



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

---

**Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-UHPLC**

---

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyectos de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Tema que forma parte de los proyectos de investigación “Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de Amaranto y Quinoa para la elaboración de un alimento funcional” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Técnica de Ambato y "Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana" perteneciente a la RED de CEREALES de la Red Ecuatoriana de Universidades (REDU)".

**Autora:** María Alexandra Quinga Paucar

**Tutora:** Mg.Cecilia Mercedes Carpio

**AMBATO – ECUADOR**

**Octubre - 2017**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Mg. Cecilia Mercedes Carpio**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 19 de julio de 2017

A handwritten signature in blue ink, reading "Cecilia Carpio", is written over a horizontal line.

Mg. Cecilia Mercedes Carpio

C.I. 170462765-0

**TUTORA**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo María Alexandra Quinga Paucar, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



María Alexandra Quinga Paucar


CI.171999871-6

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores aprueban el presente trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato


Para constancia, firman:



Presidente de tribunal



Ph. D. Mayra Liliana Paredes Escobar  
CI. 050187395-4



Ph. D. Milton Rubén Ramos Moya  
CI. 180111963-5

Ambato, 23 de agosto de 2017

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.



---

María Alexandra Quinga Paucar

CI. 171999871-6

**AUTORA**

## DEDICATORIA

*Lo que la mente puede concebir y creer, y el corazón desear, puedes conseguirlo. -*

*Norman Vincent Peale.*

*Este trabajo está dedicado con mucho amor para mis padres Amelia y César, les agradezco por todo el apoyo durante mi formación, he visualizado su esfuerzo constante. GRACIAS padres son un ejemplo en mi vida.*

*A mis hermanos, Paola gracias por tu apoyo y consejos me ayudaron a encaminarme cuando falle, Alex y mi pequeño Mateo gracias por su chispa, su energía, sus ocurrencias que fueron mi inspiración y el motor para no desmayar a pesar de la distancia.*

*A mi amigo, confidente y complemento de vida Fernando tu apoyo desde el primer día que emprendí este sueño fue incondicional llenándome de confianza y seguridad, le agradezco a Dios por haberte puesto en mi camino.*

*ALEXA Q.P.*

## AGRADECIMIENTO

*A mi director de proyecto Doc. Ismael Carrillo que me dio la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación.*

*A mi tutora Mg. Cecilia Carpio quien con su ayuda desinteresada me brindó sus conocimientos y tiempo. Le agradezco también por siempre estar abierta y ayudarme con una solución oportuna para la culminación de este trabajo.*

*A la Doc. Dayana Morales quien me brindo sus conocimientos en temas específicos que fueron claves para la culminación de este trabajo.*

*A todos mis maestros de la FCIAL por los conocimientos impartidos a lo largo de mi carrera.*

*Agradezco a la Universidad Particular de Loja por proveer la materia prima para la realización de esta investigación.*

*A mis amigos Luis A., Estefanía V., Fernanda A. con quienes llegamos a pasar tantos momentos de alegrías, tristezas y ocurrencias que me permitieron conocerlos y saber que en ustedes puedo confiar.*

*A mis Ladys Irina G., Ana P., Glenda P., Yosmahara P., Fernanda S., Jessica G., Katerin T. Tatiana P., con todas tengo tan buenos recuerdos y las aprecio tanto por la esencia que las identifica.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

1.1.	TEMA DE INVESTIGACIÓN .....	1
1.2.	JUSTIFICACIÓN .....	1
1.3.	OBJETIVOS .....	3
1.3.1.	Objetivo General .....	3
1.3.2.	Objetivos Específicos.....	3
2.1.	ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS .....	4
2.2.	HIPÓTESIS.....	6
2.3.	SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS .....	7
3.1.	MATERIALES .....	8
3.1.1.	Materia prima .....	8
3.1.2.	Reactivos.....	8
3.1.3.	Equipos .....	9
3.1.4.	Insumos y utensilios.....	10
3.2.	MÉTODOS .....	11
3.2.1.	Obtención de harina de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	11
3.2.2.	Análisis proximal de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	12
3.2.3.	Obtención de concentrados proteicos.....	12
3.2.4.	Determinación de los rendimientos de extracción proteica .....	14
3.2.5.	Cuantificación de proteína mediante el método de Dumas.....	14
3.2.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	15
3.2.7.	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC) de los concentrados proteicos .....	17
3.2.8.	Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	17
3.2.8.1.	Fase gástrica.....	17
3.2.8.2.	Fase duodenal.....	17



3.2.9.	Determinación del contenido de polifenoles de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> )	18
3.2.10.	Análisis de la actividad antioxidante (Método TBARS).....	18
4.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	20
4.1.1.	Análisis proximal de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ).....	20
4.1.2.	Determinación de los rendimientos de extracción proteica .....	22
4.1.3.	Cuantificación proteica mediante el método de Dumas.....	23
4.1.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	24
4.1.5.	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC) de los concentrados proteicos .....	28
4.1.6.	Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	33
4.1.7.	Determinación del contenido de polifenoles de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> )	38
4.1.8.	Análisis de la actividad antioxidante (Método TBARS).....	39
4.2.	Verificación de la hipótesis.....	40
5.1.	CONCLUSIONES .....	41
5.2.	RECOMENDACIONES.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Métodos de análisis para humedad, cenizas y grasa de la harina de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	12
<b>Tabla 2.</b> Métodos de análisis para fibra cruda y proteína de la harina de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	12
<b>Tabla 3.</b> Preparación de los geles separador y concentrador.....	15
<b>Tabla 4.</b> Contenido de humedad, cenizas y grasa de las harinas de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	20
<b>Tabla 5.</b> Contenido de proteína, fibra cruda y carbohidratos totales de las harinas de Firiguero ( <i>Vigna unguiculata L.</i> ) .....	22
<b>Tabla 6.</b> Análisis de humedad de la harina de Firiguero .....	48
<b>Tabla 7.</b> Análisis de cenizas de la harina de Firiguero .....	48
<b>Tabla 8.</b> Análisis de grasa de la harina de Firiguero .....	48
<b>Tabla 9.</b> Rendimientos de la extracción proteica de Firiguero.....	50
<b>Tabla 10.</b> Datos de pesos de la materia prima y del liofilizado y de los rendimientos de extracción de proteína obtenidos para los cinco pHs de precipitación.....	50
<b>Tabla 11.</b> Análisis de la varianza .....	52
<b>Tabla 12.</b> Análisis de la Varianza (SC tipo III).....	52
<b>Tabla 13.</b> Test Tukey Alfa= 0, 05 DMS= 3, 58061 Error: 0, 6487 gl: 4.....	52
<b>Tabla 14.</b> Análisis de la varianza .....	54
<b>Tabla 15.</b> Análisis de la Varianza (SC tipo III).....	54
<b>Tabla 16.</b> Test Tukey Alfa= 0, 05 DMS= 1, 91875 Error: 0, 1863 gl: 4.....	54
<b>Tabla 17.</b> Datos obtenidos del análisis del contenido proteico de los concentrados de Firiguero por el método Dumas .....	56
<b>Tabla 18 .</b> Contenido de polifenoles de los sobrenadantes obtenidos en la precipitación de proteínas de Firiguero.....	58
<b>Tabla 19.</b> Datos obtenidos en el análisis del contenido de polifenoles de los sobrenadantes de Firiguero .....	59
<b>Tabla 20.</b> Porcentaje de formación de TBARS .....	61
<b>Tabla 21.</b> Datos obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante.....	61
<b>Tabla 22.</b> Porcentaje de formación de TBARS de los controles de experimentación .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Granos de Firiguero .....	8
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo de la obtención de los concentrados proteicos .....	13
<b>Figura 3.</b> Concentrado proteico de Firiguero proveedor 2 a pHp 3,0 .....	13
<b>Figura 4.</b> Rendimientos promedio de concentrados de Firiguero a diferentes pHs de precipitación. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2.....	23
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de proteína de los concentrados de Firiguero. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2. ....	24
<b>Figura 6.</b> Electroforesis en condiciones nativas ND-PAGE de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: pHp 2,0; pocillos 2: pHp 3,0; pocillos 3: pHp 4,0; pocillos 4: pHp 5,0; pocillos 5: pHp 6,0.....	25
<b>Figura 7.</b> Electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-ME de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: estándares; pocillos 2: pHp 2,0; pocillos 3: pHp 3,0; pocillos 4: pHp 4,0; pocillos 5: pHp 5,0; pocillos 6: pHp 6,0.....	27
<b>Figura 8.</b> Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-ME de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: estándares; pocillos 2: pHp 2,0; pocillos 3: pHp 3,0; pocillos 4: pHp 4,0; pocillos 5: pHp 5,0; pocillos 6: pHp 6,0.....	28
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de los concentrados proteicos de Firiguero de los proveedores 1 y 2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 2,0. Longitud de onda de 280 nm.....	29
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 3,0. Longitud de onda de 280 nm.....	30
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 4,0. Longitud de onda de 280 nm.....	31
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 5,0. Longitud de onda de 280 nm.....	32
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 6,0. Longitud de onda de 280 nm.....	33

<b>Figura 14.</b> Electroforesis SDS-PAGE del concentrado obtenido por precipitación a pH 6,0 y de sus hidrolizados proteicos con materia prima del proveedor P1 (a: fase gástrica; b: fase duodenal). Pocillos 1: estándar; pocillos 2: concentrado obtenido a pH 6,0; pocillos 3, 4 y 5: hidrolizados a pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2, respectivamente. ....	34
<b>Figura 15.</b> Electroforesis SDS-PAGE del concentrado obtenido por precipitación a pH 6,0 y de sus hidrolizados proteicos con materia prima del proveedor P2 (a: fase gástrica; b: fase duodenal). Pocillos 1: estándar; pocillos 2 concentrado obtenido a pH 6,0; pocillos 3, 4 y 5: hidrolizados a pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2, respectivamente. ....	34
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas del concentrado proteico obtenido a pH 6,0 del Firiguero del P1 (CP1) y de los hidrolizados de la fase gástrica a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm .....	35
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas del concentrado proteico elaborado a pH 6,0 con el Firiguero del P1 (CP1) y los hidrolizados de la fase duodenal obtenidos con los productos de la fase gástrica realizada a pH 1,2; 2,0 y 3,2 Longitud de onda de 280 nm .....	36
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas del concentrado proteico precipitado a pH 6,0 con la harina del P2 (CP2) y de los hidrolizados de la fase gástrica a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm .....	37
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas del concentrado proteico del P2 (CP2), preparado a pH 6,0 y de los hidrolizados de la fase duodenal obtenidos con los productos de la fase gástrica realizada a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm .....	37
<b>Figura 20.</b> Contenido de fenoles totales de los sobrenadantes de Firiguero a diferentes pHs de precipitación. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2 .....	39
<b>Figura 21.</b> Actividad antioxidante de las proteínas de Firiguero, evaluadas mediante incubación por 48 horas a 100 °C con aceite de oliva comercial. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. La barra negra identifica al aceite oxidado (control positivo), la barra verde identifica al ácido ascórbico, las barras azules identifican al concentrado del proveedor 1, las barras rojas al concentrado del proveedor 2.....	40
<b>Figura 22.</b> Curva de calibración obtenida con el equipo Dumas .....	56
<b>Figura 23.</b> Curva estándar de ácido gálico .....	58

<b>Figura 24.</b> Secado de la muestra para determinación de humedad .....	64
<b>Figura 25.</b> Extractor Soxhlet .....	64
<b>Figura 26.</b> Incineración de las muestras en la determinación de cenizas.....	64
<b>Figura 27.</b> Solubilización de la proteína a pH 8.....	66
<b>Figura 28.</b> Centrifugación de las muestras solubilizadas a pH 8,0 .....	66
<b>Figura 29.</b> Muestras de la precipitación isoeléctrica congeladas para liofilizar .....	66
<b>Figura 30.</b> Equipo de Dumas.....	68
<b>Figura 31.</b> Balanza del equipo de Dumas .....	68
<b>Figura 32.</b> Equipo de electroforesis .....	70
<b>Figura 33.</b> Armado de las placas para la corrida.....	70
<b>Figura 34.</b> Corrida de los geles .....	70
<b>Figura 35.</b> Equipo RP – UHPLC.....	72
<b>Figura 36.</b> Preparación de las muestras en los viales de vidrio.....	72
<b>Figura 37.</b> Equipo de centrifugación para las muestras .....	72
<b>Figura 38.</b> Muestras del proveedor 1 con la adición del reactivo de Folin .....	74
<b>Figura 39.</b> Muestras del proveedor 2 con la adición del reactivo de Folin .....	74
<b>Figura 40.</b> Preparación de las muestras.....	76
<b>Figura 41.</b> Incubación de las muestras a 100 °C para la detección de TBARS .....	76
<b>Figura 42.</b> Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.....	76

## RESUMEN

En esta investigación cualitativa se aplicó técnicas electroforéticas SDS-PAGE y cromatográficas RP-UHPLC para caracterizar los concentrados proteicos de Firiguero *Vigna unguiculata L.* obtenidos por solubilización a pH 8,0 y posterior precipitación isoeléctrica a 5 pHs. Los rendimientos de extracción a los distintos pHs variaron entre 12 y 17% para los productos extraídos a partir de la harina de dos proveedores obteniéndose el mayor rendimiento (17,45%) a pH 4,0. La cuantificación del contenido de proteína de los concentrados se realizó mediante el método de Dumas, el cual reveló que los productos precipitados a los diferentes pHs contienen cantidades de proteínas superiores al 60%. Los concentrados proteicos se sometieron a un proceso de hidrólisis gástrica y duodenal *in vitro* que simuló las condiciones fisiológicas humanas. En la fase gástrica se obtuvo una hidrólisis parcial de las proteínas, mientras que en la fase duodenal se evidenció una mayor hidrólisis. Se determinó, que la adición de 2 mg de concentrado proteico/mL de aceite de oliva, ejerce un efecto protector frente a la oxidación cuando la mezcla se incubaba a 100 °C por 48 h, evitando la formación de productos secundarios propios de la oxidación, evaluados por el método del ácido tiobarbitúrico. El porcentaje de productos formados (TBARS) varió entre 35,80% y 65,76% comparado con 26,28% cuando se emplea ácido ascórbico como antioxidante. El contenido de polifenoles se evaluó por el método de Folin en los sobrenadantes de los concentrados y está dentro del rango de 180,4 a 358,8 mg GAE/100 g de harina.

**Palabras clave:** Firiguero, leguminosas, electroforesis SDS-PAGE, cromatografía RP-UHPLC, hidrolizados, proteínas.

## ABSTRACT

This research was aimed to characterize Firiguero protein concentrates from *Vigna unguiculata L.* variety, obtained by solubilization at pH 8,0 followed by isoelectric precipitation at five pH values 2,0 - 6,0 by SDS-PAGE electrophoretic- and RP-UHPLC chromatographic technics. Extraction yields at the assayed pH values ranged between 12 and 17% for products extracted using flour provided by two suppliers from Loja, being the highest yield 17,45% at pH 4,0. Quantification of protein content of concentrates was conducted by Dumas automated method. It showed that all the obtained products have protein contents higher than 60% as compared to 21,14% - 21,59% found in the flour. Therefore, alkaline solubilization and isoelectric precipitation are effective methods to isolate proteins.

Firiguero protein concentrates were subjected to an *in vitro* gastric and duodenal hydrolysis, simulating human physiological conditions. In the gastric phase, partial hydrolysis was obtained, while in the duodenal phase, higher proteins breakdown was attained.

Additionally, it was determined that addition of 2 mg of protein concentrate per mL of olive oil exerts a protective effect against lipid oxidation as determined by incubating the protein-oil mixture at 100°C for 48 h. Protein concentrates prevents the formation of secondary products inherent to oxidation, evaluated by the thiobarbituric acid method. The percentage of TBARS thus formed ranged between 43,63% and 72,86% as compared to 32,86% when the antioxidant ascorbic acid is added. The polyphenol content evaluated by the Folin method in the supernatants of the protein concentrates varied between 180,4 to 358,8 mg GAE per 100 g flour.

**Keywords:** Firiguero, legumes, electrophoresis SDS-PAGE, chromatography RP-UHPLC, hydrolyzed, protein.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ~ °C grados Celsius
- ~ **2-ME** 2-mercaptoetanol
- ~ **ác** ácidas
- ~ **BHT** butil hidroxil tolueno
- ~ **bs** básicas
- ~ **C.V** coeficiente de variación
- ~ **CP1** concentrado proteico con materia prima del proveedor 1
- ~ **CP2** concentrado proteico con materia prima del proveedor 2
- ~ **D.E** desviación estándar
- ~ **EDTA** ácido etilendiaminotetraacético
- ~ **g** gramos
- ~ **GAE** equivalente de ácido gálico
- ~ **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** peróxido de hidrógeno
- ~ **HCl** ácido clorhídrico
- ~ **HP1** hidrolizado del proveedor 1
- ~ **HP2** hidrolizado del proveedor 2
- ~ **kDa** kilo Dalton
- ~ **L** litros
- ~ **M** molar
- ~ **mg** miligramos
- ~ **min** minutos
- ~ **mL** mililitros
- ~ **mm** milímetros
- ~ **N** normal
- ~ **NaCl** Cloruro de sodio
- ~ **NaOH** hidróxido de sodio
- ~ **N-D** no desnaturalizado
- ~ **nm** nanómetros
- ~ **P1** proveedor 1 de Firiguero



- ~ **P2** proveedor 2 de Firiguero
- ~ **pHp** pH de precipitación
- ~ **pHs** pH de solubilización
- ~ **pI** punto isoeléctrico
- ~ **PM** peso molecular
- ~ **PSA** persulfato de amonio
- ~ **rpm** revoluciones por minuto
- ~ **RP-UHPLC** reversed phase-ultra high performance liquid chromatography: cromatografía líquida de ultra alta eficacia en fase reversa
- ~ **SDS** dodecil sulfato de sodio
- ~ **SDS-PAGE** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
- ~ **TBA** ácido tiobarbitúrico
- ~ **TBARS** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- ~ **TEMED** tetrametiletilendiamina
- ~ **TFA** ácido trifluoroacético
- ~ **ua** unidades arbitrarias
- ~ **µg** microgramos
- ~ **µL** microlitros
- ~ **µm** micrómetros
- ~ **µM** micromolar

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la información de Acción Ecológica (1999), existen abundantes especies que son cultivadas y cosechadas muy localmente enfocándose hacia una economía sectorizada; investigar y reproducir la información sobre las ventajas nutricionales de cultivos tradicionales ayudaría a que estas especies sean utilizadas de manera más generalizada para garantizar la seguridad alimentaria y simultáneamente suministrar a la población una alimentación más equilibrada.

