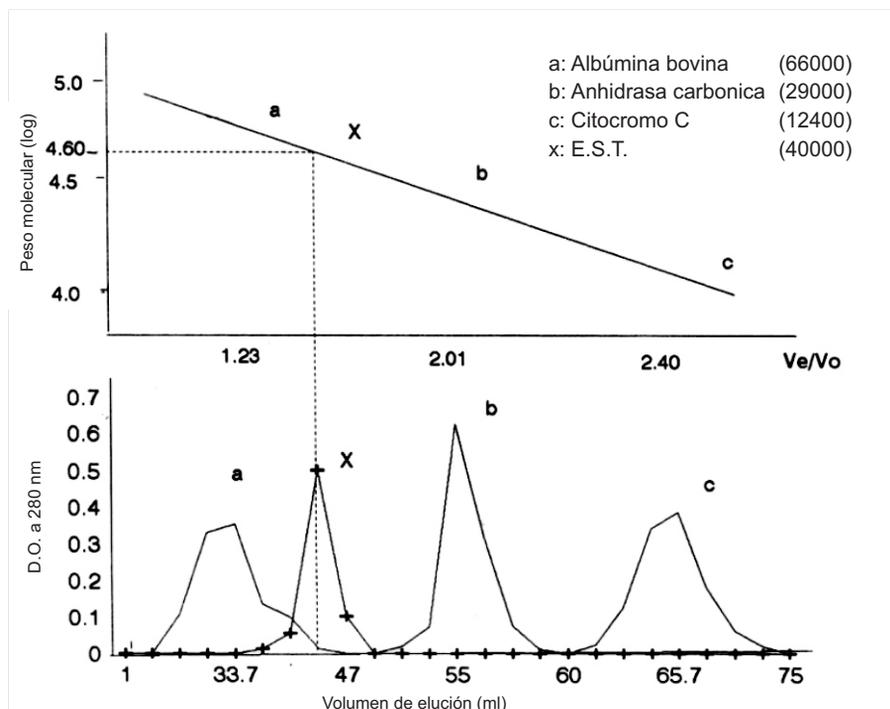


**Figura 2.** Segundo paso de purificación de la enzima coagulante del veneno de *Bothrops bilineatus* por cromatografía de intercambio catiónico CM-Sephadex C-50

Bilinetobina tuvo actividad coagulante sobre el fibrinógeno bovino (8,080 U/mg), superior al del veneno total (0,167 U/mg) observándose que para el plasma citratado los valores fueron de 4,25 U/mg y 0,056 U/mg, respectivamente. De la misma manera, el BApNA fue hidrolizado 24,8 veces más rápido por la enzima purificada que por el veneno total (tabla 1).



**Figura 3.** Análisis por PAGE-SDS de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*. (a) patrones de peso molecular. (b) enzima coagulante en condiciones reductoras 45 kDa. (c) Veneno total de *Bothrops bilineatus*



**Figura 4.** Determinación del peso molecular de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus* por cromatografía en Sephadex en G-100.

Por otro lado, tanto la enzima purificada como el veneno total no tuvieron efecto alguno sobre los sustratos BAEE y TAME, es decir, bilineatobina, no muestra una actividad esterásica.

**Tabla 1.** Actividad del veneno crudo y la enzima coagulante purificada sobre diferentes sustratos sintéticos.

| SUSTRATO           | pH  | Actividad específica (U/mg de proteína) |        |
|--------------------|-----|---|--------|
|                    |     | Veneno crudo                            | Enzima |
| Plasma             | 7,4 | 0,056                                   | 4,15   |
| Fibrinógeno bovino | 7,5 | 0,167                                   | 8,080  |
| BAPNA              | 7,5 | 0,018                                   | 0,445  |
| TAME               | 8,0 | NP                                      | NP     |
| BAEE               | 8,0 | NP                                      | NP     |

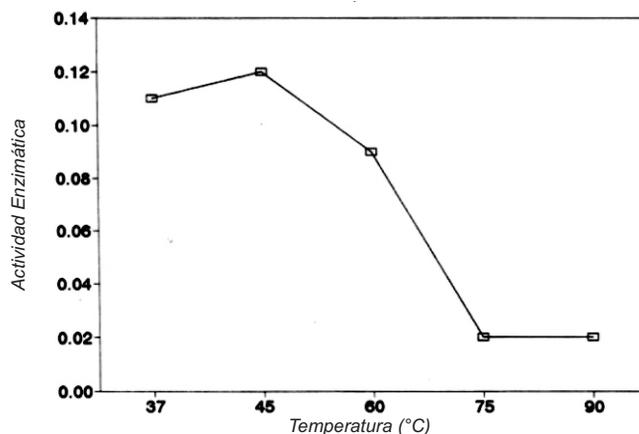


Figura 5. Termoestabilidad de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*.

### Efectos del pH y temperatura

La actividad residual usando BApNA como sustrato indica que la actividad amidolítica de la enzima es estable hasta los 60°C. En tanto que un aumento de preincubación a 75°C produce una disminución de la actividad en un 90% (figura 5). Por otro lado, la enzima mantiene su actividad amidolítica en un rango de pH de 7,0 a 8,5. A pH 9,0 la actividad enzimática disminuye en un 70% (figura 6).

### Efecto de algunos agentes químicos

En la tabla 2 se muestra el efecto de algunos inhibidores proteolíticos sobre la actividad de la enzima. El PMSF (4 mM) produjo una inhibición total de la actividad enzimática, en tanto que la heparina (166,66 U/ml) causó una inhibición del 65,9% de la actividad inicial. En cambio, el EDTA (1 mM) y el mercaptoetanol (20 mM), no tuvieron acción inhibitoria alguna; un resultado similar se produce cuando se emplea antitrombina III, yodoacetato, TLCK, hirudina y el inhibidor de tripsina de soja que no disminuyen de manera significativa la actividad sobre el BApNA.

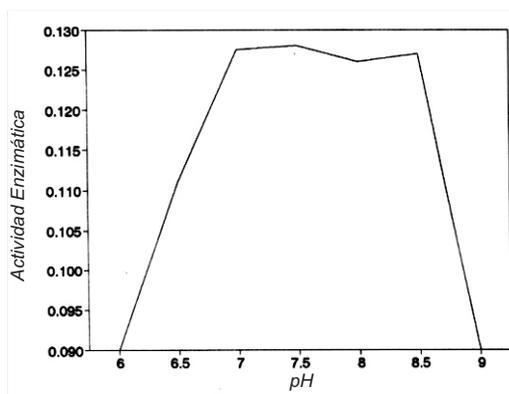


Figura 6. Curva de pH óptimo de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo reporta la purificación y la caracterización de una enzima coagulante del veneno de *Bothrops bilineatus* a la que hemos denominado bilineatobina. Se trata de una enzima similar a trombina que eluye en condiciones isocráticas de un intercambiador catiónico CM Sephadex C-50 (figura 2) lo que indicaría que a pH 5,0 la proteína tiene una alta densidad de carga negativa, es decir, una posible naturaleza ácida.

El peso molecular obtenido por filtración molecular fue de 40 kDa (figura 3) en tanto que por PAGE-SDS, bajo condiciones reductoras, se obtuvo un valor 45 kDa (figura 4); esa diferencia obtenida podría indicar la presencia de carbohidratos asociados a la estructura proteica que normalmente afectan la migración electroforética y dan la característica microheterogeneidad de las enzimas similares a trombina<sup>5</sup>. Asimismo, los resultados por PAGE-SDS con el agente reductor sugieren que la proteína es monomérica.