El Ecuador posee una diversidad de alimentos nutritivos y de bajo coste entre los que se destacan las leguminosas, tubérculos, cereales, raíces y granos andinos (INIAP, 2012).

El 2016 fue designado el año internacional de las legumbres por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Estas semillas constituyen una parte esencial en la alimentación humana sin embargo, su beneficio nutricional no es valorado y su consumo es limitado, esta falta de reconocimiento no es coherente al ser las legumbres un aporte crucial para una alimentación saludable (FAO, 2016b).

Las leguminosas grano o legumbres constituyen una buena fuente proteica, diferenciándose de las semillas de las oleaginosas por su bajo contenido lipídico y su tipo de fibra dietética; se destacan también por su abundante contenido de compuestos bioactivos (Alonso et al., 2010).

El caupí (*Vigna unguiculata L. Walp.*) es una de las leguminosas de grano con un alto porcentaje de adaptación, versatilidad y ventajosas propiedades nutritivas entre las que destaca su contenido proteico (Ehlers y Hall, 1997).

En los últimos 30 años, el uso de proteínas concentradas a partir de semillas se ha intensificado, estudios realizados por Rangel et al. (2004) demostraron que los aislados de proteínas de Caupí presentan propiedades funcionales, incluyendo solubilidad, emulsión y espumación. De aquí que la finalidad de este proyecto de investigación fue caracterizar de forma cualitativa las proteínas extraídas de la harina de dos proveedores

de Firiguero de la variedad *Vigna unguiculata L.* y valorizar de esta forma su calidad nutricional y funcional como leguminosa que forma parte de los granos de la población ecuatoriana.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS OBTENIDAS A PARTIR DE HARINA DE FIRIGUERO (*Vigna unguiculata L.*) Y DE SUS HIDROLIZADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y RP-UHPLC.

### 1.2. JUSTIFICACIÓN

La masiva industrialización y comercialización de alimentos y bebidas pobres en nutrientes, ricos en azúcares y ácidos grasos poco deseables, están generando una población con mayor incidencia en padecimientos crónicos degenerativos (**Oseguera, 2009**). Actualmente, existen trastornos que pueden evitarse o regenerarse mediante una alimentación saludable al combinar los alimentos equilibradamente para satisfacer las necesidades nutritivas y alcanzar un correcto crecimiento y desarrollo de las aptitudes físicas e intelectuales (**Izquierdo Hernández et al., 2004**)

Los avances en la tecnología y la producción son de vital importancia en la elaboración de productos (concentrados, aislados, texturizados) que cumplen importantes funciones en los alimentos y son también un aporte en la calidad nutricional. Estos sistemas alimentarios, además de mejorar el contenido proteico para producir beneficios en la salud y nutrición, también proveen de propiedades funcionales que incrementan notablemente la calidad de los productos (**Luna, 2006**).

Las legumbres por lo general contienen el doble de la dosis de proteínas presentes en los cereales de grano; de ahí que para la mayoría de las poblaciones de los países en desarrollo puede constituir una importante fuente de proteína (**FAO, 2016a**). Las proteínas a menudo son utilizadas como componentes alimenticios por sus atributos funcionales o para impartir propiedades específicas al producto final (**Rangel et al., 2003**).

La semilla de caupí (*Vigna unguiculata L.*), es una cosecha cultivada en periodos anuales particularmente en África, América Latina y algunas partes de Asia y Estados Unidos. Según datos de la FAO aproximadamente 5,8 millones de toneladas de caupí seco se obtienen anualmente con un mínimo de 11 millones de hectáreas plantadas por todo el mundo (Xiong et al., 2016).

El porcentaje de proteína en las semillas de caupí (*Vigna unguiculata L.*), según diversos estudios realizados, oscila entre 21,2 % y 27,9 %, los carbohidratos suman 52 g·100 g<sup>-1</sup> y el aporte del hierro, manganeso y fósforo es de 6,8 mg·100 g<sup>-1</sup>, 4,1 mg·100 g<sup>-1</sup>, 1,5 mg·100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. La calidad nutricional está influenciada por el cultivar y factores anti-nutricionales, temporada, ciclo de almacenamiento y tratamientos térmicos (Araméndiz et al., 2016).

El propósito del presente estudio es caracterizar el contenido proteico de la leguminosa Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas; al ser la digestibilidad de las proteínas un factor de peso en su valor nutricional, se evaluará también el grado de hidrólisis de los concentrados simulando condiciones fisiológicas del organismo; los resultados obtenidos constituyen un aporte a los proyectos de investigación "Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de Amaranto y Quinoa para la elaboración de un alimento funcional" y "Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana" perteneciente a la Red de Cereales de la Red de Universidades del Ecuador (REDU). La información obtenida robustecerá las bases científicas y en general se dará a conocer la calidad e importancia de incorporar esta proteína vegetal en la alimentación de la población ecuatoriana, ya que existe poca información sobre las características nutricionales y constituyentes de nuestros cultivos tradicionales.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Caracterizar las proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-UHPLC.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Aislar las proteínas de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) por precipitación isoeléctrica a diferentes pHs luego de su solubilización a pH 8,0.
- Determinar los rendimientos de la extracción proteica a partir de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*).
- Simular condiciones fisiológicas para la hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*).
- Cuantificar el contenido de polifenoles presentes en los sobrenadantes obtenidos de la precipitación isoeléctrica de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*).
- Evaluar la actividad antioxidante de los concentrados proteicos de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) mediante el método TBARS.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

El constante aumento poblacional y el abastecimiento de alimentos crean la necesidad de orientar estudios e investigaciones hacia la identificación y evaluación de nuevas fuentes con alto valor nutricional (**Murillo et al., 2012**).

En los últimos años se ha puesto singular atención en concentrar o aislar las proteínas, puesto que ofrecen una mayor oportunidad para la incorporación y suplementación de una más amplia variedad de alimentos en diversas culturas alimentarias (**Meyer, 1971**).

Los procesos aplicados en la obtención de los aislados de proteínas tienen en común la utilización de medios alcalinos (pH 8-11) para solubilizar las proteínas y medios ácidos (pH 4-6) para su precipitación isoelectrónica (**Abugoch et al., 2008**).

Para llevar a cabo un estudio y caracterización de la dotación completa de proteínas de un sistema biológico es indispensable su separación y purificación. Para ello, son disociadas selectivamente a partir de muestras complejas mediante un proceso de fraccionamiento adecuado. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis (**Maldonado y Jorrín, 2001**). Las técnicas electroforéticas permiten la segregación de macromoléculas basándose en su masa, carga neta o la relación entre ambas, forzándolas a penetrar por una matriz porosa mediante la aplicación de un campo eléctrico (**Córsico et al., 2013**). Investigaciones electroforéticas indicaron que las leguminosas tienen altas cantidades de globulinas, que se clasifican en base a su poder de sedimentación, se tiene a la globulina 11S constituida por dos hexámeros asociados por puentes disulfuro con un peso molecular entre 320-360 kDa, las subunidades de cada hexámero presentan condición ácida (37-40 kDa) y condición básica (18- 20 kDa). La globulina 7S es una glicoproteína compuesta por un trímero de peso molecular 150-210 kDa con tres subunidades:  $\alpha$  (57-76 kDa),  $\alpha'$  (57-83 kDa) y  $\beta$  (42-53 kDa) (Amigo, 2007).

El estudio de las proteínas requiere de sistemas confiables para su determinación. El método automatizado Dumas o de combustión de nitrógeno a altas temperaturas (700-1000 °C) con adición de oxígeno puro es un sistema altamente eficiente, preciso y veloz. En este método los constituyentes orgánicos e inorgánicos que contienen nitrógeno producen N<sub>2</sub> y óxidos de nitrógeno, los cuales son reducidos a N<sub>2</sub> a temperatura elevada y el Nitrógeno total es cuantificado sistemáticamente (**Nielsen, 2010**).

Consta de cuatro fases, en la primera fase se produce una combustión, donde la muestra es incinerada alrededor de 900°C en presencia de oxígeno. La subsecuente fase es una reducción, donde el óxido nítrico producido por la combustión es reducido en una columna de cobre a nitrógeno molecular. La tercera fase es de purificación, en la cual una serie de absorbentes adecuados remueven los constituyentes interferenciales, tales como los haluros de hidrógeno y los óxidos de azufre del flujo de la mezcla gaseosa. El vapor de agua producido es condensado y retenido por un agente desecante, posteriormente al proceso de reducción donde se inicia el secado fino. En la fase final se mide el nitrógeno total remanente en un flujo de gas transportador (**Gregorio et al., 2016**).

Además de las proteínas, las leguminosas contienen otros componentes importantes como por ejemplo polifenoles; el Caupí ha demostrado que contiene niveles altos de polifenoles (**Laurena et al., 1987**). Investigaciones ejecutadas indican que los polifenoles presentan capacidad antioxidante con latentes beneficios para la salud (**Arts y Hollman, 2005**). La cuantificación de los compuestos fenólicos se basa en la reacción de estos compuestos con el reactivo Folin- Ciocalteu a pH básico, cuya presencia se evidencia a través de una tonalidad azul susceptible de ser medida espectrofotométricamente (**M. E. García et al., 2015**).

En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante, existen diversos métodos ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las determinaciones *in vitro*, consiste en definir la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radicalaria, en las que la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (**Montenegro et al., 2013**). Mediante el ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) se evaluará la formación de complejos coloreados producidos en



la oxidación de grasas y aceites y el efecto que produce la adición de los concentrados proteicos.

Los estudios de digestión bajo condiciones gástricas-duodenales sirven para fines de comparación y para proporcionar una visión más profunda de la acción de las diferentes enzimas digestivas sobre las proteínas (**Rajamohamed et al., 2013**). Un sistema de digestión *in vitro*, comprende una primera etapa análoga a la fase gástrica de la digestión humana y una fase 2, que imita el compartimiento duodenal.

La caracterización bioquímica de las digestiones de proteínas examina el perfil de péptidos formados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (**Bossios et al., 2011**).

Para garantizar la repetitividad de los resultados se compararán los hidrolizados por Cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase reversa (RP- UHPLC), una técnica cromatográfica que utiliza una fase estacionaria apolar y una fase móvil moderadamente acuosa y polar (**Sacristán et al., 2011**).

## **2.2. HIPÓTESIS**

TEMA: Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y cromatografía RP-UHPLC.

### **Hipótesis nula**

**Ho:** Los concentrados de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) no son digeridos en el organismo por las enzimas digestivas y se evidencia al ser evaluados en ensayos *in vitro* mediante electroforesis SDS-PAGE y cromatografía RP-UHPLC.

### **Hipótesis alternativa**

**Ha:** Los concentrados de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) son digeridos en el organismo por las enzimas digestivas y se evidencia al ser evaluados en ensayos *in vitro* mediante electroforesis SDS-PAGE y cromatografía RP-UHPLC.

### **2.3. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS**

**Variable independiente:** concentrados de Firiguero.

**Variable dependiente:** digestibilidad gastrointestinal.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Materia prima

Se utilizaron los granos secos de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) de dos proveedores de la Ciudad de Loja (Fig. 1) seleccionados por la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).



**Figura 1.** Granos de Firiguero

##### 3.1.2. Reactivos

- 2-mercaptoetanol, BIO-RAD
- Aceite de oliva, EL ARBOLITO
- Ácido acético glacial 100 %, MERCK
- Ácido clorhídrico fumante 37 %, MERCK
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), VELP
- Ácido gálico, MERCK
- Ácido tiobarbitúrico, PANREAC
- Acrilamida, INVITROGEN
- Albúmina de suero bovino, THERMO SCIENTIFIC

- Azul de bromofenol, BIO-RAD
- Azul de Coomassie, BIO-RAD
- Bicarbonato de sodio
- Bis-acrilamida, INVITROGEN
- Carbonato de sodio, MERCK
- Cloruro de sodio, MULTICIENCIAS
- Dodecil sulfato de sodio, INVITROGEN
- Estándar de proteínas Tri Color, BIOLAND
- Folin-Ciocalteu, BIOMEDICALS
- Glicerol, INVITROGEN
- Glicina, SIGMA
- Hidróxido de sodio, MERCK
- Metanol, MERCK
- N, N'-Metilenbisacrilamida, INVITROGEN
- Pancreatina del páncreas porcino, SIGMA
- Pepsina gástrica porcina, SIGMA
- Soluciones buffer para medidor de pH, THERMO SCIENTIFIC
- TEMED (N, N, N, N'-tetrametilen-diamina), BIO-RAD
- Tris-Ácido Clorhídrico, BIO-RAD

### **3.1.3. Equipos**

- Balanza analítica, PRECISA
- Centrífuga, EPPENDORF
- Congelador Ultra-low Temperature, PANASONIC
- Congelador, MABE
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución, AGILENT TECHNOLOGIES (C.A USA)
- Desecador
- Equipo de electroforesis con todos sus accesorios, BIO-RAD
- Equipo Dumas Analyzer, VELP
- Espectrofotómetro, HACH DR 5000

- Estufa, VWR
- Fuente de poder compatible con el equipo de electroforesis.BIO-RAD.
- Homogenizador T25 Ultra Turrax IKA
- Incubadora, VWR
- Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics modelo BTP-3ES0VW
- Micro centrífuga, LABNET
- Micro incubador, ESCO
- Molino eléctrico JK IKA WERKE M20
- Medidor de pH, THERMO SCIENTIFIC
- Plancha de calentamiento con agitación magnética, VWR
- Refrigerador, INDURAMA
- Soxhlet
- Unidad destiladora de agua, EASY LINEA 150
- Vórtex Mixer, VWR

#### **3.1.4. Insumos y utensilios**

- Balones aforados de varios volúmenes
- Botellas de vidrio
- Cajas petri de vidrio
- Cápsula de porcelana
- Cinta adhesiva
- Cinta masking
- Embudos
- Envases de plástico con tapa
- Espátulas
- Etiquetas adhesivas
- Gotero
- Gradillas
- Guantes de látex
- Magnetos
- Mangueras

- Marcadores
- Matraces erlenmeyer de varios volúmenes
- Micropipetas de varios volúmenes
- Mortero
- Nueces metálicas
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Parafilm
- Pinzas metálicas
- Pipetas automáticas de varios volúmenes
- Pipetas Pasteur
- Pissetas
- Probetas
- Soporte universal
- Tijeras
- Toallas absorbentes
- Tubos de centrifuga de 450 y 15 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf de 1,5 y 2,0 mL
- Varillas de agitación
- Vasos de precipitación

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Obtención de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)**

Los granos de Firiguero se molieron en un molino eléctrico, la harina que se obtuvo se guardó en fundas plásticas completamente selladas a condiciones ambientales y se utilizó en los análisis posteriores.

### 3.2.2. Análisis proximal de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

El análisis proximal de la harina de Firiguero se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato de acuerdo a los siguientes métodos de análisis (Tabla 1):

**Tabla 1.** Métodos de análisis para humedad, cenizas y grasa de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

<b>TIPO DE ANÁLISIS</b>	<b>MÉTODO</b>
Humedad	AOAC Ed 19,2012 925.10
Cenizas	AOAC Ed 19,2012 923.03
Grasa	AOAC Ed 19,2012 2003.06

El análisis de fibra cruda y proteína o nitrógeno total se lo realizó en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la ciudad de Quito, de acuerdo a los siguientes métodos de análisis (Tabla 2):

**Tabla 2.** Métodos de análisis para fibra cruda y proteína de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

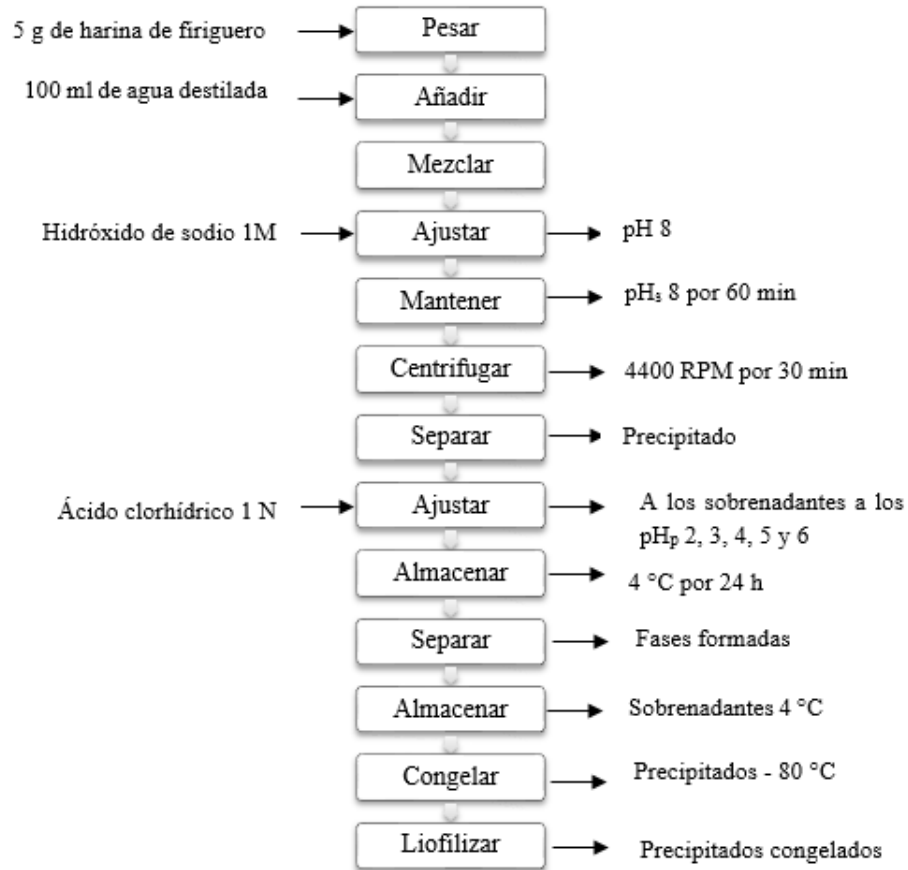
<b>TIPO DE ANÁLISIS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>MÉTODO DE REFERENCIA</b>
Fibra cruda	%	MO-LSAIA-01.05	U. FLORIDA 1970
Proteína o nitrógeno total	%	MO-LSAIA-01.04	U. FLORIDA 1970

**Fuente:** (INIAP (2016))

### 3.2.3. Obtención de concentrados proteicos

Se trabajó por separado con la harina de dos proveedores con dos réplicas de cada uno a pH 8,0 para la solubilización de la proteína y cinco valores de pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0

y 6,0 para la precipitación siguiendo la metodología descrita por Martínez & Añón (1996), detallada en la figura 2:



**Figura 2.** Diagrama de flujo de la obtención de los concentrados proteicos

En la Figura 3 se observa el concentrado proteico obtenido por precipitación a pHp 3,0 de P1.



**Figura 3.** Concentrado proteico de Firiguero proveedor 2 a pHp 3,0



### 3.2.4. Determinación de los rendimientos de extracción proteica

Para determinar el rendimiento de extracción, se liofilizó (en el liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics modelo BTP-3ES0VW a - 50 °C/ 755 Torr) y pesó el precipitado de proteína obtenido a las diferentes condiciones. Para el cálculo del porcentaje de rendimiento de extracción proteica se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{W_f}{W_o} * 100$$

#### **Donde:**

%R: rendimiento de extracción de proteína del Firiguero

$W_f$ : peso final del precipitado después del proceso de liofilización

$W_o$ : peso inicial de la harina de Firiguero

### 3.2.5. Cuantificación de proteína mediante el método de Dumas

Se analizaron las muestras en el equipo Dumas Analyzer de la marca VELP configurado para las siguientes condiciones de trabajo: factor de oxígeno 1,8 mL O<sub>2</sub>/mg de muestra, tasa de flujo de oxígeno 400 mL O<sub>2</sub>/min y un factor de proteína (fp) de 5,70 (%N x fp = % proteína).

Inicialmente, en el equipo se realizó una curva estándar con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para lo cual se pesó 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg de EDTA en las láminas de hojalata de preparación de la muestra y se selló de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente se colocaron en las cámaras de análisis del equipo Dumas para realizar las determinaciones. La curva estándar se repitió hasta obtener un coeficiente de determinación de 0,999 como mínimo.

Finalmente se trabajó con 50 mg de muestra de harina y de los concentrados proteicos liofilizados obtenidos a los 5 pH de experimentación, siguiendo el procedimiento anterior.

### 3.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El análisis de electroforesis SDS - PAGE de los concentrados proteicos se realizó en el equipo de electroforesis de Bio-Rad, modelo Mini Protean II con un voltaje constante de 200 voltios de acuerdo a la guía de Bio Rad (BIO-RAD, 2011).

#### ~ Preparación de las muestras

Se pesó 10 mg del concentrado proteico (el procedimiento se efectuó para los seis pHs de experimentación) y se disolvió con agitación en 1 mL de agua destilada. Se tomó 200  $\mu$ L de la solución en 3 tubos eppendorf y se mezcló para el primer tubo eppendorf con 200  $\mu$ L de la solución tampón: 4,8 mL de agua destilada, 1,2 mL de Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8, 1 mL de glicerol purificado, 2 mL de SDS al 10%, 0,6 mL de agente reductor 2- mercaptoetanol y una punta de espátula de azul de bromofenol. Para el segundo tubo eppendorf se omitió el agente reductor 2- mercaptoetanol y para el tercer tubo eppendorf se omitió el agente reductor 2- mercaptoetanol y SDS. Los tubos se incubaron en un microincubador a 90°C y 500 rpm por 5 min.

#### ~ Preparación de los geles separador y concentrador

Se prepararon los geles en sendos tubos de centrífuga con los componentes que constan en la Tabla 3, añadiéndolos al tubo en el orden indicado.

**Tabla 3.** Preparación de los geles separador y concentrador

Gel separador (al 16%)		Gel concentrador (al 6%)	
Agua destilada	1,20 mL	Agua destilada	2,20 mL
Tris-HCl 1M de pH 8,8	1,30 mL	Tris-HCl 1,5 M de pH 6,8	0,42 mL
Acril amida/bisacrilamiada al 30%	2,70 mL	Acril amida/bisacrilamida al 30%	0,70 mL
SDS al 10%	75 $\mu$ L	SDS al 10%	3,30 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	TEMED	6 $\mu$ L
Persulfato de amonio PSA	20 $\mu$ L	Persulfato de amonio PSA	20 $\mu$ L

**Fuente:** Laboratorio de alimentos funcionales (BIO-PROPEPTI) FCIAL-UTA

Se añadió la primera mezcla (gel separador) con cuidado en el interior del molde formado por las placas de vidrio hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, utilizando una pipeta Pasteur de forma que quede suficiente espacio para el gel concentrador. A continuación, usando una pipeta limpia, se cubrió la superficie del gel con agua destilada. La polimerización del gel debe ocurrir en aproximadamente 30 min. A continuación, se eliminó el agua destilada y se añadió de igual manera los componentes del gel concentrador sobre la superficie del gel de corrida, se insertó al instante el peine de 5 divisiones, con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire. Se esperó que el gel polimerice (30 min aproximadamente). Se obtuvo un gel con las siguientes dimensiones: 1 mm de espesor, 7 cm de ancho y 10 cm de alto.

### ~ **Electroforesis**

Se preparó el tampón de corrida. Para los tubos eppendorf 1 y 2 se utilizó 3 g de Tris-HCl, 15 g de glicina y 1 g de SDS; para el tubo 3 se empleó 3 g de Tris-HCl y 15 g de glicina. Se añadió el tampón de corrida requerido para los reservorios interior y exterior de la cuba de electroforesis.

Se cargó 15  $\mu$ L de las muestras en los pocillos en un orden definido (pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0).

Se conectó los electrodos a la cuba de electroforesis y luego a la fuente de poder, a 200 voltios y se encendió el equipo. Cuando el frente de la corrida alcanzó la parte inferior del gel se apagó el equipo, se retiró los electrodos, se sacó el molde con los geles y cuidadosamente se retiró las placas de vidrio y el gel procurando no romperlo, con la ayuda de una espátula.

Se colocó el gel en el recipiente que contiene la solución de tinte de Coomassie brilliant blue R-250 de modo que lo cubra, se tapó y se agitó a la menor rpm del microincubador por 2 horas. Se separó la solución de tinción. Finalmente, en un recipiente adecuado completamente limpio se colocó la solución de destiñido (45% agua destilada, 50% metanol, 5% ácido acético) y se sumergió el gel.

### **3.2.7. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC) de los concentrados proteicos**

Se realizó el análisis de los concentrados e hidrolizados en el cromatógrafo líquido de ultra alta resolución Agilent 1200 Infinity Series de Agilent Technologies (C.A USA), usando la técnica RP – UHPLC en una columna de fase reversa Zorbax EC-C18 de 4,6 \* 50 mm \* 2,7 µm de tamaño de partícula acoplada a un detector de arreglo de diodos. La fase móvil fue una mezcla de agua Milli-Q y 0,27% de ácido trifluoacético (TFA) (Fase A) con metanol y 0,27% de TFA (Fase B). El gradiente de análisis fue de 0 a 70% para B en una rampa que se realizó en 12 min con un flujo de 1 mL/min.

En la preparación de la muestra se utilizó 5 mg de concentrado disuelto con agitación en 1 mL de agua Milli-Q en tubos eppendorf de 1,5 mL, las disoluciones fueron centrifugadas a 13000 rpm para ser filtradas por membranas de nylon con poros de 0.45 µm.

### **3.2.8. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro***

#### **3.2.8.1. Fase gástrica**

El proceso de la fase gástrica *in vitro* se realizó de acuerdo al método descrito por Rajamohamed, et al. (2013) con modificaciones. Se pesó en tres tubos eppendorf (1, 2 y 3) 10 mg de concentrado, se agregó 1 mL de fluido gástrico simulado SGF (NaCl 0,35 M) de pH 1,2; 2,0 y 3,2 a los tubos 1, 2 y 3 respectivamente. Posteriormente se agregó 100 µL de solución de pepsina de 2000 U/mg proteína y se incubó a 37 °C por 60 minutos a 500 rpm. Se detuvo la reacción agregando a cada tubo 200 µL de bicarbonato de sodio 1 M (NaHCO<sub>3</sub>) y calentado a 90°C por 10 minutos.

Para determinar el avance de la hidrólisis se utilizó las técnicas de SDS-PAGE y RP-UHPLC, de acuerdo a las especificaciones para cada técnica.

#### **3.2.8.2. Fase duodenal**

El proceso de la fase duodenal *in vitro* se realizó de acuerdo al método descrito por Rajamohamed, et al. (2013). Se utilizó 1 mL de la fase gástrica, se añadió 1 mL de solución de pancreatina 100 U/mg y se incubó a 37 °C por 120 minutos a 500 rpm. Se finalizó la reacción calentando en el micro-incubador a 90 °C por 10 minutos.

Para determinar el avance de la hidrólisis se utilizó las técnicas de SDS-PAGE y RP-UHPLC, con las especificaciones respectivas para cada técnica.

### **3.2.9. Determinación del contenido de polifenoles de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)**

Los polifenoles se determinaron mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por García et al. (2015) con ligeras modificaciones. Se trabajó con 0,1 mL de sobrenadante de los pHs de precipitación 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0 obtenidos durante el aislamiento proteico y un blanco (agua), las muestras fueron colocadas en balones aforados de 5 mL, se les añadió 0,1 mL de reactivo de Folin y consecutivamente se agitaron constantemente durante 3 minutos en un Vortex Mixer al término de los cuales se les agregó 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5 %.

Las mezclas que se obtuvieron se llevaron a 5 mL con agua destilada y se dejó reposar por 60 minutos al ambiente, transcurrido este tiempo se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm. Las lecturas de las muestras preparadas se las realizó por triplicado para cada pH.

Se construyó una curva patrón utilizando como estándar ácido gálico, los resultados se expresaron como mg de ácido gálico.

### **3.2.10. Análisis de la actividad antioxidante (Método TBARS)**

Se analizó la actividad antioxidante de las proteínas mediante el método descrito por Rojano et al. (2008) con modificaciones. Se realizó una prueba preliminar con el concentrado proteico obtenido a pH de precipitación 6,0 utilizando cantidades variables del mismo, equivalentes a 0,1; 0,2; 1,0 y 2,0 mg/mL de aceite en tubos de vidrio con tapa. Para el ensayo se utilizó 7 mL de aceite de oliva. Las muestras se incubaron a 100 °C por 48 horas en un baño maría con aceite vegetal, la agitación se mantuvo constante con magnetos colocados en cada tubo.

Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron para descartar las partículas de la proteína añadida que producen turbidez, se tomó 0,9 mL de muestra y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, se les añadió 0,9 mL de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0,001 M disuelto en la mezcla 50:50 (V/V) de ácido acético-agua destilada), se agitó vigorosamente en un Vórtex y se incubaron los tubos a 100°C por 1 hora con agitación a 600 rpm. Se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias de la fase acuosa (separada cuidadosamente con una micropipeta) en un espectrofotómetro a 532 nm.

Se incluyeron ensayos con el antioxidante comercial Butil hidroxil tolueno (BHT) utilizando concentraciones idénticas a las del ensayo antes descrito. Se prepararon además dos tubos de control, el control positivo con 0,9 mL de aceite de oliva incubado junto con los tubos anteriores y un control negativo con 0,9 mL de aceite de oliva no incubado. A todos los tubos se les añadió 0,9 mL de TBA y se los trató como se describió previamente.

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Sustancias reactivas al TBA} = \frac{(a - c) * 100}{b - c}$$

**Donde:**

% de TBARS

*a*: absorbancia de la muestra

*b*: control positivo, absorbancia del aceite oxidado

*c*: control negativo, absorbancia del aceite no oxidado

Se trabajó inicialmente con varias concentraciones de proteína (de 0,2 a 2 mg de proteína/mL de aceite de oliva), los resultados determinaron que los ensayos con los restantes concentrados proteicos se realizaran utilizando la concentración más alta (2mg de concentrado/mL de aceite).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1. Análisis proximal de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

En la tabla 4 se presenta los resultados de los análisis de las harinas de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) realizados de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) para la determinación de cenizas, humedad y grasa.

**Tabla 4.** Contenido de humedad, cenizas y grasa de las harinas de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

Análisis	Contenido (%)	
	Proveedor 1 (P1)	Proveedor 2 (P2)
<b>Humedad</b>	10,94 ± 0,15	10,67 ± 0,07
<b>Cenizas o materia inorgánica</b>	3,42 ± 0,07	3,34 ± 0,07
<b>Extracto etéreo o grasa</b>	1,15 ± 0,01	2,07 ± 0,39

Los valores de humedad de la harina de los dos proveedores fueron similares entre sí, más altos que los valores reportados en el estudio de Canelones & Castejon (2006) que fueron de 8,30%, los autores indicaron que en el análisis de la composición proximal influyó el estado de madurez en que se realizó la cosecha y el posterior secado de las vainas para el estudio. El laboratorio de Investigación Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia de forma global reportó la composición bromatológica de diferentes harinas e indicaron que el frijol (*Phaseolus vulgaris*) registró un valor de humedad de 10,41%, mediante este valor se puede confirmar que existen factores determinantes como la genética que

van influir en el resultado (Umaña et al., 2010). Por estos motivos se evidencian variaciones.

Para P1, el valor de cenizas obtenido fue de 3,42% y 1,15% de extracto etéreo y para P2 un valor de ceniza de 3,34% y 2,07% de extracto etéreo. Al comparar estos valores con los reportados por Ramírez (2015) para la harina de *Vigna Unguiculata L.* se nota que los valores de cenizas encontrados por este autor son más elevados de 4,16%, mientras que el contenido de grasa es tan solo de 1,16%.

Como anteriormente se mencionó la influencia de factores internos y también ambientales como la temperatura, fotoperíodo y nutrición son de peso al momento de reportar un dato final (Sharma y Sharma, 2014).

Los análisis de proteína, fibra cruda y carbohidratos totales se realizaron en el Laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la ciudad de Quito.

Los contenidos de proteína, fibra cruda y carbohidratos totales (Tabla 5) son similares a los reportados por Silva-Freire (1999), que caracterizaron 21 genotipos de frijol caupí (*Vigna unguiculata L.*), los valores de proteína total oscilaron entre 21,06 y 29,29% y en nuestro caso varió entre 21,1 y 21,6; para los carbohidratos obtuvieron un rango entre 51,09 y 74,11% y en las muestras de Firiguero de los dos proveedores se mantuvo en 69%.

Para el contenido de fibra cruda la literatura sustenta valores superiores frente a los obtenidos en esta investigación. En el estudio de Avanza-Añón (2008) la composición de la harina de caupí reveló un valor de  $6,7 \pm 0,15$ , aproximadamente superior en un 50%.



**Tabla 5.** Contenido de proteína, fibra cruda y carbohidratos totales de las harinas de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*)

Análisis	Contenido (%)	
	Proveedor 1 (P1)	Proveedor 2 (P2)
Proteína	21,59	21,14
Fibra cruda	4,54	4,88
Carbohidratos Totales	69,01	68,96

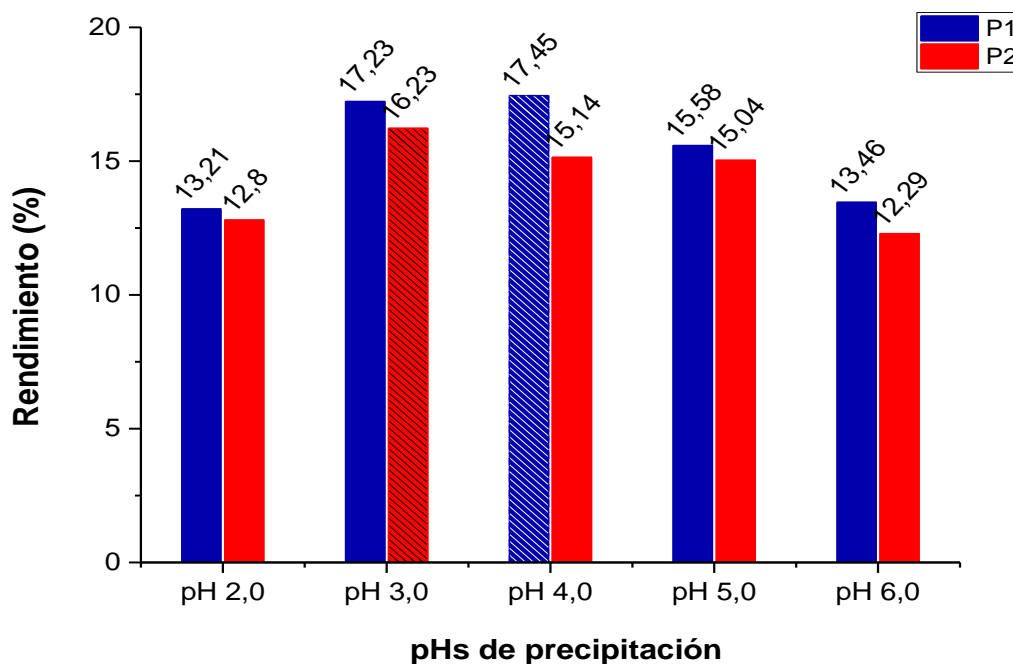
#### 4.1.2. Determinación de los rendimientos de extracción proteica

Los pesos de los concentrados proteicos liofilizados obtenidos a diferentes condiciones fueron utilizados para calcular el rendimiento de extracción.