La enzima posee una actividad coagulante sobre el fibrinógeno bovino y el plasma humano citratado, también muestra actividad amidolítica sobre amidas cromogénicas, como el BApNA (tabla 1), siendo este último un excelente sustrato para seguir su purificación o su cinética ya que la liberación de p-nitroanilina es fácilmente detectable a 405 nm y es un modelo sintético del enlace peptídico sobre el cual actuaría la enzima en el fibrinógeno plasmático teniendo como aminoácido principal, la arginina<sup>5,10</sup>.

Por otro lado, bilineatobina posee especificidad sobre los sustratos cromogénicos, ya que sólo atacaría los enlaces amida del BApNA; y no los enlaces éster etílico o metílico presentes en el BAEE y TAME, respectivamente (tabla 1); dicha especificidad es poco usual en las TLEs<sup>10</sup>. Asimismo, el hecho de encontrar mayor actividad coagulante sobre fibrinógeno bovino que sobre el plasma humano citratado (tabla 1) podría estar asociado al hecho de que este último debe contener cantidades no determinadas de heparina, la cual actuaría reduciendo la actividad enzimática, comportamiento también inusual para enzimas de este tipo<sup>5</sup>

**Tabla 2.** Efecto de diversos agentes químicos sobre la actividad de la enzima coagulante de *Bothrops bilineatus*

| Inhibidores                   | Concentración final | Actividad enzimática (%) |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Sin agente                    |                     | 100                      |
| EDTA                          | 1mM                 | 98,2                     |
| TLCK                          | 4mM                 | 107,8                    |
| Mercaptoetanol                | 20mM                | 103                      |
| Iodoacetato                   | 2mM                 | 107,8                    |
| Inhibidor de tripsina de soya | 20mg/ml             | 101,8                    |
| Hirudina                      | 3,33 U/ml           | 98,2                     |
| Antitrombina III              | 6,66 U/ml           | 101,8                    |
| PMSF                          | 4 mM                | 5,3                      |
| Heparina                      | 166,66 U/ml         | 34,1                     |
|                               | 33,33 U/ml          | 44,9                     |
|                               | 16,66 U/ml          | 63,5                     |
|                               | 3,33 U/ml           | 103                      |

La exposición de bilineatobina a la acción de los agentes quelantes como el EDTA y agentes reductores como el 2 $\beta$ -Mercaptoetanol y el yodoacetato (tabla 2), demuestra que la enzima no depende de iones metálicos ni de enlaces disulfuros transversales para actuar sobre el sustrato BApNA; por lo tanto, no se trataría de una metaloproteasa y que su actividad depende de la integridad estructural de la proteína. En cambio, el efecto inhibitorio del PMSF indica que la enzima es una serinoproteasa<sup>(3,4,5,10)</sup>. Por otra parte, la falta de inhibición con TLCK e inhibidor de tripsina de soya, sugiere que en el sitio activo de la enzima no es crucial la participación de los residuos de histidina, lo cual es típico en la estructura del sitio activo de las TLEs de veneno de serpientes por que ellas pertenecen a la familia génica tripsina/kalicleina<sup>4,5,10</sup>.

Es también interesante el hecho de que la enzima sea insensible al efecto de los inhibidores de la trombina como la antitrombina III y la hirudina, pero sí es afectada por la heparina, un inhibidor clásico de la trombina. Esta inhibición pone en evidencia que bilineatobina es una entidad proteica peculiar dentro de las TLEs y que funcionalmente actuaría como la trombina<sup>3,4,5,10</sup>. Si tenemos en cuenta que a lo largo de la evolución de las TLEs, ellas han logrado diferenciarse de la trombina, en este caso estaríamos frente a una proteína como bilineatobina más próxima a la principal proteína coagulante de los mamíferos, que es la trombina. Adicionalmente podemos señalar que la mayoría de las TLEs son muy termoestables y que mantienen hasta un 50% de estabilidad después del tratamiento a 90° C; en cambio, bilineatobina no muestra esta alta resistencia ya que se inactiva rápidamente después de los 60°C.

Las investigaciones realizadas con veneno de serpientes arborícolas muestran una gran versatilidad de sus componentes proteicos ya que en el caso de las mambas africanas del género *Dendroapsis* sus ponzoñas son neurotóxicas, en tanto que *Akgistrodon acutus*, la serpiente acuática de los 5 pasos, tiene un veneno altamente cardiotoxico<sup>11</sup>. Si consideramos que las aves son la principal fuente alimentaria de *Bothrops bilineatus* y que dichas presas son por lo menos 10 veces más rápidas que el ofidio, la ponzoña debe contener principios activos con un alto grado de eficacia para inmovilizar y matar a dichas presas. Bilineatobina sería uno de estos componentes cuyas características peculiares merecen ser estudiadas más ampliamente.

### CONCLUSIONES

- El veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* contiene una enzima similar a trombina, la cual es posible aislarla por combinación de dos pasos cromatográficos: de filtración e intercambio iónico.
- La enzima es una serinoproteasa monocatenaria de mediano peso molecular (45 kDa).
- La enzima es estable en un rango de pH de 7,5 a 8,5 con un pH óptimo de 7,5 y su actividad amidolítica se ve incrementada hasta los 40°C.
- La enzima tiene la capacidad de coagular el fibrinógeno y el plasma humano citratado y posee características peculiares con respecto a las enzimas similares a trombina.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este estudio agradecen a la Interatational Foundation for Science (IFS) de Suecia, institución que permitió la apertura de la línea sobre proteínas coagulantes de origen ofídico, apoyando investigaciones como la presente.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Ascencios, H. y Cutti, F. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." *Bol. Lima* 1995; 97, pp.91-96.
2. Stocker, K. Medical Use of snake venoms protein. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
3. Ouyang, C.; Teng, C. and Huang T. Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 1992; 30(9): 945-966.
4. Pirkle, H. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. *Thromb. haemost.* 1998; 79: 675-683.
5. Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 843-856.
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
7. Andrews, P. the gel filtration behavior of protein related to their molecular weight over a wide range. *Biochem Journal.* 1965. 91:595-606.
8. Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 95: 271-278.
9. Schwert, G. and Takenaka, Y. Aspect no photometric determination of tripsin and chymotripsin. *Biochem. Biophy, Acta.* 1965 16: 170.
10. Silva-Junior, F.; Guedes, H.; Garvey, C.; Aguiar, A.; Bourguignon S.; Di Cera, E. and Giovanni-De-Simone S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility *Toxicon* 2007; 50(1): 18-31.
11. Huang QQ, Teng MK, Niu LW. Purification and characterization of two fibrinogenclotting enzymes from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1999; 37(7):999-1013.

## EXTRACCIÓN CON SOLUCIONES NEUTRA Y ALCALINA PARA EL AISLAMIENTO DE FIBRA SOLUBLE E INSOLUBLE A PARTIR DE SALVADO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.), KIWICHA (*Amaranthus caudatus* L.) Y CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen.)

Carlos A. Ligarda Samanez<sup>1\*</sup>, Ritva Repo-Carrasco<sup>2</sup>, Christian R. Encina Zelada<sup>3</sup>, Iván Herrera Bernabé<sup>4</sup>, Zory Quinde-Axtell<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el contenido de fibra dietaria y sus componentes en 3 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), 3 variedades de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) y 3 variedades de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). Las siguientes variedades de cada grano andino fueron elegidas por su alto contenido de fibra dietaria soluble (FDS): quinua: variedad Salcedo INIA, cañihua: variedad Cupí y kiwicha: variedad Morocho. Estas variedades fueron molidas y tamizadas para obtener salvados ricos en fibra dietaria soluble e insoluble (FDI). Se probó dos métodos para aislar la fibra soluble e insoluble: método neutro y método alcalino. El método neutro consistió en solubilizar en agua las fracciones de FDS presentes en los salvados; posteriormente las fracciones solubles se purificaron por diversos procedimientos fisicoquímicos, luego de los cuales se realizó la operación de liofilización para la obtención de las fracciones ricas en FDS y FDI. Por otro lado, el método alcalino utilizó otro medio como disolvente para realizar el aislamiento de la FDS, como fue el reactivo de hidróxido de sodio al dos por ciento; los residuos de las fracciones de FDS y FDI fueron liofilizados. Una vez aisladas las fracciones ricas en FDI y FDS por los métodos neutro y alcalino, a partir de los salvados concentrados, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales; además, se determinó el rendimiento de ambos métodos de extracción de fibra. Finalmente, con los resultados que se obtuvo en esta investigación, se demostró que el método más adecuado para la extracción de las fracciones de FDI y FDS fue el que utiliza el procedimiento neutro.