De los dos proveedores de Firiguero seleccionados en este estudio, el Firiguero del proveedor 1 (P1), registró de forma global un mayor rendimiento de extracción proteína. En la figura 4, se ilustran los valores promedio de rendimiento calculados en porcentaje, para pHp 2,0; pHp 3,0; pHp 4,0; pHp 5,0 y pHp 6,0; el concentrado preparado con la materia prima del proveedor P1 (CP1) presentó un rendimiento máximo de 17,45% a pHp 4,0 y un rendimiento mínimo de 13,21% a pHp 2,0.

Para los concentrados obtenidos con el Firiguero del proveedor P2 (CP2) se registró el más alto rendimiento a pHp 3,0 de 16,23% seguido de 15,14% a pHp 4,0 y un rendimiento mínimo a pHp 6,0 de 12,29%, valores inferiores a los obtenidos con la materia prima del P1.

Los mejores rendimientos fueron los alcanzados a los pH de precipitación 3, 4 y 5.



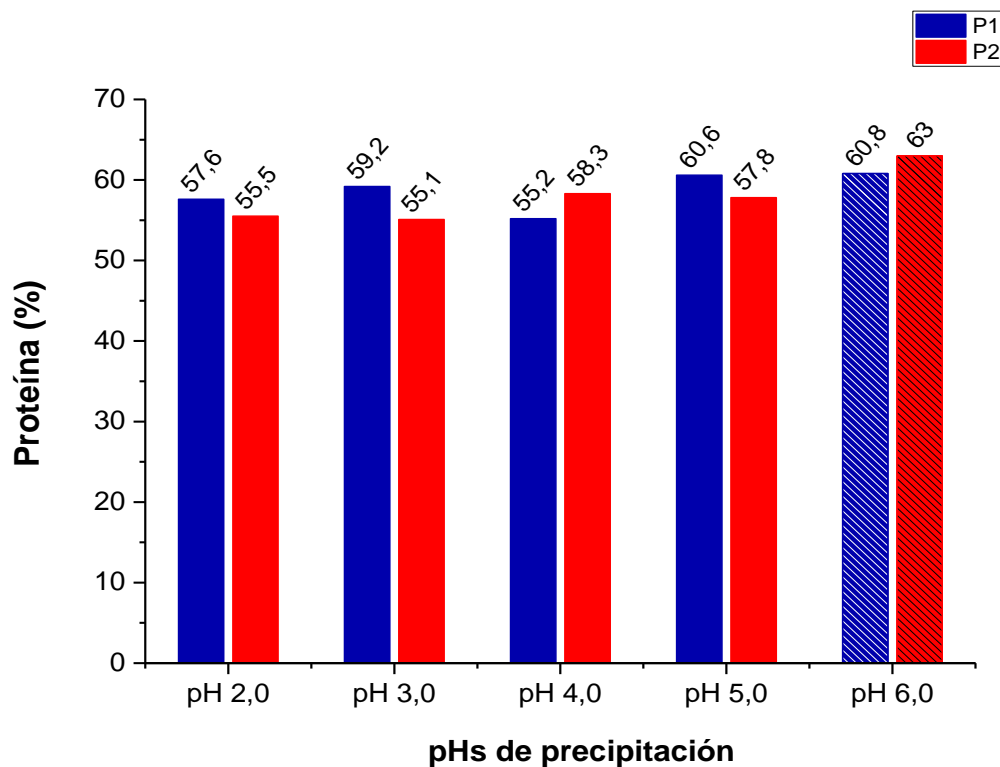
**Figura 4.** Rendimientos promedio de concentrados de Firiguero a diferentes pHs de precipitación. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2.

#### 4.1.3. Cuantificación proteica mediante el método de Dumas

El análisis del contenido proteico se realizó por el método cuantitativo de Dumas, el cual reveló que los CP1 (60,8% de proteína) y CP2 (63,0% de proteína) a pHp 6,0 presentaron los valores más altos de porcentaje de proteína. Para el caso del CP1, a pHp 5,0 se obtuvo un valor de 60% muy cercano al contenido de proteína determinado a pHp 6,0.

En el estudio realizado por Marrugo et al. (2016) se evaluó el potencial nutricional de concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata* y determinaron que los concentrados de *Vigna unguiculata* presentan un contenido proteico de  $65,29 \pm 0,35\%$ , valor superior al obtenido en este estudio (Figura 5). Las diferencias que se evidencian se relacionan directamente al método de cuantificación de proteína

utilizado en cada estudio, el método de Kjeldahl presenta mayores desviaciones que un método totalmente automatizado como Dumas.



**Figura 5.** Porcentaje de proteína de los concentrados de Firiguero. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2.

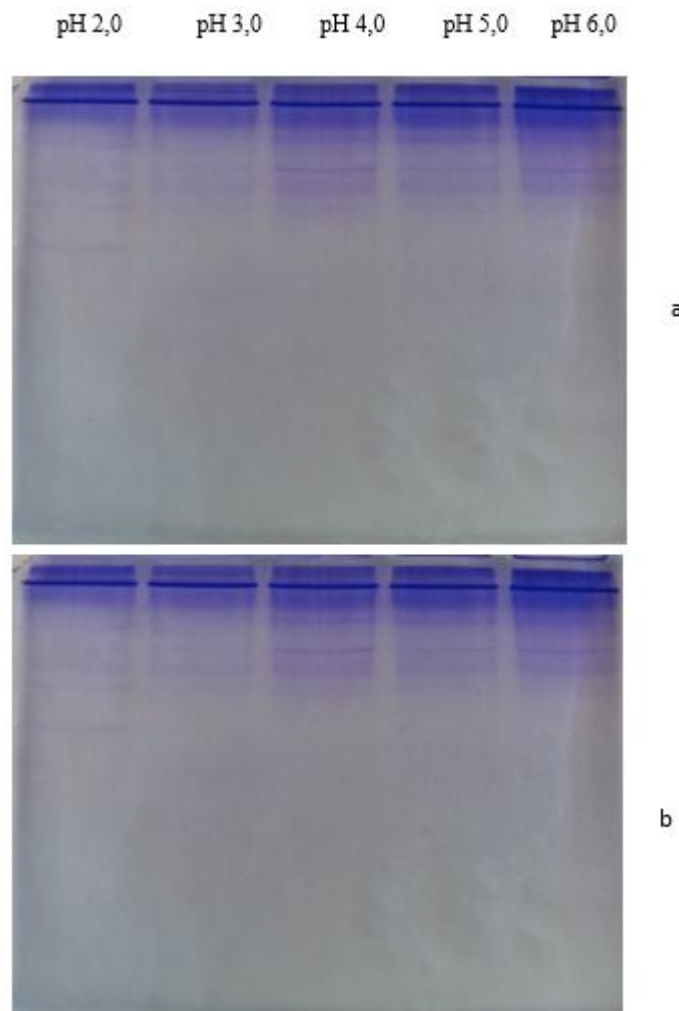
#### 4.1.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Investigaciones indican que las leguminosas contienen elevadas cantidades de proteínas de almacenamiento que se clasifican en base a su solubilidad, estas son las albúminas solubles en agua, globulinas solubles en medios salinos diluidos y neutros, prolaminas solubles en alcohol o en mezclas de alcohol agua y glutelinas solubles en medios ácidos o alcalinos (Pinciroli, 2010; Utsumi, 1992). Para su análisis son necesarias algunas técnicas entre ellas la electroforesis.

~ Electroforesis ND-PAGE para los concentrados proteicos de P1 y P2

La primera parte de este estudio contempló realizar la electroforesis no desnaturante (ND) de las muestras. En este caso, las proteínas de los concentrados conservaron su estructura tridimensional, la migración se efectuó sin desnaturalización y en función de su carga, tamaño y forma.

En la figura 6 se presenta los perfiles proteicos obtenidos mediante electroforesis ND-PAGE para los concentrados del P1 (CP1) y del P2 (CP2). Los dos perfiles son claramente similares, donde se observan tres bandas iniciales bien diferenciadas. Este mismo patrón se repite para todos los pHs de experimentación con los productos de los dos proveedores, si bien en las muestras precipitadas a pHp 4,0; 5,0 y 6,0 se aprecian además bandas más tenues a mayor distancia del punto de aplicación.



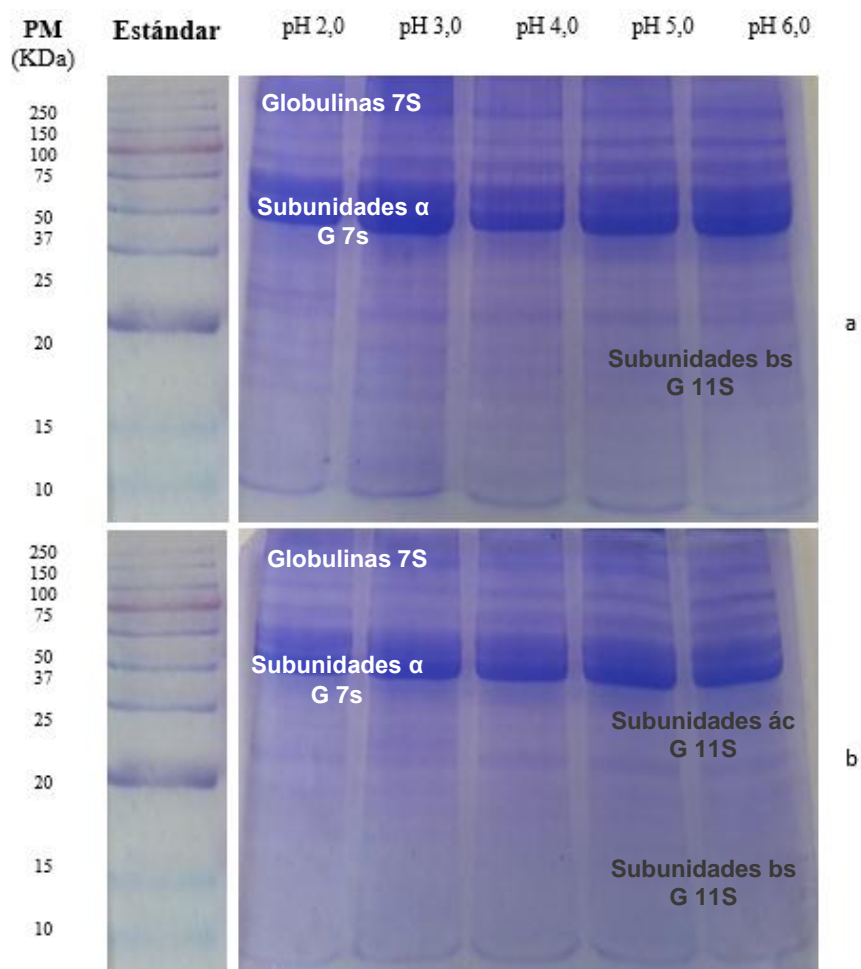
**Figura 6.** Electroforesis en condiciones nativas ND-PAGE de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: pHp 2,0; pocillos 2: pHp 3,0; pocillos 3: pHp 4,0; pocillos 4: pHp 5,0; pocillos 5: pHp 6,0.

~ Electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-ME

La electroforesis SDS-PAGE es la más ampliamente usada para el análisis y caracterización de proteína, bajo condiciones reductoras es un método muy útil para el análisis de los puentes disulfuro S-S presentes en las proteínas (P. H. García, 2000).

En la segunda parte, la electroforesis se efectuó en presencia del SDS asegurando la desnaturalización de las proteínas con la aplicación de calor. No se utilizó ningún agente reductor.

En la figura 7 se muestra los perfiles para los concentrados proteicos elaborados con la materia prima de los P1 (CP1) y P2 (CP2), la parte 7a corresponde a los concentrados CP1, se observa que para todos los pH de experimentación las tres primeras bandas corresponden a proteínas con pesos moleculares entre 141 y 93 kDa correspondientes a las globulinas 7S, las bandas 4 y 5 con pesos moleculares entre 74 y 59 kDa presentaron alta definición identificándolas como subunidades  $\alpha$  de las globulinas 7S, el resto de bandas tienen pesos moleculares entre 31 y 14 kDa correspondientes a las subunidades básicas de las globulinas 11S. Para el caso 7b (CP2), se identificó que las 4 primeras bandas con pesos moleculares entre 191 y 86 kDa corresponden a las globulinas 7S, las bandas 5 y 6 presentaron una mayor definición, la banda 5 con un peso molecular de 71 kDa corresponde a la subunidad  $\alpha$  de las globulinas 7S y la banda 6 con peso molecular de 32 kDa corresponde la subunidad ácida de las globulinas 11S. Para las bandas restantes se obtuvieron pesos moleculares entre 25-15 kDa correspondientes a la subunidad básica de las globulinas 11S.



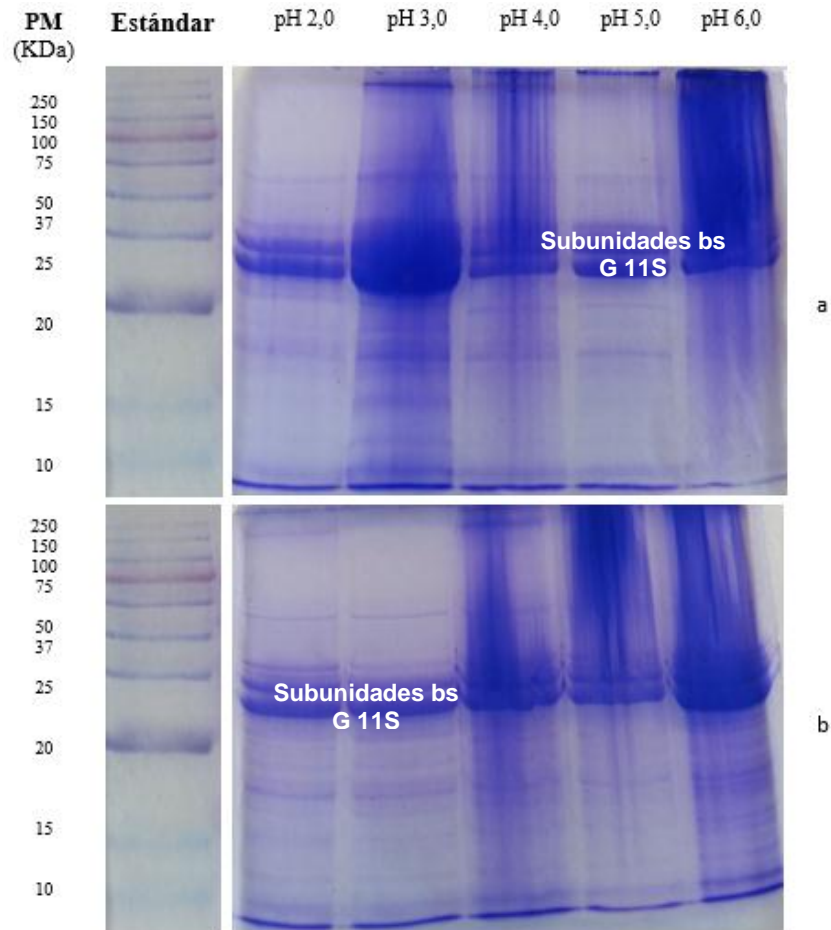
**Figura 7.** Electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-ME de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: estándares; pocillos 2: pHp 2,0; pocillos 3: pHp 3,0; pocillos 4: pHp 4,0; pocillos 5: pHp 5,0; pocillos 6: pHp 6,0.

~ Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-ME

En la tercera parte de este trabajo, la electroforesis se efectuó en presencia del SDS y 2-ME asegurando de esta forma no solo la desnaturalización sino también la reducción de los puentes disulfuro presentes en las proteínas de los concentrados.

En la figura 8 se muestra los perfiles proteicos para los concentrados del P1 (parte a) y P2 (parte b). En la parte a se observa bandas de alta definición en la sección central del gel con pesos moleculares entre 32 y 25 kDa identificándolas como subunidades básicas de las globulinas 11S. Para el caso b, se observa que las bandas de alta definición de la sección central presentan pesos moleculares entre 40 y 25 kDa y

corresponden a las subunidades básicas de las globulinas 11S. Para a y b se observó bandas ténues con pesos inferiores a 20 kDa las cuales no se evidenciaron anteriormente confirmando la acción del 2-ME que facilitó la migración de estos péptidos de menor peso molecular.



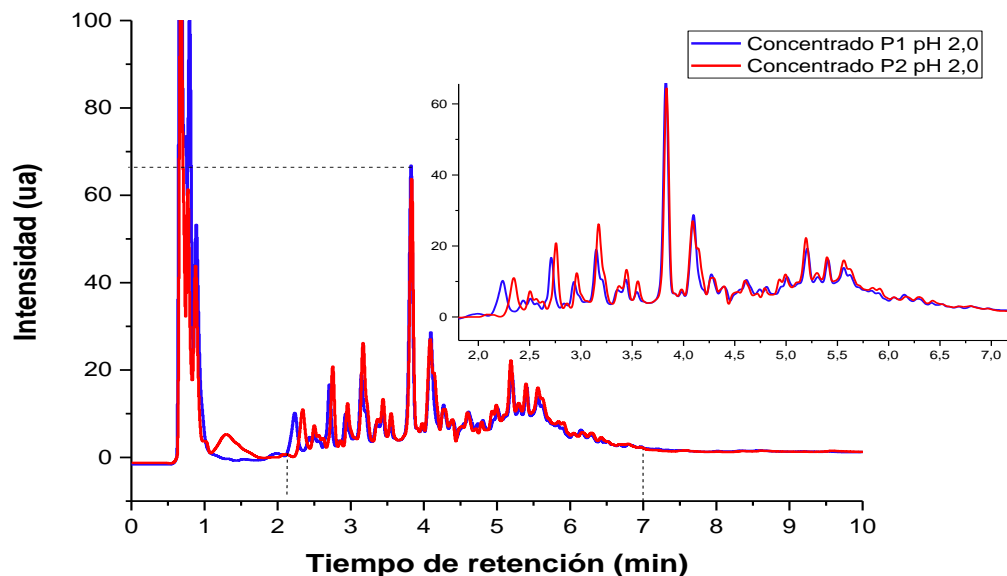
**Figura 8.** Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-ME de los concentrados proteicos CP1 y CP2 (a: P1; b: P2) obtenidos a diferentes pHs de precipitación. Pocillos 1: estándares; pocillos 2: pHp 2,0; pocillos 3: pHp 3,0; pocillos 4: pHp 4,0; pocillos 5: pHp 5,0; pocillos 6: pHp 6,0.