**Palabras clave:** *Chenopodium quinoa* Willd, *Amaranthus caudatus* L. y *Chenopodium pallidicaule* Aellen, fibra dietaria total, método alcalino y neutro.

---

<sup>1\*</sup> Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional José María Arguedas, Jr. Constitución N° 409, Andahuaylas – Perú, carligarda@hotmail.com

<sup>2</sup> Dpto. de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

<sup>3</sup> Dpto. de Tecnología de Alimentos, Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

<sup>4</sup> Escuela de Industrias Alimentarias, Facultad de Ingeniería Química e Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque – Perú.

<sup>5</sup> Dpto. de Ingeniería Alimentos, Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

## NEUTRAL AND ALKALINE EXTRACTIONS METHODS FOR THE ISOLATION OF SOLUBLE AND INSOLUBLE FIBERS BRANS FROM QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.), KIWICHA (*Amaranthus caudatus* L.) AND CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen.)

### ABSTRACT

In the present research, characterization of the components of total dietary fiber of 3 varieties of quinoa (*Chenopodium quinoa*), 3 varieties of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) and 3 varieties of cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), was carried out. For further studies, the following varieties of each andean crop were chosen due to their high content of soluble dietary fiber quinoa: Salcedo INIA variety, kiwicha: Morocho variety and cañihua: Cupi variety. These cereals were processed by milling and sieving to obtain brans which were analyzed for their dietary fiber content and components. These operations allowed concentrating the soluble dietary fiber in the brans. The soluble and insoluble dietary fibers were isolated using two different methods: extraction with neutral solution and extraction with basic solution. The first method consisted in extracting with water the fractions of soluble dietary fiber of the brans. These fractions were purified by physicochemical methods and lyophilized to obtain fractions rich in soluble and insoluble dietary fiber. In the second method basic solution was used to obtain fractions rich in soluble and insoluble dietary fiber. Once the fractions rich in soluble and insoluble dietary fiber were prepared, physicochemical and techno functional properties of these fractions were evaluated. The yield of the two methods of extraction was calculated, as well. The results of this research demonstrated that the most adequate method of extraction of the dietary fiber fractions is the method which uses neutral solvents.

**Key words:** *Chenopodium quinoa* Willd, *Amaranthus caudatus* L. y *Chenopodium pallidicaule* Aellen, dietary fiber, neutral and alkaline methods.

### INTRODUCCIÓN

Los Andes son una zona de agricultura tradicional que puede ser considerada como un macro centro de conservación de la biodiversidad de los cultivos nativos. Los granos andinos forman parte del Perú y también de otros países sudamericanos. Son muy bien adaptados a las condiciones de los andes: altura, clima, suelo. Presentan una gran variabilidad en cuanto a tamaño, forma y colores de planta y grano. Podría elaborarse productos innovadores con estas materias primas. No obstante, hay pocos estudios que permiten el conocimiento del real potencial de estas variedades en cuanto a su aprovechamiento en la industria alimentaria.

La quinua es una planta de la familia *Chenopodiaceae*, género *Chenopodium*, sección *Chenopodia* y subsección *Cellulata*. El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia *Chenopodiaceae* y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies<sup>1</sup>.

La kiwicha es una planta (muy rústica) anual que alcanza gran desarrollo y elevada altura en los suelos fértiles, llegando en algunos casos hasta 2,6 metros. La semilla es circular vista por encima y lenticular vista de costado, de 1 a 1,5 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor, con un peso de 0,6 a 1 g por 100 semillas; generalmente tiene colores pálidos, pero el color puede variar desde blanco hueso a beige, café claro, rojo, pardo y negro<sup>2</sup>.

La kañiwa es una de las especies agrícolas menos estudiadas y en muchas oportunidades se la ha confundido con la quinua. No existen evidencias arqueológicas relacionadas con la kañiwa, de manera que no se puede saber desde qué tiempo data su cultivo. Sin embargo, el hecho de

que las plantas pierden gran parte del grano por dehiscencia, hace pensar que su proceso de domesticación no está aún concluido. Este cultivo parece estar muy relacionado con la cultura Tiahuanaco que estuvo asentada en el altiplano de Perú y Bolivia<sup>3</sup>.

La definición más ampliamente aceptada con fines analíticos es la que define la fibra dietaria (*dietary fiber*) o fibra alimentaria, considerando aspectos fisiológicos. La fibra consta de dos fracciones (insoluble y soluble en agua) y sus propiedades vendrán determinadas por los porcentajes de estas fracciones. La fibra insoluble es escasamente fermentada y tiene un marcado efecto laxante y regulador intestinal, mientras que la fibra soluble es fermentada en alta proporción y sus principales propiedades se relacionan con la disminución del colesterol y glucosa en la sangre y desarrollo de la flor intestinal<sup>4</sup>. Los métodos de análisis de la fibra dietética se pueden clasificar en 3 grupos: **métodos gravimétricos** (fibra bruta, fibra detergente ácida y fibra detergente neutra); **enzimático-gravimétricos** (fibra insoluble, soluble y total) y **químicos** (polisacáridos no-almidón)<sup>5</sup>. Otros métodos utilizan una proteasa, para acelerar el proceso hidrolítico y evitar la pérdida de compuestos ácidos-lábiles que supone la utilización de pepsina<sup>6</sup>.

La aplicación de la fibra dietética es importante en la dieta humana, existiendo dos posibilidades: aumentando su consumo, sin grandes cambios en los hábitos alimentarios y con productos elaborados tales como: alimentos enriquecidos, preparados dietéticos y farmacéuticos<sup>7</sup>.

Los objetivos de la presente investigación fueron el caracterizar proximalmente y determinar el contenido de fibra dietaria en tres variedades de quinua, tres de kiwicha y tres de cañihua; obtener salvados ricos en fibra dietaria soluble (FDS) e insoluble (FDI); probar dos métodos para aislar la fibra soluble e insoluble: método neutro y método alcalino; aislar las fracciones ricas en FDI y FDS por ambos métodos a partir de los salvados concentrados y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales y determinar el rendimiento de ambos métodos de extracción de fibra.

## PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron tres variedades de cada uno de los cultivos: quinua (Kancolla, Blanca de Juli y Salcedo INIA); kiwicha (Morocho, Centenario y Óscar Blanco), y cañihua (Cupi, Illpa y Ramis). Las muestras de quinua y cañihua provinieron del INIA de Puno, mientras que las muestras de kiwicha fueron colectadas del INIA de Ayacucho, teniendo una muestra representativa de 5 kg de cada una de las variedades indicadas. Se utilizaron materiales de vidrio como: bureta, Erlenmeyer, fiolas, placas petri, vasos de precipitado, además de otros equipos y reactivos de laboratorio recomendados para los análisis de los respectivos métodos. También se utilizaron *kits* de *Megazyme*<sup>®</sup> para la determinación de fibra dietaria total (FDT),  $\beta$ -glucanos, lignina Klason y almidón resistente.