#### 4.1.5. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC) de los concentrados proteicos

El estudio de las proteínas de Firiguero se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa. En el análisis se utilizó los concentrados proteicos de todos los pHs de experimentación, estos fueron corridos en el cromatógrafo bajo

una composición de fase móvil: agua Milli-Q y 0,27% de ácido trifluoroacético (TFA) (Fase A) con metanol y 0,27% de TFA (Fase B) a una velocidad de flujo 1 mL/min y un tiempo de elución de las proteínas de 12 min.

En la figura 9 para concentrados precipitados a pH 2,0, se observa que la intensidad de los picos para el producto obtenido con la materia prima de los proveedores P1 (CP1) y P2 (CP2) es similar. El primer pico que sobrepasa la intensidad de 200 ua corresponde al TFA que eluye en el tiempo muerto característico. La aparición de los picos inició a un tiempo de retención de 2,2 min, las proteínas que eluyeron en estos minutos iniciales son las de mayor interacción con agua. Al minuto 3,75 se observa los picos de intensidad más alta con 65 ua que podrían marcar a proteínas resistentes. La corrida se completó con las proteínas más afines al metanol con un tiempo de retención de 7,0 min con picos que presentaron menor intensidad.



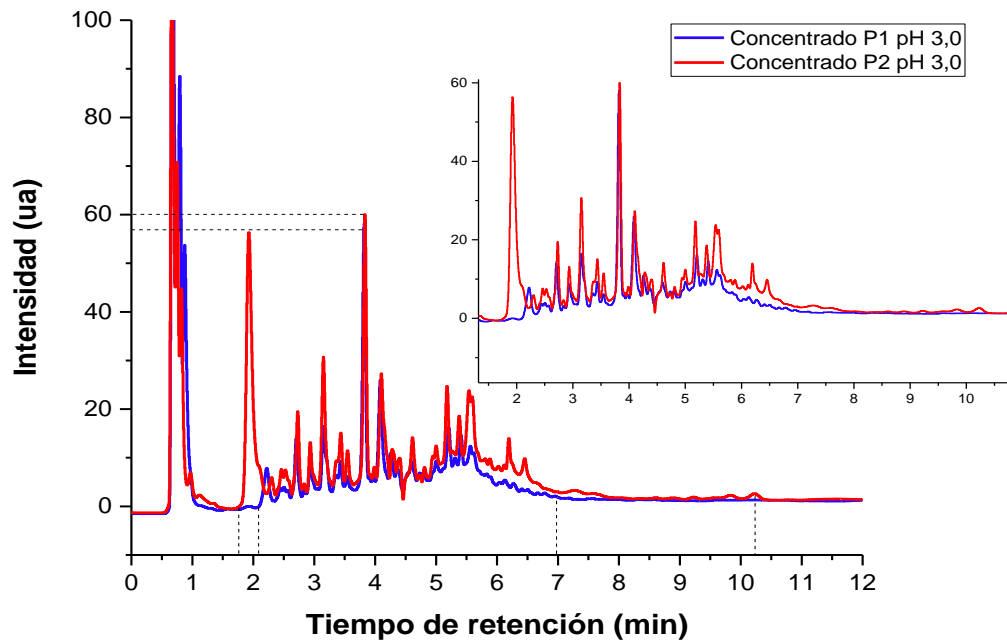
**Figura 9.** Cromatograma de los concentrados proteicos de Firiguero de los proveedores 1 y 2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 2,0. Longitud de onda de 280 nm

Para los concentrados (CP1 y CP2) obtenidos mediante precipitación a pH 3,0 con la materia prima de los dos proveedores (figura 10), se observa que hay diferencias en la intensidad de los picos. El CP2 expresó mayor intensidad y la elución de los picos



inició a un tiempo de retención de 1,8 min mientras que para el CP1 al minuto 2,1. Al minuto 3,7 aparecieron los picos de intensidad más alta con 57 ua para el CP1 y 60 ua para el CP2.

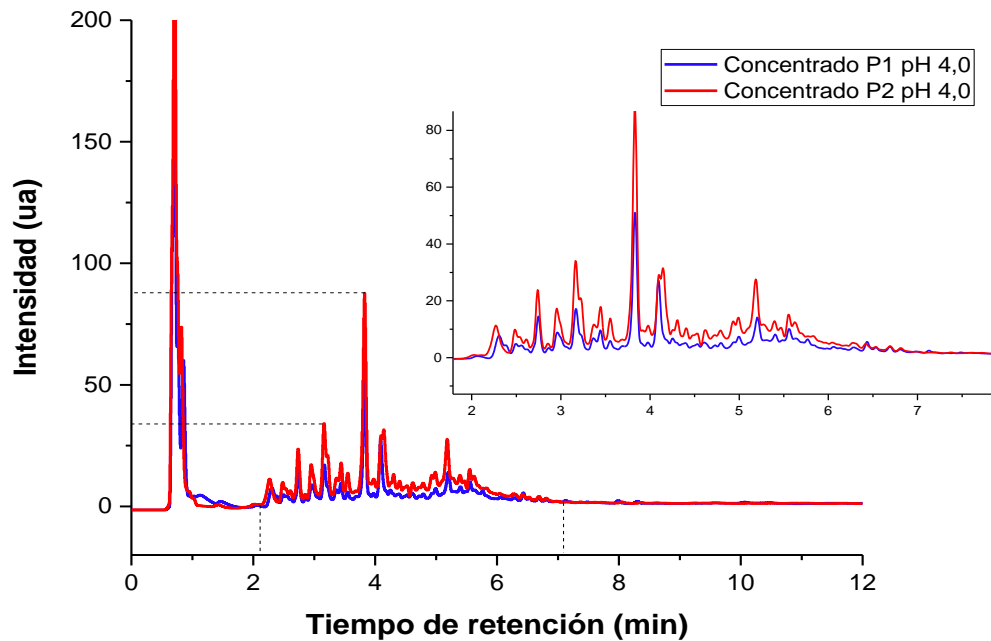
La corrida se completó en un tiempo total de retención de 7,0 min para el CP1 y de 10,25 min para el CP2.



**Figura 10.** Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 3,0. Longitud de onda de 280 nm

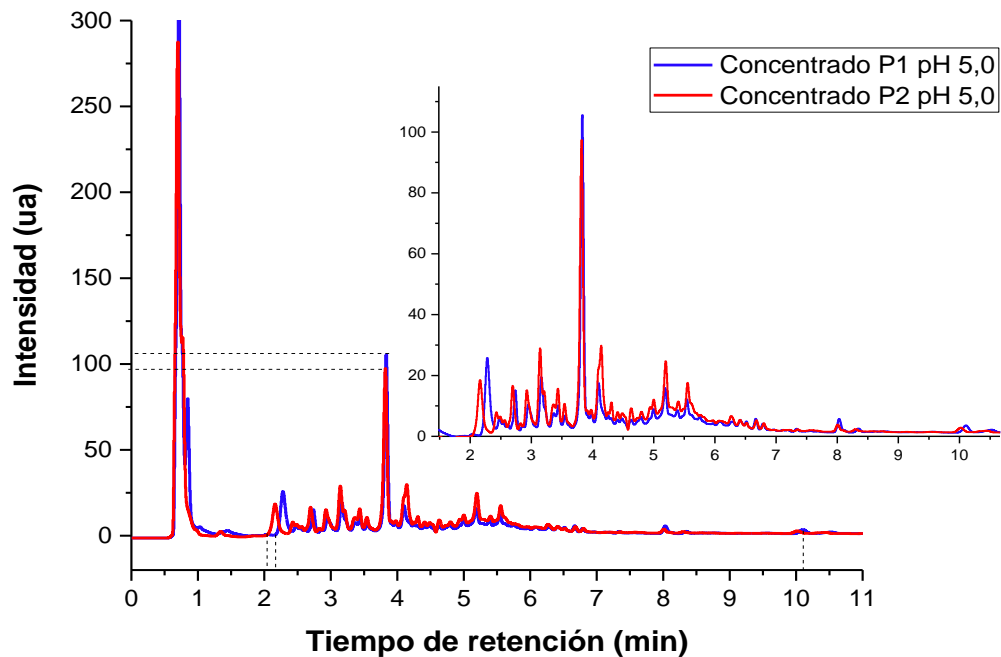
En la figura 11, se observa que la intensidad de los picos para los concentrados obtenidos a pH 4,0 con la harina de los proveedores (CP1 y CP2) presenta diferencias, el CP2 expresó mayor intensidad. Como en los análisis anteriores, la elución de los picos inició a un tiempo de retención de 2,2 min. Al minuto 3,10 se observó el pico de intensidad más alta para el CP1 con 34 ua y al minuto 3,75 con intensidad de 90 ua la formación del pico más alto para el CP2.

La corrida se completó en un tiempo de retención total de 7,10 min, observándose en el cromatograma picos de menor intensidad.



**Figura 11.** Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 4,0. Longitud de onda de 280 nm

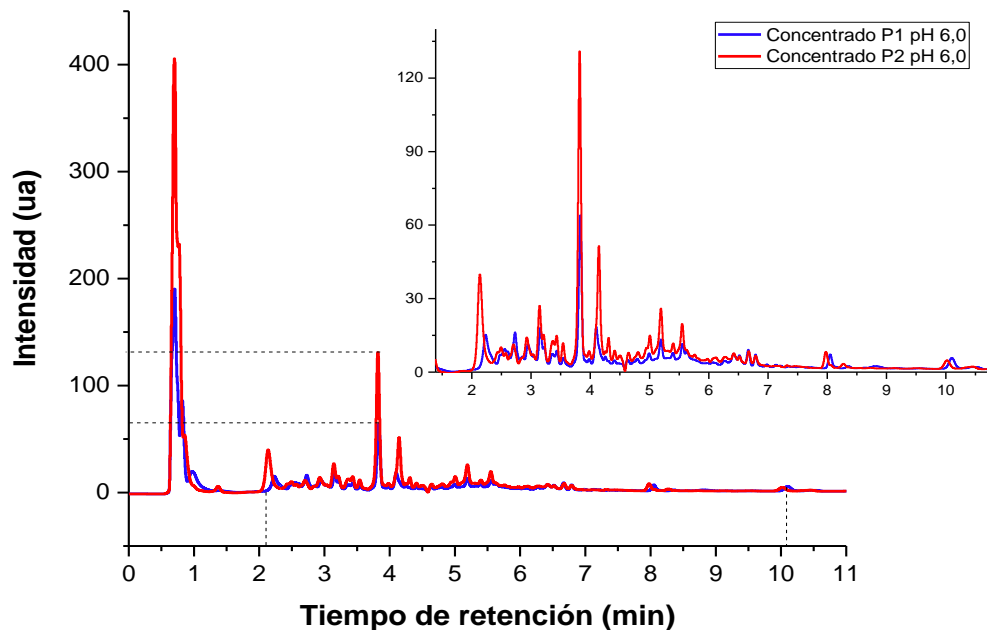
En la figura 12 para los concentrados (CP1 y CP2) obtenidos a pH 5,0, se observa que la intensidad de los picos correspondientes a los productos de los proveedores difiere en intensidad en determinados minutos. La elución de los picos inició a un tiempo de retención de 2,05 min para el CP2 y al minuto 2,2 para el CP1. Al minuto 3,7 eluyó el pico de intensidad más alta con 97,5 ua para el CP2 y 105 ua para el CP1. La corrida se completó con un tiempo de retención total de 10,10 min con picos de intensidad baja.



**Figura 12.** Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 5,0. Longitud de onda de 280 nm

La intensidad de los picos en los cromatogramas de la figura 13 para los concentrados obtenidos a pH 6,0 con la harina de los dos proveedores es menor para CP1 en comparación con los cromatogramas anteriores, en el caso de CP2 se evidenció el aumento de intensidad de los picos después del tiempo muerto del TFA. La formación de los picos inició a un tiempo de retención de 2,1 min. Al minuto 3,70 eluyeron los picos de intensidad más alta con 67 ua para CP1 y 135 ua para CP2.

La corrida se completó con un tiempo de retención total de 10,10 min con picos de menor intensidad.



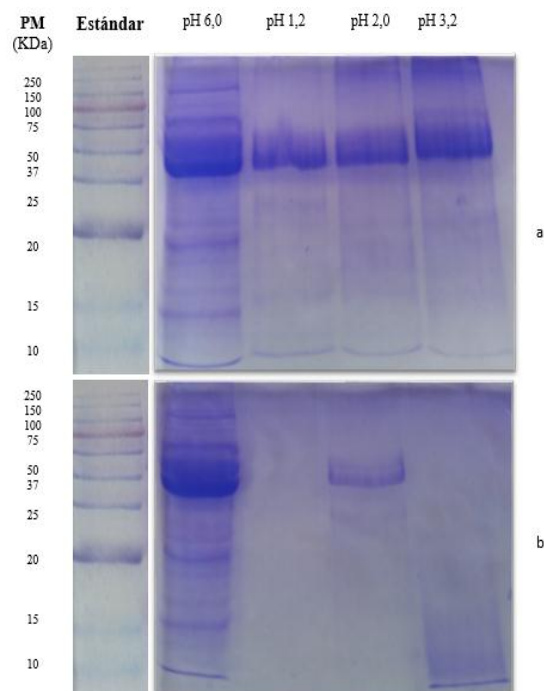
**Figura 13.** Cromatograma de los concentrados proteicos de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2) a pH de precipitación 6,0. Longitud de onda de 280 nm

#### 4.1.6. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

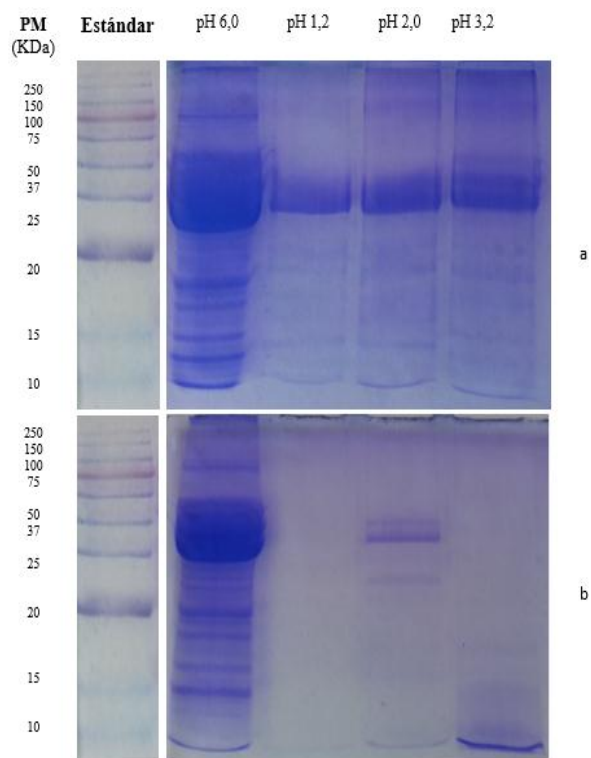
En el análisis de digestibilidad se trabajó con los concentrados del pH 6,0 de los proveedores P1 y P2 (CP1 y CP2). Se seleccionaron estos productos porque presentan un mayor contenido proteico, de acuerdo a los resultados determinados con el método de Dumas. Los concentrados se ajustaron a pHs 1,2; 2,0 y 3,2. Los hidrolizados obtenidos se analizaron por electroforesis.

- ~ Electroforesis de la fase gástrica y duodenal de los hidrolizados de P1 (HP1) y P2 (HP2) obtenidos del concentrado de pH 6,0

En las figuras 14 y 15 (partes a y b respectivamente) se aprecia que en la fase gástrica a los pHs 1,2; 2,0 y 3,2 las proteínas no son totalmente hidrolizadas, mientras que en la fase duodenal existe una hidrólisis completa por acción de la pancreatina para los pHs 1,2 y 3,2 y para el pH 2,0 se dio una hidrólisis parcial.



**Figura 14.** Electroforesis SDS-PAGE del concentrado obtenido por precipitación a pH 6,0 y de sus hidrolizados proteicos con materia prima del proveedor P1 (a: fase gástrica; b: fase duodenal). Pocillos 1: estándar; pocillos 2: concentrado obtenido a pH 6,0; pocillos 3, 4 y 5: hidrolizados a pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2, respectivamente.

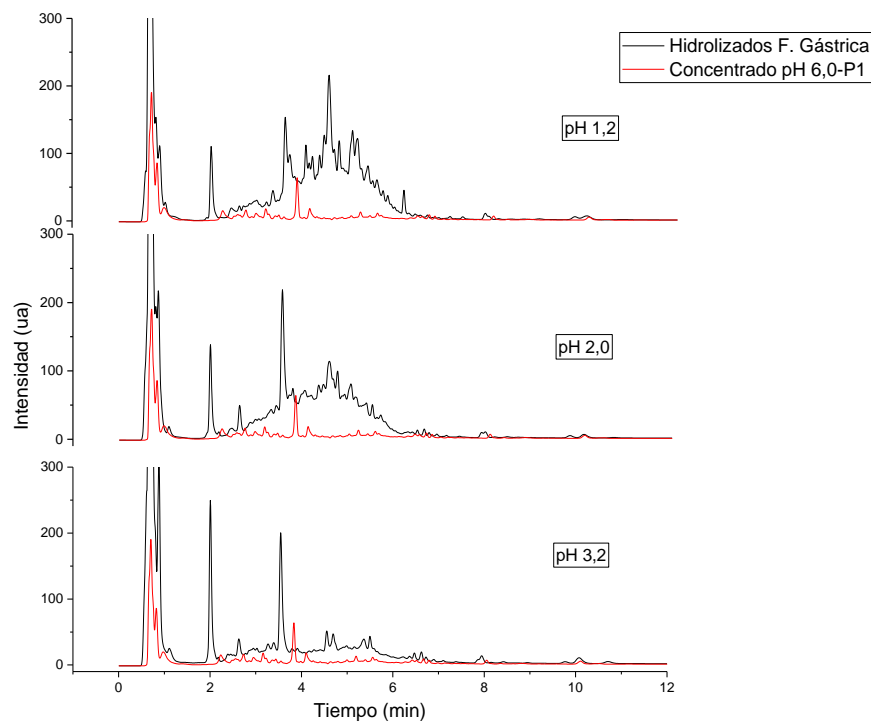


**Figura 15.** Electroforesis SDS-PAGE del concentrado obtenido por precipitación a pH 6,0 y de sus hidrolizados proteicos con materia prima del proveedor P2 (a: fase gástrica; b: fase

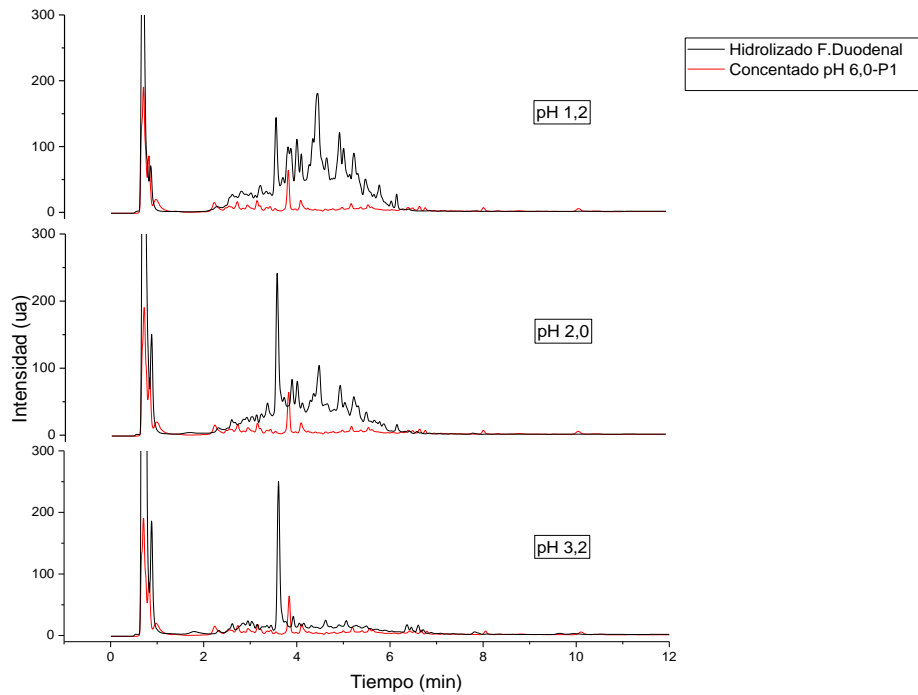
duodenal). Pocillos 1: estándar; pocillos 2 concentrado obtenido a pH 6,0; pocillos 3, 4 y 5: hidrolizados a pH 1,2; pH 2,0; pH 3,2, respectivamente.

~ Cromatografía UHPLC de la fase gástrica y duodenal del hidrolizado de P1

En las Figuras 16 y 17, se presentan los cromatogramas de los hidrolizados de la fase gástrica y duodenal frente al perfil del concentrado proteico elaborado a pH 6,0 con el material del P1 (CP1). Para los pHs 1,2 y 2,0 se observa que la hidrólisis dio mejor resultado, los hidrolizados presentan más picos lo cual indica la formación de diferentes tipos de péptidos en concentraciones que se ven reflejadas en las bandas de alta definición en los geles de la figura 14 parte a. Para el pH 3,2 los picos formados presentaron menor intensidad (ua).



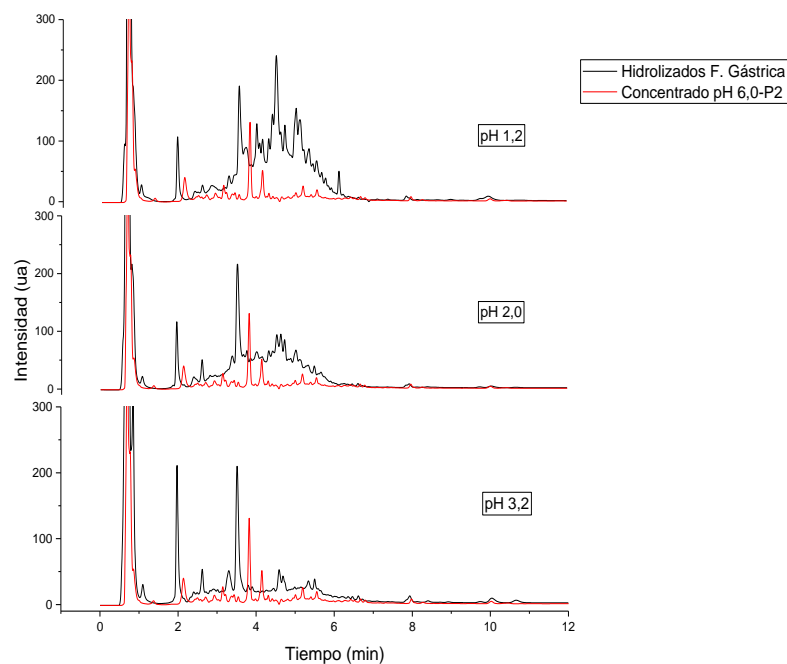
**Figura 16.** Cromatogramas del concentrado proteico obtenido a pH 6,0 del Firiguero del P1 (CP1) y de los hidrolizados de la fase gástrica a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm



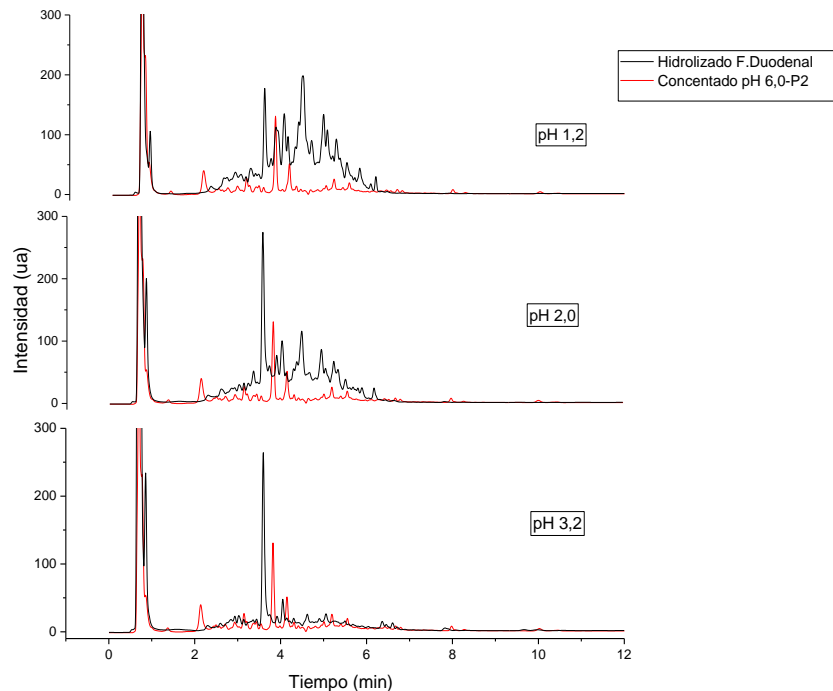
**Figura 17.** Cromatogramas del concentrado proteico elaborado a pH 6,0 con el Firiguero del P1 (CP1) y los hidrolizados de la fase duodenal obtenidos con los productos de la fase gástrica realizada a pH 1,2; 2,0 y 3,2 Longitud de onda de 280 nm

~ Cromatografía de la fase gástrica y duodenal de los concentrados del P2 (CP2)

En las Figuras 18 y 19, se presentan los cromatogramas de los hidrolizados de la fase gástrica y duodenal frente al perfil del concentrado proteico obtenido a pH 6,0 con el material del P2 (CP2). Para los pHs 1,2 y 2,0 se observó que el efecto de la hidrólisis dio resultado de igual forma que con el CP1, con la formación de los péptidos. Para la hidrólisis a pH 3,2 los picos formados presentaron menor intensidad.



**Figura 18.** Cromatogramas del concentrado proteico precipitado a pH 6,0 con la harina del P2 (CP2) y de los hidrolizados de la fase gástrica a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm



**Figura 19.** Cromatogramas del concentrado proteico del P2 (CP2), preparado a pH 6,0 y de los hidrolizados de la fase duodenal obtenidos con los productos de la fase gástrica realizada a pH 1,2; 2,0 y 3,2. Longitud de onda de 280 nm



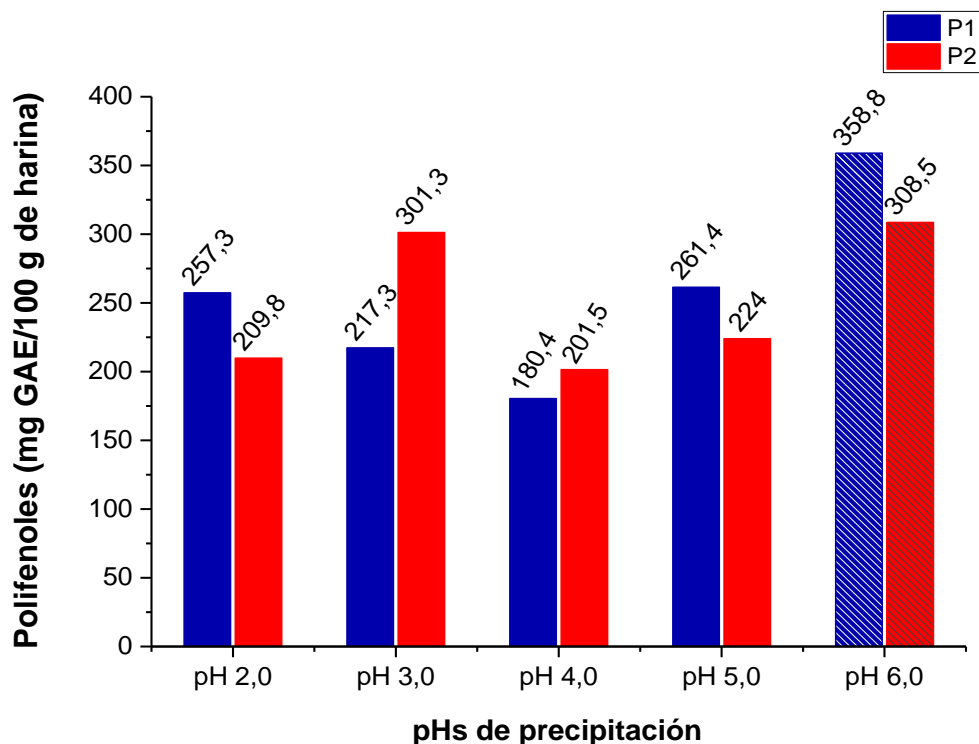
#### **4.1.7. Determinación del contenido de polifenoles de Firiguero (*Vigna unguiculata* L.)**

Los compuestos fenólicos tienen una amplia distribución en las plantas, su presencia predomina principalmente en frutas, verduras, semillas y plantas medicinales, estos compuestos están directamente asociados con la calidad nutricional y sensorial de los alimentos puesto que en concentraciones bajas actúan como agentes antioxidantes que directamente benefician a los sistemas biológicos (Imeh y Khokhar, 2002).

En la Figura 20 se muestra los valores de antioxidantes expresados como mg de GAE/100 g de harina para los sobrenadantes obtenidos en la precipitación isoeléctrica a los 5 pH de experimentación con la materia prima de los proveedores P1 y P2.

Para los sobrenadantes del P1, se cuantificó un valor de 358,8 mg GAE/100 g de harina a pH 6,0 y para los sobrenadantes del P2 se obtuvo un valor de 308,5 mg GAE/100 g de harina al mismo pH, en tanto que a pH 4,0 la cantidad de polifenoles es menor para los sobrenadantes de los dos proveedores.

Diferentes estudios revelan la presencia de distintos valores de polifenoles. En la investigación realizada por López-Bressani (2008) que trabajaron con la variedad de color negro Peruchin Negro de *Vigna unguiculata* el contenido fue de 280 mg catecol/100 g de muestra, las variaciones se pueden relacionar con el estándar utilizado y la variedad. En otro estudio se realizó la caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol *Caupí Vigna unguiculata* L. cultivado en Colombia y se reportó un contenido polifenólico de  $2066,80 \pm 0,74$  mg/100g, valor más alto en comparación con otras variedades de *Caupí* anteriormente analizadas (Vargas et al., 2012).

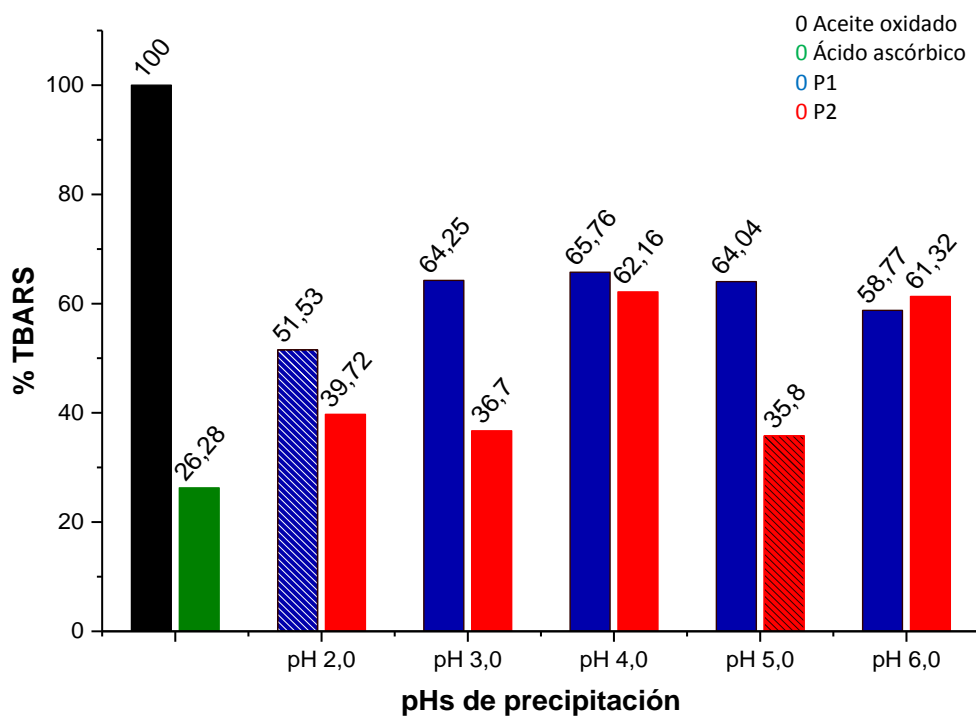


**Figura 20.** Contenido de fenoles totales de los sobrenadantes de Firiguero a diferentes pHs de precipitación. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. Las barras azules identifican al proveedor 1 y las barras rojas al proveedor 2

#### 4.1.8. Análisis de la actividad antioxidante (Método TBARS)

En la Figura 21 se muestra la formación en porcentaje, de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que presentó el aceite de oliva comercial incubado a 100°C por 48 h en presencia de las proteínas de Firiguero. Además, inicialmente se trabajó con el antioxidante comercial BHT como control frente al cual se compararon las muestras, evidenciándose que no presentó el efecto esperado; por esta razón se decidió trabajar con ácido ascórbico, el cual actúa como un aceptor de oxígeno creando medios desoxigenados. El estudio realizado por Maestro-Borja (1993) indica que el ácido ascórbico retarda la oxidación de los aceites sometidos a condiciones extremas con mejor eficiencia que el BHT.

De forma global, los concentrados obtenidos con la materia prima de P2 (CP2) presentaron efectivamente un mayor efecto protector el cual se evidencia a través de la menor formación de TBARS. Para CP1 a pH 2,0 el porcentaje de TBARS fue 51,92% y para CP2 a pH 5,0 fue 35,80%.



**Figura 21.** Actividad antioxidante de las proteínas de Firiguero, evaluadas mediante incubación por 48 horas a 100 °C con aceite de oliva comercial. Los valores expuestos en el gráfico representan la media de 3 réplicas. La barra negra identifica al aceite oxidado (control positivo), la barra verde identifica al ácido ascórbico, las barras azules identifican al concentrado del proveedor 1, las barras rojas al concentrado del proveedor 2.