### Obtención de salvados.

Con el objeto de eliminar materiales extraños se realizó la limpieza de los granos; posteriormente se realizó la desaponificación y secado de la quinua. Luego se molieron los granos en el equipo Brabender Quadrumat Jr<sup>®</sup>. Las fracciones de salvado obtenidas fueron posteriormente tamizadas (tamiz número 20) para mejorar el rendimiento de extracción del salvado. Se consideró salvado a todo aquello que tenía tamaños superiores a 250  $\mu$ m. Finalmente, las muestras se empacaron en bolsas de polietileno de alta densidad y se almacenaron convenientemente hasta su análisis.

### Extracción de fibra dietaria (método neutro)

Se pesaron los salvados que fueron previamente pulverizados en el molino Ciclotec<sup>®</sup>; posteriormente fueron mezclados con agua destilada. Centrifugándose la solución a una

velocidad de 1 500 x g por un tiempo de 15 minutos. Se repitió el procedimiento una vez más. Los sobrenadantes fueron colectados después de realizar la operación de centrifugación, usándose la parte líquida para el aislamiento posterior de la fracción de fibra soluble y los residuos usados para el aislamiento de la fracción de fibra insoluble.

Para el aislamiento de la fracción rica en fibra soluble, fue necesario precipitar las proteínas de la solución ajustándose el pH de las fracciones solubles (pH 4 para kiwicha y pH 5 para quinua y cañihua), usando para tal efecto soluciones de HCl o NaOH 1 N. Las soluciones que se obtuvieron se centrifugaron por un tiempo de 10 minutos a una velocidad de 1 500 x g, con la finalidad de separar los residuos de los sobrenadantes. El sobrenadante que se obtuvo fue liofilizado dando como resultado una fracción rica en fibra soluble. Se pesaron los residuos provenientes de la centrifugación anterior, y luego se procedió a realizar lavados sucesivos con agua destilada a través de los tamices con apertura de 106 µm para eliminar el almidón residual. Los materiales que se recuperaron de los tamices fueron fracciones ricas en fibra insoluble. Posteriormente, los residuos que se obtuvieron de los tamices se disolvieron nuevamente en agua para realizar la incubación con la enzima  $\alpha$ -amilasa (termamyl<sup>®</sup>, 50 µl/100 ml) a un pH de 6, por un tiempo de 30 minutos y una temperatura de 100 °C en baño de agua con agitación ocasional. Seguidamente se realizó la centrifugación de la mezcla por un tiempo de 10 minutos a una velocidad de 1 500 x g, los pellets resultantes; finalmente se liofilizaron lográndose obtener fracciones de fibra insoluble purificada.

#### **Extracción de fibra dietaria (método alcalino)**

Se molieron los salvados con la finalidad de uniformizar el tamaño de las partículas en el molino Ciclotec<sup>®</sup>. Posteriormente, éstos fueron desengrasados con acetona como solvente; a continuación, las muestras se secaron a temperatura medio ambiental. El almidón presente en el salvado molido fue digerido utilizando una solución de la enzima glucoamilasa a pH 4,8 por un tiempo de 24 horas; posteriormente el residuo fue recuperado por filtración (tamiz de 106 µm de abertura). Luego se lavó el residuo con agua destilada realizando este procedimiento cuatro veces con la finalidad de eliminar el almidón residual. El residuo, libre de almidón fue mezclado con un litro de reactivo (hidróxido de sodio al 2 por ciento con pH 14 a 20°C) y extraído a una temperatura de 60 °C por un tiempo de 4 horas de incubación (se decidió la elección de NaOH por ser el más económico en el mercado). El extracto que se obtuvo fue centrifugado, colectándose los sobrenadantes correspondientes a la parte líquida para el aislamiento posterior de la fracción de fibra soluble y los residuos fueron usados para el aislamiento de la fracción de fibra insoluble.

El sobrenadante fue neutralizado usando para tal efecto, soluciones de ácido acético o hidróxido de sodio 5 N; dicha operación se llevó a cabo con la finalidad de precipitar algunas proteínas y contribuir así a la purificación de la fracción final. La solución neutralizada fue tratada con el reactivo de ácido tricloroacético, llevando la concentración final del sobrenadante a siete por ciento (no se realizó la diálisis por falta de membranas en el mercado nacional y por ser bastante costosas). El extracto que se obtuvo fue agitado con cuatro volúmenes de etanol al 95%, almacenándose esta solución toda una noche con la finalidad de precipitar la fracción de fibra dietaria soluble. El precipitado fue colectado por centrifugación y liofilizado finalmente para la obtención de las fracciones ricas en fibra dietaria soluble. Los residuos resultantes de la primera centrifugación fueron liofilizados, lográndose obtener una fracción rica en fibra insoluble.

#### **Métodos de análisis.**

Se determinó la composición proximal<sup>8</sup>, fibra dietaria total, soluble e insoluble<sup>8</sup>,  $\beta$ -glucanos<sup>8</sup>, almidón resistente<sup>9</sup>, celulosa<sup>10</sup>, lignina de Klason<sup>8</sup>, pentosanos<sup>11</sup>, capacidad de absorción de agua<sup>12</sup>, capacidad de retención de agua<sup>13</sup> y la capacidad de absorción de muestra orgánica<sup>12</sup>. La

viscosidad de las soluciones de fibra soluble al 3 por ciento (w/v); se midió con un viscosímetro rotacional Brookfield® DV-III HB hechas a temperatura estable de 24 °C.

### Análisis estadístico.

Todos los análisis se determinaron por triplicado, expresando los resultados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico se empleó el diseño completamente al azar (DCA), para evaluar el efecto de la variedad del grano andino, así como del tipo de método de extracción de fibra, sobre las propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de las fibras aisladas, además de su rendimiento, considerándose un nivel de significancia del noventa y cinco por ciento, se aplicó al ser significativo el análisis anterior la prueba de comparación de medias de HSD de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico *Statgraphics 5.1*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición de granos enteros

Las variedades de cañihua presentaron el contenido de proteína más alto, seguido por las variedades de kiwicha y quinua (tabla 1). La cañihua, kiwicha y quinua tienen contenidos de lípidos similares; un bajo contenido de grasa fue observado en la quinua Salcedo INIA. Los contenidos de ceniza fueron altos en los granos de cañihua observándose que los mismos en kiwicha y quinua son parecidos. Estos granos andinos tienen contenidos relativamente altos de minerales como el hierro, calcio y magnesio comparados con otros granos<sup>14,15</sup>.

**Tabla 1.** Rangos de la composición proximal de las diferentes variedades de granos andinos (g / 100 g materia seca) evaluados

| Grano andino | Proteína (%) | Lípidos (%) | Cenizas (%) |
|--------------|--------------|-------------|-------------|
| quinua       | 11,7 – 12,2  | 5,6 – 6,7   | 2,2 – 2,6   |
| kiwicha      | 13,2 – 15,2  | 6,1 – 8,0   | 2,2 – 2,3   |
| cañihua      | 15,6 – 17,0  | 6,8 – 8,2   | 3,6 – 4,0   |

La tabla 2 muestra los valores de FDT en quinua, kiwicha y cañihua. La cañihua presentó altos contenidos de FDT seguido de la kiwicha y la quinua que tienen un contenido similar. Los granos de cañihua tienen alto contenido de FDI seguido de los granos de kiwicha y quinua que son bajos en FDI y altos en FDS. Los granos de cañihua presentan mayor contenido de FDS en comparación con los granos de kiwicha.

**Tabla 2.** Rangos de contenido de fibra dietaria de las diferentes variedades de granos andinos (g / 100 g materia seca) evaluados

| Grano andino | Fibra soluble (%) | Fibra insoluble (%) | Fibra dietaria total (%) |
|--------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| quinua       | 3,2 – 5,3         | 6,1 – 7,4           | 10,4 – 11,5              |
| kiwicha      | 1,9 – 2,4         | 8,5 – 9,3           | 10,9 – 11,3              |
| cañihua      | 2,3 – 4,1         | 15,6 – 18,7         | 18,7 – 21,9              |

El contenido de  $\beta$ -glucanos en los granos andinos es muy bajo. Los cultivos de kiwicha presentan mayores contenidos que las variedades de quinua y cañihua (tabla 3). El contenido de pentosanos fue alto en los granos de kiwicha y menor en los granos de quinua y cañihua.

**Tabla 3.** Rangos de componentes de la fibra soluble de las diferentes variedades de granos andinos (g / 100 g materia seca) evaluados

| Grano andino | Pentosanos (%) | $\beta$ -glucanos (%) |
|--------------|----------------|-----------------------|
| quinua       | 1,8 – 2,0      | 0,09 – 0,10           |
| kiwicha      | 0,8 – 1,1      | 0,63 – 0,97           |
| cañihua      | 0,2 – 1,1      | 0,04 – 0,11           |

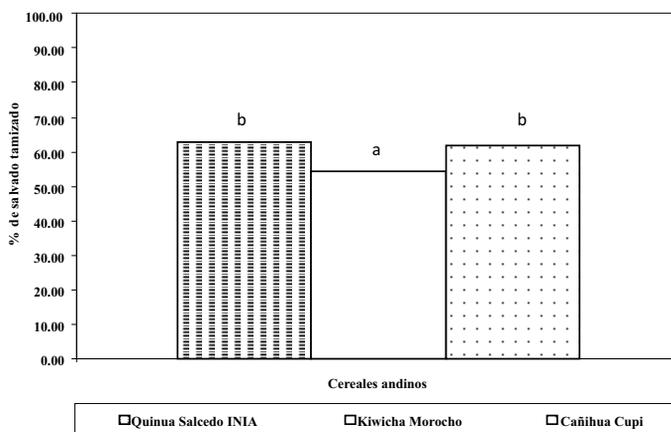
La celulosa, lignina Klason y almidón resistente fueron altos en cañihua seguido de las variedades de quinua y kiwicha (tabla 4). Los granos de quinua y kiwicha tienen contenidos similares de celulosa y lignina Klason. Los granos andinos, en general, presentan bajos contenidos de almidón resistente. La lignina Klason (obtenida por solubilización de los polisacáridos de la pared celular con  $H_2SO_4$ ) tiene propiedades fisicoquímicas diferentes a las ligninas solubles como la lignina dioxano clorhídrico.

**Tabla 4.** Rangos de componentes de la fibra insoluble en las variedades de granos andinos (g / 100 g materia seca) evaluados

| grano andino | Almidón resistente (%) | Celulosa (%) | Lignina Klason (%) |
|--------------|------------------------|--------------|--------------------|
| quinua       | 0,20 – 0,33            | 3,0 – 4,4    | 2,7 – 4,3          |
| kiwicha      | 0,10 – 0,12            | 3,3 – 4,5    | 3,3 – 4,4          |
| cañihua      | 0,24 – 0,34            | 6,2 – 9,6    | 6,0 – 9,6          |

### Molienda y tamizado de granos

Los granos de quinua, kiwicha y cañihua se molieron con humedades de entre 8 y 11%; posteriormente se realizó la operación de tamizado, que sirvió para concentrar más la fracción de salvado, notándose que los mayores rendimientos de extracción se presentaron en los granos de quinua y cañihua, como puede apreciarse en la figura 1.

**Figura 1.** Rendimientos de salvado después de molienda y tamizado.

### Composición de las fracciones de salvado

En la figura 2 puede apreciarse que la variedad de cañihua Cupi, presentó mayores contenidos de fibra dietaria total (soluble e insoluble), seguida de las muestras de quinua Salcedo INIA y kiwicha Morocho. En lo que concierne a contenido de almidón soluble la muestra de kiwicha presentó el máximo valor seguido de la quinua y la cañihua.

En la figura 3, se muestran los componentes de la FDS como son los  $\beta$ -glucanos y pentosanos presentan sus mayores contenidos en el caso de los primeros en la quinua Salcedo INIA y en los segundos es apreciable la mayor cantidad en la cañihua cupi. En lo que respecta a los componentes de la FDI puede apreciarse que la celulosa se encuentra en mayor porcentaje en la cañihua en el caso de la lignina Klason el máximo valor se encuentra en la quinua y el almidón resistente es bajo en los tres salvados.

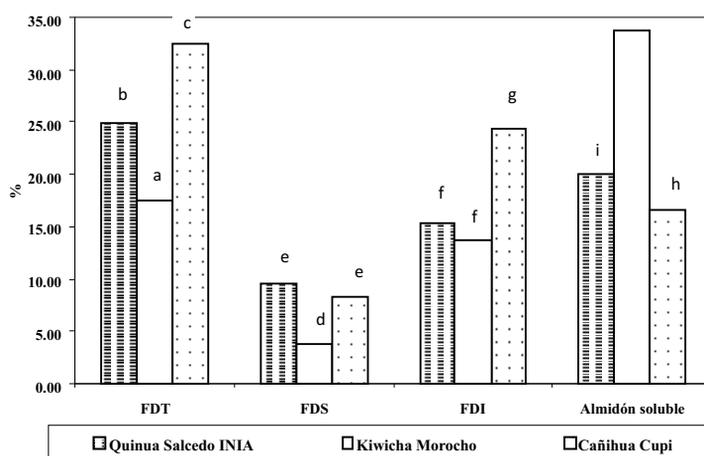


Figura 2. Contenido de FDT, FDI, FDS y almidón soluble en los salvados seleccionados.

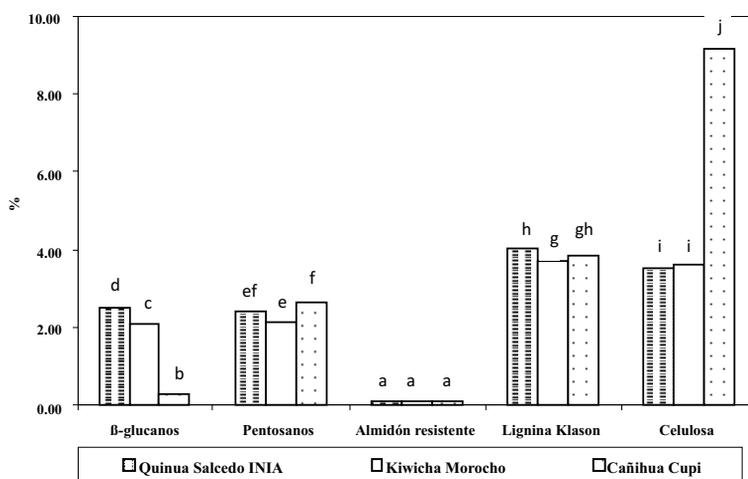
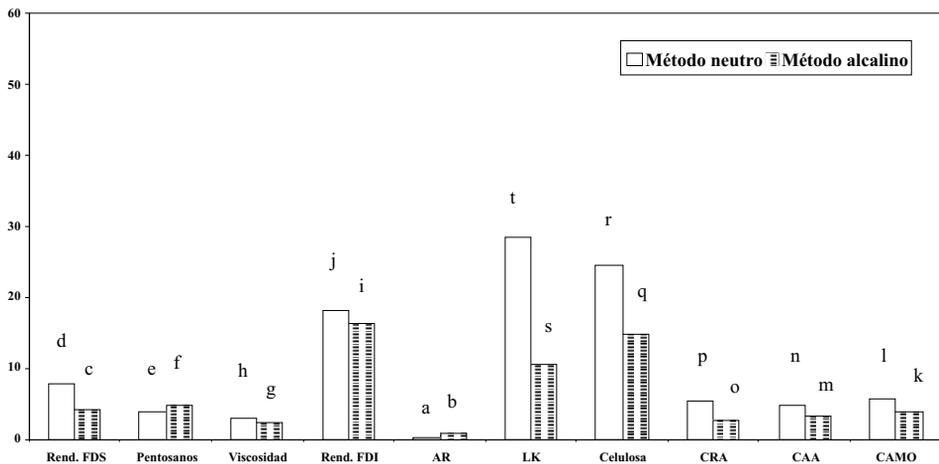


Figura 3. Contenido de los componentes de la FDT.