#### 4.2. Verificación de la hipótesis

Los resultados de caracterizar las proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) y de sus hidrolizados mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas conducen a la aceptación de la hipótesis alternativa, ya que experimentalmente los hidrolizados de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) revelaron ser digeribles en el organismo al ser evaluados en ensayos *in vitro*, presentando hidrólisis completa luego de la digestión duodenal cuando la hidrólisis gástrica se realiza a pH 1,2 y 3,2, luego de la digestión gástrica duodenal.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- ~ Se aisló las proteínas de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) de dos proveedores por precipitación isoelectrica a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0 luego de la solubilización de las proteínas solubilización a pH 8,0.
- ~ Se caracterizó las proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) mediante técnicas electroforéticas y cromatográficas. En la electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) y ausencia del agente reductor 2-ME se obtuvieron bandas bien definidas, donde los concentrados preparados con la materia prima del proveedor 1 presentó bandas correspondientes a las globulinas 7S y subunidades  $\alpha$  de las mismas. Respecto al proveedor 2, se observó que los concentrados proteicos presentaron también las mismas proteínas de almacenamiento. Se evidenció también la presencia de subunidades ácidas y básicas de las globulinas 11S. En el análisis de los concentrados proteicos de los dos proveedores por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reserva se obtuvieron cromatogramas muy similares, tanto en intensidades de los compuestos observados como en los tiempos de retención, los picos que eluyeron en los tiempos iniciales revelaron ser proteínas afines con el agua y los picos que eluyeron a tiempos de retención mayores corresponden a las proteínas afines con el metanol.
- ~ Los mejores rendimientos de extracción proteica a partir de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*), se alcanzaron a los pHs 3,0; 4,0 y 5,0. Con la harina del proveedor 1 se obtuvo mayor eficiencia de extracción proteica con un rendimiento máximo de 17,45%.

- ~ Se simuló condiciones fisiológicas para la hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*). Los concentrados sometidos a la fase gástrica a pHs 1,2; 2,0 y 3,2 no fueron totalmente hidrolizados, pero se obtuvo una hidrólisis completa en la fase duodenal por acción de la pancreatina. Hecho que se evidenció a través del análisis electroforético de los concentrados e hidrolizados.
- ~ El contenido más alto de polifenoles en los sobrenadantes obtenidos de la precipitación isoelectrica de la harina de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) fue de 356,8 mg GAE/100 g de harina para el proveedor 1 y de 308,5 mg GAE/100 g de harina para el proveedor 2 a pH 6,0.
- ~ La actividad antioxidante de los concentrados proteicos de Firiguero (*Vigna unguiculata L.*) evaluada mediante la prueba de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) usando aceite de oliva comercial, demostró que la muestra de concentrado del proveedor 2 preparada por precipitación a pH 5,0 presentó menor formación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico con porcentaje de 35,80 evidenciando la mayor protección proporcionada por el concentrado.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- ~ A pesar de que el contenido graso de la harina es bajo, se recomienda trabajar con harina desengrasada porque en el proceso de separación del sobrenadante, luego de la precipitación isoelectrica, se nota la presencia de una ligera capa grasa. Además, la eliminación de la grasa permite evaluar el contenido proteico con el reactivo de Biuret cuyos componentes son fácilmente disponibles en nuestro medio.
- ~ Para evitar contaminaciones en los geles se recomienda un almacenamiento en seco con procedimientos adecuados que permitan que los geles se sequen, sin

causar ruptura, deformación, pérdida de color o definición de las bandas. Métodos reportados en investigaciones indican que los geles pueden ser conservados hasta dos años sin evidenciar variaciones.

- ~ Emplear el concentrado proteico de Frijolero (*Vigna unguiculata L.*) como ingrediente funcional aplicado a la industria alimentaria ya que este estudio reveló un buen porcentaje proteico obtenido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J. y Rivera, M. (2008). Study of Some Physicochemical and Functional Properties of Quinoa (*Chenopodium Quinoa Willd*) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2)(12), 4745-4750. doi: 10.1021/jf703689u
- Acción-Ecológica. (1999). Soberanía alimentaria. *Boletín Alerta Verde*, 80.
- Alonso, B. O., Rovir, R. F., Vegas, C. A. y Pedrosa, M. M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad dietética*, 14(2), 72-76.
- Amigo, B. M. (2007). *Efecto de la desglicosilación enzimática en la antigenicidad del alérgeno  $\beta$ -conglucina (7s globulina) de soja*. (Diploma de Estudios Avanzados), Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias de la, Madrid-España. Retrieved from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/21710/1/Amigo-Benavent%20DEA%20sep07.pdf>
- Araméndiz, T. H., Cardona, A. C. E. y Combatt, C. E. (2016). Contenido Nutricional de Líneas de Fríjol Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Seleccionadas de una Población Criolla. *Información tecnológica*, 27, 53-60.
- Arts, I. y Hollman, P. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *PubMed*, 81, 317S-325S.
- Avanza, M. y Añón, M. (2008). Aislamiento y caracterización físicoquímicas y funcional de proteínas de caupí (*Vigna Unguiculata*). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- BIO-RAD. (2011). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection.
- Bossios, A., Theodoropoulou, M., Mondoulet, L., Rigby, N. M., Papadopoulos, N. G., Bernard, H., et al. (2011). Effect of simulated gastro-duodenal digestion on the allergenic reactivity of beta-lactoglobulin. *Clinical and Translational Allergy*, 1(1), 1-11. doi: 10.1186/2045-7022-1-6
- Canelones, C. y Castejon, M. (2006). Harinas de planta entera de frijol (*Vigna unguiculata*) y de mazorca de maíz (*Zea mays*) como suplemento para becerros antes del destete. *Zootecnia Tropical*, 24, 361-378.
- Córsico, B., Falomir, L. L., Franchini, G. y Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas* (E. i. l. R. d. E. U. N. (REUN) Ed. 1a ed.). La Plata.
- Ehlers, J. y Hall, A. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53(1), 187-204.
- FAO. (2016a). BENEFICIOS NUTRICIONALES DE LAS LEGUMBRES. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i5384s.pdf>
- FAO. (2016b). Legumbres semillas nutritivas para un futuro sostenible 196. publications-sales@fao.org.
- García, M. E., Fernández, S. I. y Fuentes, L. A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu*. ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia: Departamento de Tecnología de Alimentos.
- García, P. H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *I(2)*, 31-41.
- Gregorio, J., Lanza, P., Churión, C. y Gómez, N. (2016). Comparación entre el método Kjeldahl tradicional y el método Dumas automatizado (n cube) para la

- determinación de proteínas en distintas clases de alimentos. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28 (2), 1-9.
- Imeh, U. y Khokhar, S. (2002). Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22), 6301–6306.
- INIAP. (2012). GRANOS ANDINOS "Redescubriendo conocimientos y sabores". *Boletín divulgativo n° 425*, 28.
- INIAP. (2016). Análisis físico químico de alimentos. 2016, from [http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com\\_content&view=article&id=89&Itemid=95](http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=89&Itemid=95)
- Izquierdo Hernández, A., Armenteros Borrell, M., Lancés Cotilla, L. y Martín González, I. (2004). Alimentación saludable. *Revista Cubana de Enfermería*, 20, 1-1.
- Laurena, A. C., García, V. V. y Mendoza, E. M. (1987). Effects of heat on the removal of polyphenols and in vitro protein digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 37(2), 183-192. doi: 10.1007/bf01092054
- López, G. C. M. y Bressani, R. (2008). Uso del cowpea (*Vigna unguiculata*) en mezclas con frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58, 71-80.
- Luna, J. A. (2006). Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. *Investigación y Ciencia*, 14, 29-34.
- Maestro, R. y Borja, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 44(2), 107-111.
- Maldonado, A. A. y Jorrín, N. J. (2001). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*.
- Marrugo-Ligardo, Y. A., Montero-Castillo, P. M. y Duran-Lengua, M. (2016). Evaluación Nutricional de Concentrados Proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*. *Información tecnológica*, 27, 107-114.
- Martínez, E. N. y Añón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530. doi: 10.1021/jf960169p
- Meyer, W. E. (1971). Oilseed protein concentrates and isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(9), 484-488. doi: 10.1007/bf02544666
- Montenegro, G., Santander, F., Jara, C., Nuñez, G. y Fredes, C. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas.
- Murillo, A. W., Solanilla, D. J., Vargas, A. Y., Murillo, P. E. y Villamil, L. O. (2012). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y NUTRICIONAL DE LA HARINA DE FRIJOL CAUPÍ *Vigna Unguiculata* L. CULTIVADO EN COLOMBIA. *Vitae*, 19, S320-S321.
- Nielsen, S. (2010). *Food Analysis Laboratory Manual* (Second Edition ed.). New York Dordrecht Heidelberg London.
- Oseguera, T. M. (2009). *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTI-INFLAMATORIA DE HIDROLIZADOS DE PROTEINA DE DOS VARIEDADES DE FRIJOL*



- COMUN. (Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos), Centro Universitario Querétaro México.
- Pinciroli, M. (2010). *Proteínas de arroz propiedades estructurales y funcionales*. (Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos), Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires. Retrieved from [http://163.10.34.134/bitstream/handle/10915/1828/Documento\\_completo\\_.pdf?sequence=3](http://163.10.34.134/bitstream/handle/10915/1828/Documento_completo_.pdf?sequence=3) (1)
- Rajamohamed, S. H., Aryee, A. N. A., Hucl, P., Patterson, C. A. y Boye, J. I. (2013). In vitro Gastrointestinal Digestion of Glabrous Canaryseed Proteins as Affected by Variety and Thermal Treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 306-312. doi: 10.1007/s11130-013-0374-9
- Ramírez, O. M. (Ed.). (2015). *Tendencias de innovación en la ingeniería* (1ra edición ed.): OmniaScience (Omnia Publisher SL).
- Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C. y Ferreira, S. T. (2003). Functional Properties of Purified Vicilins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and Cowpea Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5792-5797. doi: 10.1021/jf0340052
- Rangel, A., Saraiva, K., Schwengber, P. c., Narciso, M. S., Domont, G. B., Ferreira, S. T., et al. (2004). Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Food Chemistry*, 87(4), 491-499. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.023>
- Rojano, B. A., Gaviria, C. A. y Sáez, J. A. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 15, 212-218.
- Sacristán, M., Díaz, P. E., Borja, A. A., Córdoba, C. y Legaz, G. M. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. *Reduca (Biología)*, 4, 48-78.
- Sharma, A. y Sharma, S. (2014). Effect of nitrogen and sulphur nutrition on yield parameters and protein composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Journal of Applied and Natural Science*, 1-7.
- Silva, S. M. d. S. e. y Freire, F. F. (1999). *PROTEÍNAS DE FEIJÃO CAUPI [ VIGNA UNGUICULATA (L). WALP]: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NUTRICIONAL* (Vol. 44). Teresina, PI: Embrapa Mei~Norte.
- Umaña, J., Álvarez, C., Lopera, S. M. y Gallardo, C. (2010). CARACTERIZACIÓN DE HARINAS ALTERNATIVAS DE ORIGEN VEGETAL CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA FORMULACIÓN DE ALIMENTOS LIBRES DE GLUTEN.
- Utsumi, S. (1992). Plant Food Protein Engineering. 36, 89-208. doi: 10.1016/s1043-4526(08)60105-9
- Vargas, A. Y., Villamil, L. O., Murillo, P. E. y Solanilla, D. J. (2012). Caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol Caupí *Vigna unguiculata* L. cultivado en Colombia. *Vitae*, 19(1), S320-S321.
- Xiong, H., Shi, A., Mou, B., Qin, J., Motes, D., Lu, W., et al. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *PLoS One*, 11, 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0160941

# **ANEXO A**

## **ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE FIRIGUERO**

**Tabla 6.** Análisis de humedad de la harina de Firiguero

Réplica	W cápsula (g)	W muestra (g)	W cap. + muestra 24 horas desp. (g)	W muestra 24 horas desp. (g)	Humedad (g)	Humedad (%)	Promedio Humedad (%)	D.E	C.V	
P1	1	96,437	2,006	98,226	1,790	89,235	10,765	10,94	0,15	1,42
	2	93,345	2,018	95,140	1,795	88,967	11,033			
	3	91,248	2,029	93,054	1,805	88,966	11,034			
P2	1	93,484	2,014	95,283	1,799	89,313	10,687	10,67	0,07	0,69
	2	94,607	2,055	96,441	1,834	89,259	10,741			
	3	92,566	2,031	94,381	1,816	89,404	10,596			

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Tabla 7.** Análisis de cenizas de la harina de Firiguero

Réplica	W cápsula (g)	W muestra (g)	W cápsula + cenizas (g)	Cenizas (g)	Cenizas (%)	Promedio Cenizas (%)	D.E	C.V	
P1	1	31,682	2,005	31,750	0,068	3,396	3,42	0,07	2,16
	2	21,056	2,043	21,124	0,069	3,354			
	3	22,085	2,002	22,155	0,070	3,497			
P2	4	23,716	2,008	23,783	0,066	3,292	3,34	0,07	2,09
	5	23,861	2,005	23,929	0,069	3,422			
	6	24,660	2,089	24,729	0,069	3,313			

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Tabla 8.** Análisis de grasa de la harina de Firiguero

	Réplica	Grasa (%)	Promedio Grasa (%)	D.E	C.V
P1	1	1,150	1,15	0,01	0,47
	2	1,157			
P2	1	2,351	2,07	0,39	19,02
	2	1,794			

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

# **ANEXO B**

## **RENDIMIENTO PROTEICO DE PROTEÍNA DE FIRIGUERO A DIFERENTES pHs DE PRECIPITACIÓN**

**Tabla 9.** Rendimientos de la extracción proteica de Firiguero

	Tratamiento	Rendimiento (%)	C.V
P1	pH2	13,21 <sup>A</sup> ± 0,61	4,65
	pH3	17,23 <sup>B</sup> ± 0,34	1,95
	pH4	17,45 <sup>B</sup> ± 0,77	4,39
	pH5	15,58 <sup>AB</sup> ± 0,39	2,52
	pH6	13,46 <sup>A</sup> ± 1,35	10,06
P2	pH2	12,80 <sup>A</sup> ± 0,25	1,98
	pH3	16,23 <sup>B</sup> ± 0,48	2,95
	pH4	15,14 <sup>B</sup> ± 0,19	1,25
	pH5	15,04 <sup>B</sup> ± 0,67	4,48
	pH6	12,29 <sup>A</sup> ± 0,34	2,76

Los valores que se reportan en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Medias con una letra común dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Tabla 10.** Datos de pesos de la materia prima y del liofilizado y de los rendimientos de extracción de proteína obtenidos para los cinco pHs de precipitación

		Wo prima R1	Wo m.prima R2	Wf liofilizado R1	Wf liofilizado R2	Rendimiento R1	Rendimiento R2	Rendimiento (%)
P1	pH2	5,08	5,01	0,69	0,64	13,64	12,77	13,21
	pH3	5,09	5,02	0,89	0,85	17,47	16,99	17,23
	pH4	5,07	5,03	0,86	0,90	16,90	17,99	17,45
	pH5	5,08	5,12	0,78	0,81	15,30	15,86	15,58
	pH6	5,00	5,10	0,63	0,74	12,50	14,42	13,46
P2	pH2	5,00	4,99	0,63	0,65	12,62	12,98	12,80
	pH3	4,99	5,01	0,79	0,83	15,89	16,57	16,23
	pH4	5,01	5,00	0,77	0,75	15,28	15,01	15,14
	pH5	5,00	5,00	0,73	0,78	14,56	15,51	15,04
	pH6	5,00	5,02	0,63	0,60	12,53	12,05	12,29

Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

# **ANEXO B-1**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO PROTEICO DE LA HARINA DE FIRIGUERO PROVEEDOR 1**

**Tabla 11.** Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rendimiento (%)	10	0,93	0,83	5,24

**Tabla 12.** Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,78	5	6,56	10,11	0,0218
Réplicas	0,49	1	0,49	0,76	0,4326
pH	32,29	4	8,07	12,44	0,0158
Error	2,59	4	0,65		
Total	35,38	9			

**Tabla 13.** Test Tukey Alfa= 0, 05 DMS= 3, 58061 Error: 0, 6487 gl: 4

pH	Medias	n	E.E.	Grupos homogéneos
2	13,21	2	0,57	A
6	13,46	2	0,57	A
5	15,58	2	0,57	AB
3	17,23	2	0,57	B
4	17,45	2	0,57	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

# **ANEXO B-2**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO PROTEICO DE LA HARINA DE FIRIGUERO PROVEEDOR 2**



**Tabla 14.** Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Rendimiento (%)	10	0,97	0,93	3,02

**Tabla 15.** Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22,69	5	4,54	24,36	0,0043
Réplicas	0,15	1	0,15	0,83	0,4150
pH	22,54	4	5,63	30,25	0,0030
Error	0,75	4	0,19		
Total	23,44	9			

**Tabla 16.** Test Tukey Alfa= 0, 05 DMS= 1, 91875 Error: 0, 1863 gl: 4

pH	Medias	n	E.E.	Grupos homogéneos
6	12,29	2	0,31	A
2	12,80	2	0,31	A
5	15,04	2	0,31	B
4	15,15	2	0,31	B
3	16,23	2	0,31	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