### Aislamiento de fibra soluble e insoluble (métodos neutro y alcalino)

En esta investigación se evaluaron dos métodos de aislamiento, utilizando soluciones neutras y alcalinas<sup>16,17</sup>; a partir de los granos andinos con mayor contenido de fibra soluble que fueron seleccionados (Salcedo INIA, Morocho y Cupi).

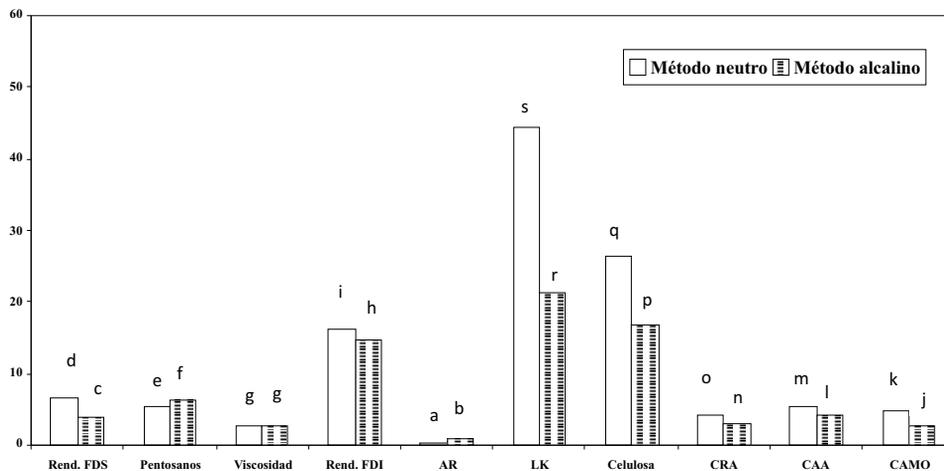
Se puede apreciar en las figuras 4, 5 y 6 que el método neutro resultó con mayores rendimientos de la fracción soluble aislada en comparación con el método alcalino en los tres cultivos andinos seleccionados. En lo que respecta al contenido de pentosanos, componentes que forman parte de la fibra dietaria soluble, se puede observar también que se obtuvieron valores de 4,85; 6,21 y 10,86 g/ 100 g materia seca en la fracción soluble alcalina en quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi.



Rend. FDS: rendimiento de fibra dietaria soluble (%).  
 Pentosanos: contenido de pensona en la muestra (%).  
 Viscosidad: viscosidad de la muestra medida en cpoise.  
 Rend. FDI: rendimiento de fibra dietaria insoluble (%).  
 AR: azúcares reductores.

LK: Lignina Klason.  
 Celulosa: contenido de celulosa.  
 CRA: Capacidad de retención de agua.  
 CAA: Capapacidad de absorción de agua.  
 CAMO: capacidad de absorción de muestra organica

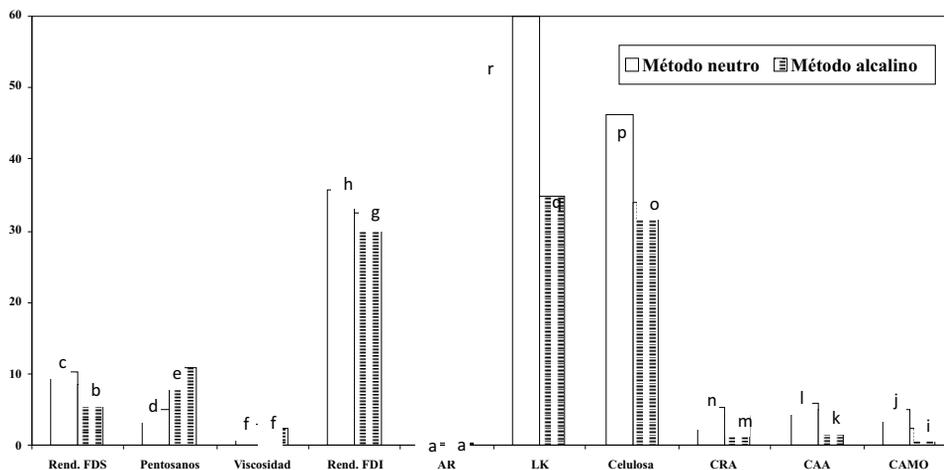
**Figura 4.** Comparación de resultados; métodos neutro y alcalino en quinua Salcedo INIA



Rend. FDS: rendimiento de fibra dietaria soluble (%).  
 Pentosanos: contenido de pensonas en la muestra (%).  
 Viscosidad: viscosidad de la muestra medida en cpoise.  
 Rend. FDI: rendimiento de fibra dietaria insoluble (%).  
 AR: azucares reductores.

LK: Lignina Klason.  
 Celulosa: contenido de celulosa.  
 CRA: Capacidad de retención de agua.  
 CAA: Capapcidad de absorción de agua.  
 CAMO: capacidad de absorción de muestra organica.

**Figura 5.** Comparación de resultados; métodos neutro y alcalino en kiwicha Morocho.



Rend. FDS: rendimiento de fibra dietaria soluble (%).  
 Pentosanos: contenido de pensonas en la muestra (%).  
 Viscosidad: viscosidad de la muestra medida en cpoise.  
 Rend. FDI: rendimiento de fibra dietaria insoluble (%).  
 AR: azucares reductores.

LK: Lignina Klason.  
 Celulosa: contenido de celulosa.  
 CRA: Capacidad de retención de agua.  
 CAA: Capapcidad de absorción de agua.  
 CAMO: capacidad de absorción de muestra organica.

**Figura 6.** Comparación de resultados; métodos neutro y alcalino en cañihua Cupi

Los valores de pentosanos resultaron mayores a los que se obtuvieron en las fracciones solubles neutras para quinua, kiwicha y cañihua fueron de 3,83; 5,16 y 5,23 g/ 100 g materia seca, respectivamente. La viscosidad de las soluciones de fibra soluble al tres por ciento (peso/volumen); fueron medidas con un viscosímetro rotacional Brookfield® a temperatura de 24 °C; en dicho procedimiento se observó que las fibras solubles aisladas por el método neutro presentaron mayores viscosidades (2,89; 2,71 y 2,88 m<sup>-1</sup> kg s<sup>-1</sup>) en comparación de las viscosidades de las fracciones de fibra soluble aisladas por el método alcalino (2,48; 2,69 y 2,38 m<sup>-1</sup> kg s<sup>-1</sup>). Los resultados fueron obtenidos en los dos casos a partir de las variedades seleccionadas previamente (Salcedo INIA, Morocho y Cupi). La diferencia de viscosidades entre las soluciones de todas las fracciones de fibra soluble fue mínima y ésta varió entre 2,38 a 2,89 m<sup>-1</sup> kg s<sup>-1</sup>.

La comparación de rendimientos de la fracción insoluble entre los dos métodos de aislamiento de fibras puede apreciarse también en las figuras 4, 5 y 6, notándose que se obtienen mayores rendimientos utilizando el método neutro (18,15; 16,20 y 35,71 g fracción insoluble/100 g salvado) en comparación con el método alcalino que presenta valores de (16,45; 14,82 y 32,55 g fracción insoluble seca/100 g salvado), para los salvados seleccionados de las variedades quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi, en las figuras mencionadas se muestran también los valores de almidón resistente (AR) que se cuantificaron en las fracciones insolubles aisladas por ambos métodos (neutro y alcalino).

Se puede apreciar también que los mayores contenidos de este constituyente se presentan en el método alcalino (0,70; 0,83 y 0,44 g/g materia seca) y menores valores en el método neutro (0,10; 0,13 y 0,42 g/g materia seca) para quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi respectivamente, notándose en ambos casos que la presencia de este componente en los cereales andinos es mínima, tanto en las fracciones aisladas como en los granos enteros y salvados que se caracterizaron previamente. Además puede apreciarse que, para el caso del componente denominado lignina Klason, el método que permitió obtener mayores contenidos en este constituyente fue el del procedimiento alcalino con un contenido de 28,48; 44,29 y 59,86 g/ 100 g para las muestras de quinua, kiwicha y cañihua respectivamente, observándose también que con la utilización del protocolo neutro se obtuvieron valores menores (10,44; 21,19 y 34,71 g/ 100 g) para los mismos granos andinos.

La celulosa fue otro constituyente sujeto de análisis en la fracción insoluble que se aisló, por los dos métodos; para este componente se reportan resultados en los cereales andinos seleccionados (quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi). Con valores de 24,48; 26,4 y 46,13 g/100 g y 14,95; 16,74 y 33,98 g/100 g para los métodos neutro y alcalino, respectivamente. Observándose que los que presentaron mayores contenidos de celulosa, fueron los granos andinos de los cuales se aisló la fracción insoluble por el método neutro.

En lo que respecta a la capacidad de retención de agua (CRA), correspondiente a las fracciones insolubles aisladas, obtenidos por ambos métodos (neutro y alcalino), a partir de los salvados de cereales andinos seleccionados (Salcedo INIA, Morocho y Cupi), se puede observar que las muestras que presentaron mayores valores de CRA corresponden a las muestras obtenidas por el método neutro (5,23; 4,20 y 5,31 g agua/g sólido), respectivamente.

Los valores obtenidos para CRA en el método alcalino fueron de 2,49; 3,04 y 4,28 g agua/g sólido, para quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi. El lector puede corroborar esta afirmación en las figuras 4, 5 y 6 en las que dichos resultados resultan menores que los obtenidos en el método neutro.

Las muestras que presentan mayores valores de capacidad de absorción de agua (CAA) corresponden a las muestras obtenidas por el método neutro (4,70; 5,28 y 5,23 g agua/g sólido)

para quinua, kiwicha y cañihua, respectivamente. Pudo apreciarse también que las fracciones insolubles aisladas por el método neutro, son las que presentan mayores capacidades de absorción de muestra orgánica (CAMO), con valores de 5,83; 4,81 y 4,95 g agua/g sólido.

### CONCLUSIONES

- Entre los componentes de las variedades de los cereales andinos estudiados en granos enteros (quinua, kiwicha y cañihua) destaca su contenido en fibra dietaria total (FDT), la que varió entre 9,29 y 20,04 por ciento, componente conformado por la fibra dietaria insoluble (FDI) y fibra dietaria soluble (FDS). Las variedades de quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi fueron las que presentaron mayores contenidos de FDS en grano entero (4,68; 2,13 y 3,79 g/100 g), respectivamente, en comparación con las otras variedades de cada grano andino que se estudió.
- Con la realización de las operaciones de molienda y tamizado se logró concentrar las fracciones de FDT, FDI y FDS en los salvados de las variedades seleccionadas de granos andinos: quinua (Salcedo INIA), kiwicha (Morocho) y cañihua (Cupi). Las fracciones insolubles obtenidas por ambos métodos presentan un elevado contenido en FDT, especialmente FDI y los componentes que a esta constituyen (lignina y celulosa).
- Con respecto al almidón resistente se demostró que los cereales andinos son deficitarios en este componente. Un elevado contenido de pentosanos se logra obtener en las fracciones solubles aisladas por los dos métodos; sin embargo se obtuvieron residuales de FDS en las fracciones insolubles.
- La viscosidad de las muestras obtenidas por ambos métodos no presenta diferencias significativas. La fracción insoluble aislada por el método neutro presentó mejores propiedades tecnofuncionales (CRA, CAA y CAMO).
- El método neutro resultó ser más apropiado que el método alcalino, para el aislamiento de las fracciones de fibra soluble e insoluble a partir de los salvados obtenidos de los cereales andinos seleccionados (quinua Salcedo INIA, kiwicha Morocho y cañihua Cupi).

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONCYTEC por el financiamiento, a nuestros familiares por el apoyo y comprensión y a la Sociedad Química del Perú.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Giusti K. El género *Chenopodium* en la Argentina. I. Número de cromosomas. *Darwiniana*. 16: 98-105. 1970.
2. Sauer JD. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann Mo Bot Gard*. 54: 103-137. 1976.
3. Ortega LM. Usos y valor nutritivo de los cultivos andinos. INIA. PICA. Puno, Perú. 23-120. 1992.
4. Saura-Calixto F. Fibra dietética: un nuevo concepto en nutrición. *Fronteras de la Ciencia y la Tecnología*. 7: 29-31. 1995.
5. García M, Serna N, García J. Análisis de la fibra alimentaria y sus fracciones por el método de Englyst. *Rev. Alimentaria*. 45-50. 1995.
6. Hernández T, Hernández A, Martínez, C. Fibra alimentaria. Concepto, propiedades y métodos de análisis. *Alimentaria*. Abril. 19-30. 1995.

7. Redondo A, Ordoñez J. Fibra alimentaria: propiedades e interés nutricional. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Enero-Febrero: 77-86. 1996.
8. A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists) 1995. Official Methods of Analysis. Washington D.C.
9. A.A.C.C. 1995. Method 32-40 Determinación de almidón Resistente. 9<sup>th</sup> Edition. USA
10. Van Soest PJ, Wine RH. Determination of lignina and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 51: 780-785. 1968.
11. Douglas SG. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour. *Food Chemistry* 7:139-145. 1980.
12. Tamayo Y, Bermúdez A. Los residuos vegetales de la industria de jugo de naranja como fuente de fibra dietética. *Temas de tecnología de alimentos*. Lajolo, F. y wenzel, E. Vol.2 CYTED. Sao Paulo. 1998.
13. Robertson J, Eastwood M, Yeoman M. An investigation into the physical properties of fibre prepared from several carrot varieties at different stages of development. *J. Sci. Food. Agric.* 31: 633-638. 1980.
14. De Bruin A. Investigation of the food value of quinoa and canihua seed. *J. Food Sci.* 29:872-876. 1964.
15. Tapia ME. Cultivos Andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. 2a edición. FAO. Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 1997.
16. Dalgetty D, Baik B. Isolation and characterization of Cotyledon fibers from Peas, Lentils, and Chickpeas. *Cereal Chemistry*. 80(3):310-315. 2003.
17. AOE S, Oda T, Tatsumi K, Yamauchi M. Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. *Cereal Chemistry*. 70(4):423-425. 1993.