# **ANEXO C**

## **ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEICO POR EL MÉTODO DE DUMAS**

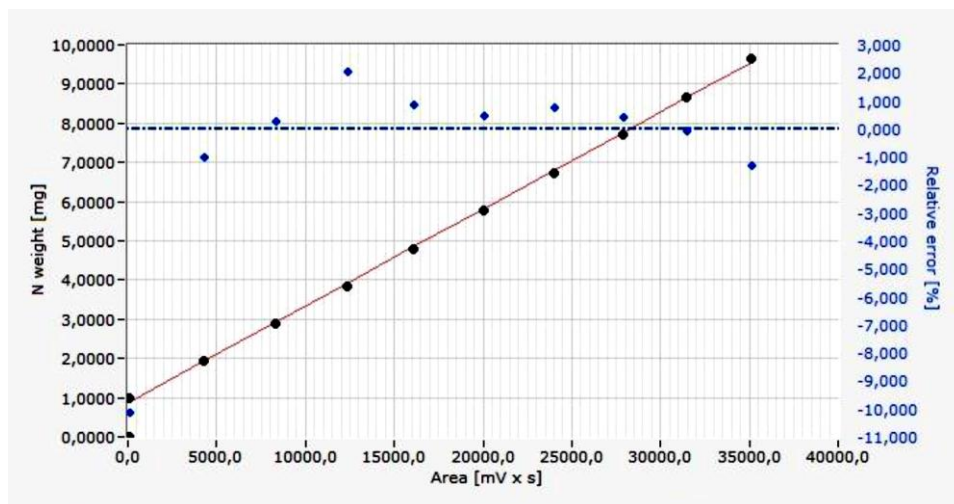


Figura 22. Curva de calibración obtenida con el equipo Dumas

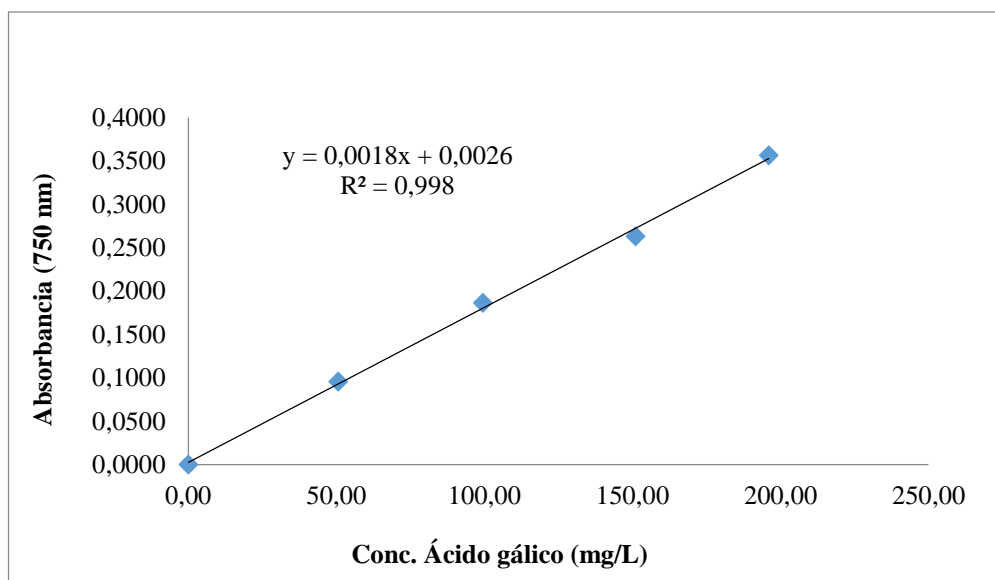
Tabla 17. Datos obtenidos del análisis del contenido proteico de los concentrados de Firiguero por el método Dumas

	Tratamiento	W muestra (mg)	Flujo de O <sub>2</sub> (mL/min)	Proteína factor	Área (mV x s)	N (%)	N (mg)	Proteína (%)
P1	pH2	50,630	400	5,7	21402,2	10,113	5,1200	57,64
	pH3	50,600	400	5,7	21922,1	10,386	5,2551	59,20
	pH4	50,890	400	5,7	20672,8	9,688	4,9303	55,22
	pH5	51,090	400	5,7	22593,0	10,627	5,4294	60,57
	pH6	50,260	400	5,7	22320,9	10,662	5,3587	60,77
P2	pH2	50,820	400	5,7	20742,8	9,737	4,9485	55,50
	pH3	50,850	400	5,7	20622,8	9,67	4,9173	55,12
	pH4	50,910	400	5,7	21738,2	10,229	5,2073	58,30
	pH5	50,640	400	5,7	21463,0	10,142	5,1358	57,81
	pH6	50,020	400	5,7	22984,9	11,058	5,5310	63,03

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

# **ANEXO D**

## **ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES**



**Figura 23.** Curva estándar de ácido gálico

**Tabla 18 .** Contenido de polifenoles de los sobrenadantes obtenidos en la precipitación de proteínas de Firiguero

	Tratamiento	Polifenoles (mg GAE)	C.V.
<b>P1</b>	pH2	257,32 ± 0,97	0,38
	pH3	217,30 ± 0,64	0,30
	pH4	180,44 ± 2,58	1,43
	pH5	261,42 ± 0,32	0,12
	pH6	358,78 ± 0,32	0,09
<b>P2</b>	pH2	209,85 ± 1,93	0,92
	pH3	301,25 ± 1,16	0,39
	pH4	201,47 ± 0,56	0,28
	pH5	224,00 ± 0,32	0,14
	pH6	308,51 ± 0,64	0,21

Los valores que se reportan en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Tabla 19.** Datos obtenidos en el análisis del contenido de polifenoles de los sobrenadantes de Firiguero

	Tratamiento	Absorbancia 750 nm			Polifenoles (mg GAE/100 g)		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
P1	<b>pH2</b>	0,46	0,46	0,47	256,76	256,76	258,44
	<b>pH3</b>	0,39	0,39	0,39	216,55	217,67	217,67
	<b>pH4</b>	0,33	0,33	0,32	181,93	181,93	177,46
	<b>pH5</b>	0,47	0,47	0,47	261,23	261,23	261,79
	<b>pH6</b>	0,64	0,65	0,65	358,40	358,96	358,96
P2	<b>pH2</b>	0,38	0,38	0,38	208,73	212,08	208,73
	<b>pH3</b>	0,54	0,54	0,54	300,32	300,88	302,56
	<b>pH4</b>	0,36	0,36	0,36	200,91	201,47	202,03
	<b>pH5</b>	0,40	0,40	0,40	223,81	223,81	224,37
	<b>pH6</b>	0,55	0,55	0,56	308,14	308,14	309,26

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Ejemplo de Cálculo:**

$$\frac{257,32 \text{ mg}}{L} * \frac{1 L}{1000 \text{ mL}} * \frac{100 \text{ mL (volumen empleado)}}{10 \text{ g de harina}} * 100 \text{ g} = 257,32 \text{ mg GAE/100 g}$$

**ANEXO E**

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD**

**ANTIOXIDANTE**

**Tabla 20.** Porcentaje de formación de TBARS

	Tratamiento	Promedio	C.V.
<b>P1</b>	pH2	51,53 ± 1,40	2,73
	pH3	64,25 ± 6,93	10,79
	pH4	65,76 ± 4,10	6,23
	pH5	64,04 ± 10,91	17,04
	pH6	58,77 ± 19,67	33,46
<b>P2</b>	pH2	39,72 ± 10,79	27,17
	pH3	36,70 ± 9,09	24,77
	pH4	62,16 ± 6,62	10,65
	pH5	35,80 ± 1,78	4,97
	pH6	61,32 ± 17,59	28,69

Los valores que se reportan en la tabla representan la media de las mediciones ± la desviación estándar.

\*Proveedor 1 (P1); Proveedor 2 (P2)

**Tabla 21.** Datos obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante

Proveedor	pH	Absorbancia 532 nm			Formación de TBARS (%)			
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio
<b>P1</b>	2,0	0,567	0,620	0,593	52,02	52,63	49,95	51,53
	3,0	0,609	0,755	0,796	56,60	66,04	70,11	64,25
	4,0	0,657	0,749	0,795	61,83	65,44	70,01	65,76
	5,0	0,768	0,753	0,617	73,94	65,84	52,33	64,04
	6,0	0,827	0,634	0,512	80,37	54,02	41,91	58,77
<b>P2</b>	2,0	0,343	0,526	0,576	27,59	43,30	48,26	39,72
	3,0	0,404	0,561	0,383	34,24	46,77	29,10	36,70
	4,0	0,730	0,674	0,681	69,79	57,99	58,69	62,16
	5,0	0,430	0,458	0,430	37,08	36,54	33,76	35,80
	6,0	0,838	0,592	0,619	81,57	49,85	52,53	61,32

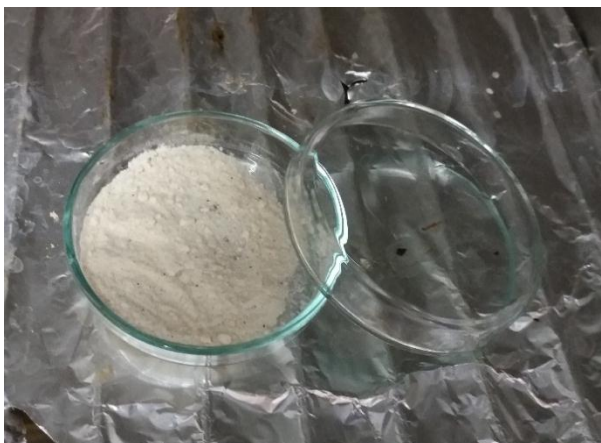


**Tabla 22.** Porcentaje de formación de TBARS de los controles de experimentación

<b>Muestras control</b>	<b>Absorbancia 532 nm</b>	<b>Formación de TBARS (%)</b>
Aceite de oliva no oxidado	0,090	0,00
Aceite de oliva oxidado	1,007	100,00
Ácido ascórbico + a. oliva	0,331	26,28
BTH + a. oliva	1,278	129,55
Aceite de soya no oxidado	0,105	1,64
Aceite de soya oxidado	1,080	107,96
Ácido ascórbico + a. soya	0,704	66,96
BTH + a. soya	1,755	181,57
P1-pH2 + a. soya	0,345	27,81
P1-pH2 + a. soya	1,273	129,01

# **ANEXO F**

## **FOTOGRAFÍAS DEL ANÁLISIS PROXIMAL DE LAS HARINAS DE FIRIGUERO**



**Figura 24.** Secado de la muestra para determinación de humedad



**Figura 25.** Extractor Soxhlet



**Figura 26.** Incineración de las muestras en la determinación de cenizas

# **ANEXO G**

## **OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS**



**Figura 27.** Solubilización de la proteína a pH 8



**Figura 28.** Centrifugación de las muestras solubilizadas a pH 8,0



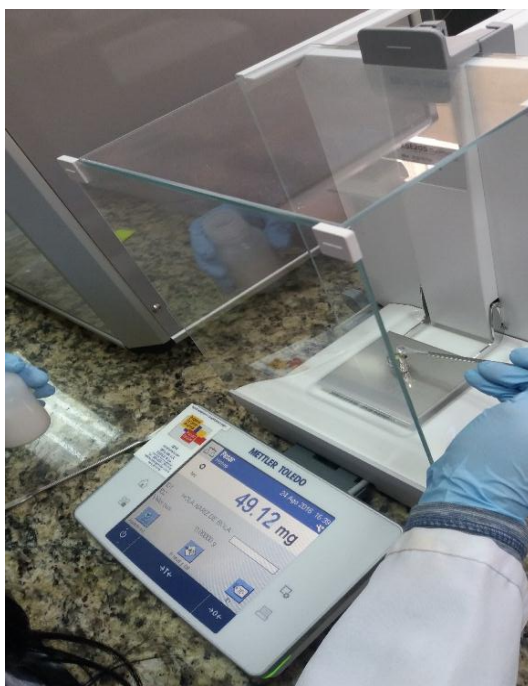
**Figura 29.** Muestras de la precipitación isoeléctrica congeladas para liofilizar

# **ANEXO H**

## **MÉTODO DE DUMAS**



**Figura 30.** Equipo de Dumas



**Figura 31.** Balanza del equipo de Dumas

# **ANEXO I**

## **TÉCNICA ELECTROFORÉTICA**

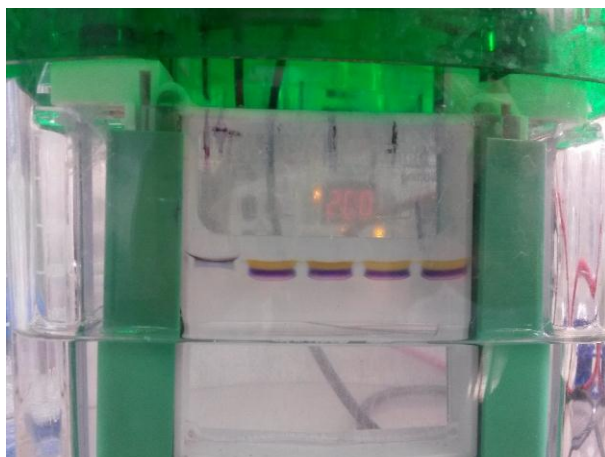




**Figura 32.** Equipo de electroforesis



**Figura 33.** Armado de las placas para la corrida



**Figura 34.** Corrida de los geles

# **ANEXO J**

## **TÉCNICA CROMATOGRÁFICA**



**Figura 35.** Equipo RP – UHPLC



**Figura 36.** Preparación de las muestras en los viales de vidrio

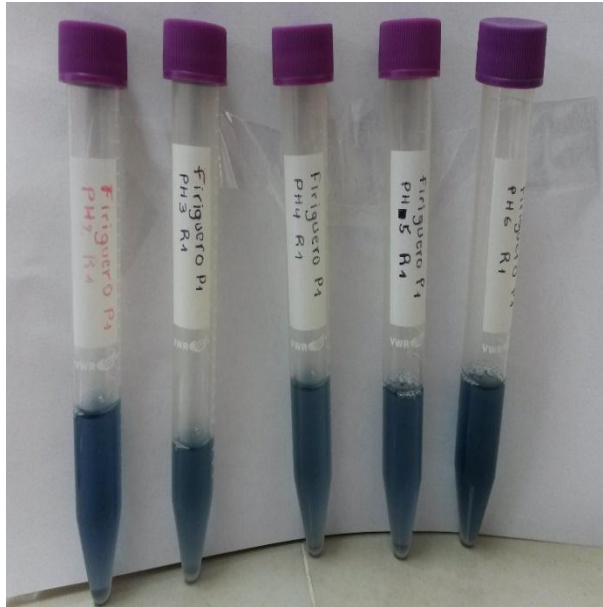


**Figura 37.** Equipo de centrifugación para las muestras

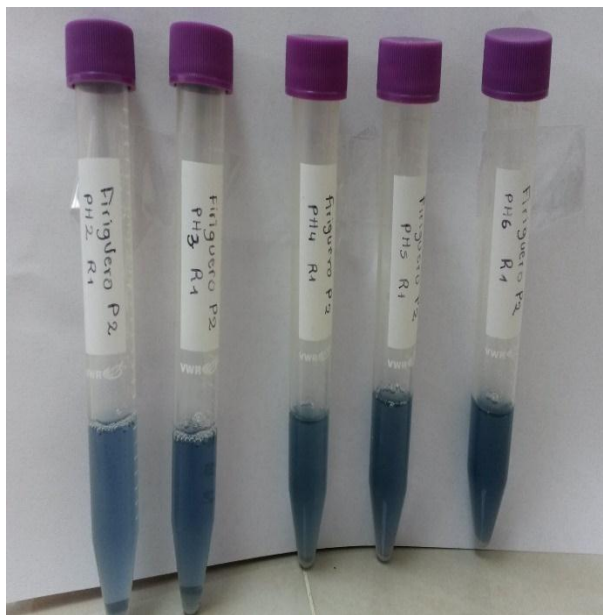
**ANEXO K**

**DETERMINACIÓN DE**

**POLIFENOLES**



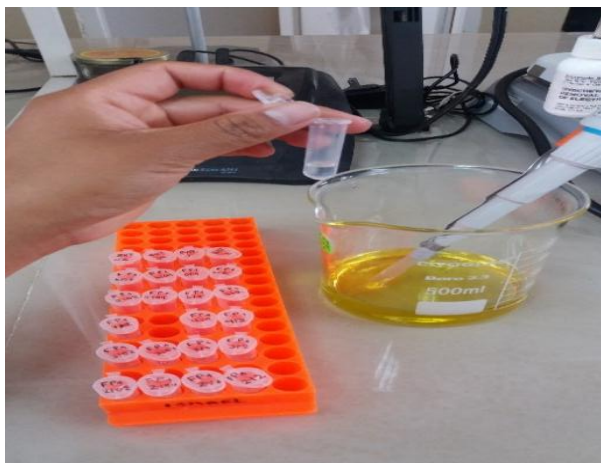
**Figura 38.** Muestras del proveedor 1 con la adición del reactivo de Folin



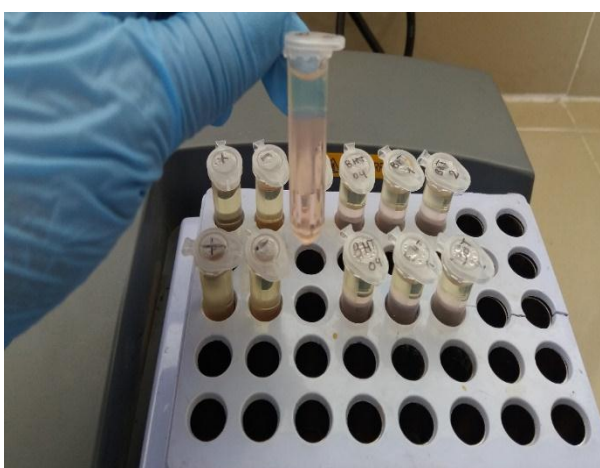
**Figura 39.** Muestras del proveedor 2 con la adición del reactivo de Folin

# **ANEXO L**

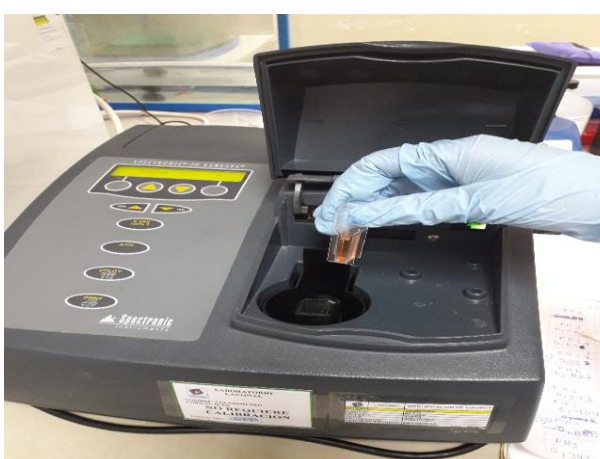
## **DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**



**Figura 40.** Preparación de las muestras



**Figura 41.** Incubación de las muestras a 100 °C para la detección de TBARS



**Figura 42.** Lectura de las muestras en el espectrofotómetro