### **Fe de erratas**

Por un error de impresión, en la página 282 del N°4 - 2011, la figura 8 lleva una leyenda equivocada:

**Dice:** Variación de los ácidos grasos en cada órgano de *C. bicolor*

**Debe decir:** “Variación de los ácidos grasos en cada uno de los órganos de las cuatro especies de Philodendron”

## INFORMACIONES

### A. De la Sociedad Química del Perú

Conferencias de los “Jueves Científicos” y otras

- “Uso del lector de micropozos en sondeos de inocuidad en alimentos”, dictada por Patricia Glorio Paulet, Ph.D, el día jueves 19 de enero del 2012.
- “Péptidos antimicrobianos”, dictada por el Q.F. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz, el día jueves 26 de enero del 2012.
- “Didáctica en Química”, dictada por la Ing. Químico Ana María Osorio Anaya, el día 10 de febrero del 2012.
- “Calentamiento global mediante el enfoque de la Química Ambiental”, dictada por el M.Sc. Quím. Alberto Corzo Lucioni, el día jueves 16 de febrero del 2012.
- “Proyectos de investigación de la unidad de investigación en productos naturales- Universidad Peruana Cayetano Heredia”, dictada por la Dra. Rosario Rojas Durán, el día jueves 23 de febrero del 2012.
- “Celdas solares sensibilizadas con colorante”, dictada por Mikhail Gorlov, el día 6 de marzo del 2012.

### I Curso de Didáctica en Tópicos Selectos de Química

Se inauguró el sábado 18 de febrero. Este curso consta de 11 módulos y sus respectivos talleres, con un total de 110 horas académicas, realizado en el Auditorio de la Sociedad Química del Perú y se clausurará el sábado 5 de mayo del 2012. Tiene como objetivo principal apoyar la labor del profesor en la enseñanza–aprendizaje de la Química, con la finalidad incentivar el interés en los alumnos através de un enfoque dinámico de planteamientos y desarrollo de ejercicios de aplicación.

### I Simposio Peruano de Nanotecnología

A realizarse el 27, 28 y 29 de junio del 2012, en el que se brindará conferencias y exposiciones orales, con la finalidad de propiciar un encuentro de profesionales, docentes universitarios y estudiantes de Química, Física, Ingeniería Química, Electrónica y áreas afines, de la entidad privada e instituciones académicas y científicas. Participarán destacados investigadores del ámbito académico, para intercambiar experiencias bajo la perspectiva del desarrollo de la Nanotecnología en el país.

Se van a desarrollar las siguientes secciones:

1. Métodos de síntesis de nanopartículas.
2. Modelamiento de nanopartículas por computadora.
3. Técnicas de caracterización de nanomateriales.
4. Nanomateriales: producción y recuperación de energía.
5. Nanomateriales y medio ambiente.
6. Nanoelectrónica: tratamiento de la información y comunicación.
7. Nanobiotecnologías: salud y medicina.

## **XXVI Congreso Peruano de Química**

Evento organizado por la Sociedad Química del Perú, con la colaboración de la Facultad de Ciencias Naturales y Formales de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa. Durante este Congreso se llevará cabo conferencias, mesas redondas, exposición de trabajos de investigación y cursos que estarán a cargo de especialistas de diferentes países, los que versarán sobre temas de gran importancia nacional e internacional.

El Congreso se llevará a cabo del 17 al 19 de octubre del presente año, en la ciudad de Arequipa, declarada “Patrimonio Cultural de la Humanidad” por la Unesco.



### **Comité Organizador:**

#### **Central (Lima)**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Presidente                | : Ing. Manuel Eduardo Otiniano Cáceres |
| Secretario Ejecutivo      | : Dra. Ana María Muñoz Jáuregui        |
| Director Científico       | : Q.F. Nora Gabriela Herrera Hernández |
| Tesorero                  | : Ing. Ana María Osorio Anaya          |
| Director de Publicaciones | : Ing. Ana María Medina Escudero       |
| Vocales                   | : Qmco. Neptali Ale Borja              |
|                           | : Qmca. Milagros Tincopa Cuadros       |

#### **Sede (Arequipa)**

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Vicepresidente                                 | : Dra. Teresa Cano de Terrones        |
| Secretario                                     | : Dr. Juan Andrés Lopa Bolívar        |
| Director de Organización                       | : Dra. Luz Aurora Fernández Fernández |
| Director de Relaciones<br>Públicas y Protocolo | : Mg. Miriam Bernal Todco             |
| Vocales  | : Lic. Félix Cuadros Pinto            |
|  | : Mg. Lino Morales Paredes            |

## **B. Otras informaciones**

### **"Premio Medalla de Oro Hipólito Unanue"**

El pasado mes de diciembre del 2011, el Dr. José Amiel Pérez, actual miembro del Consejo Directivo de nuestra Institución, obtuvo la Mención Honrosa al mejor trabajo de investigación en la Ceremonia del "Premio Hipólito Unanue 2011", convocada por la Fundación Instituto Hipólito Unanue. Esta distinción, tiene el propósito de reconocer y enaltecer los méritos intelectuales, éticos, culturales, científicos y humanísticos de los profesionales de las ciencias médicas (medicina, cirugía, farmacia y bioquímica, y odontología), quienes a través de su actividad han destacado por su meritoria labor a favor de la profesión que ejercen, así como en su proyección social en bien de la comunidad y del país.

### **Seminario taller: "Energía sostenible para todos. Promoviendo la investigación"**

Evento organizado por la ONU, MILSET AMLAT, CONAFU, UGELs N° 02 – 03- 04 Lima Metropolitana, UNFV, UNALM, UNMSM, Con Ciencia, UPAEP – México y UNID – Perú, que se llevó a cabo del 12 de enero al 28 de febrero del 2012, con una duración de 8 semanas en la Universidad Nacional Federico Villarreal. Este evento se enmarcó en el eje internacional 2012 propuesto por la Asamblea General de la ONU, con el objetivo de concientizar sobre la necesidad de una educación eficaz en la importancia de la energía para el desarrollo sostenible.

### **Agenda Química Virtual (AQV)**

El Dr. Juan José León Cam, Past Presidente de la Sociedad Química, presidió el Comité Coordinador del Departamento de Química de la UNALM. Estuvo encargado de la publicación de la "Agenda Química Virtual, difundida durante todo el año 2011, con la finalidad de brindar información relacionada a la Química, con motivo de la celebraciones del "Año Internacional de la Química"..



Edición gráfica:  
**ESERGRAF**  
Jr. Tarma 115 - Lima  
Telf.: 998-513-545 / 433-1908  
[mig5548@yahoo.com](mailto:mig5548@yahoo.com)

# **SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

## **SOCIOS HONORARIOS**

Dr. Mario J. Molina (México)  
Dra. Olga Lock Sing (Perú)  
Dr. Antonio Monge Vega (España)  
Dr. Lothar Beyer (Alemania)

## **SOCIOS CORRESPONDIENTES**

Dr. Aiache, Jean-Marc (Francia)  
Dr. Cea Olivares, Raymundo (México)  
Dr. Chifa, Carlos (Argentina)  
Dra. Cascales Angosto, María (España)  
Dr. Del Castillo García, Benito (España)  
Dr. De Simone, Francesco (Italia)  
Dr. Garbarino, Juan A. (Chile)  
Dr. García-Herbosa, Gabriel (España)  
Dr. Infante, Gabriel A. (Puerto Rico)  
Dr. Joseph-Nathan, Pedro (México)  
Dr. Mors, Walter B. (Brasil)  
Dr. San Feliciano, Arturo (España)  
Dr. Suwalski, Mario (Chile)  
Dr. Vicente Pérez, Santiago (España)



# XXVI Congreso Peruano de Química

17, 18 y 19 de octubre del 2012

Lugar:

**Universidad Nacional  
San Agustín, Arequipa**