



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).**

---

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

El estudio es parte del proyecto: “**Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana**” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0248-CU-P-2017.

**Autora:** Ana Gabriela Tello Fonseca

**Tutor:** PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

**Ambato – Ecuador**

**Julio - 2018**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

### **CERTIFICA**

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

Ambato, 13 de junio del 2018.



---

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I. 180413557-0

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Ana Gabriela Tello Fonseca, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

Srta. Ana Gabriela Tello Fonseca

C.I. 050370002-3

**AUTORA**

## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE 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 del Tribunal



---

Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

C.I. 050187395-4



---

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

Ambato, 10 de julio del 2018

## **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 no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



---

Srta. Ana Gabriela Tello Fonseca

C.I. 050370002-3

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres Miguel y Norma gracias por todo el amor y el apoyo incondicional para culminar una de mis más anheladas metas.*

*Gracias papitos por nunca dejarme caer.*

**¡LOS AMO!**

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por permitirme estar con vida, gozar de buena salud y brindarme sus bendiciones día a día para salir adelante.*

*A mis padres, Miguel y Norma por ser el pilar fundamental de mi hogar, gracias papitos por todo su amor, sus consejos, su esfuerzo diario para sacarnos adelante, es por ustedes que nunca me di por vencida y jamás lo haré.*

*A mis hermanos Romel y Mary por nunca dejarme sola y apoyarme en todo. Janeth y Fer gracias por ser como unos hermanos para mí. Paulita, David, Elian y Darielito, gracias pequeñitos por regalarme sonrisas cuando más las necesitaba, ustedes son un motor gigantesco en mi vida.*

*A todos mis amigos, quienes estuvieron a mi lado durante este proceso, gracias por hacer que cada día sea lleno de experiencias y felicidad,*

*Un agradecimiento especial a la PhD. Dayana Morales y a la Ing. Tatiana Poveda por todos los conocimientos compartidos durante el periodo de elaboración de mi tesis dentro del proyecto Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana.*

*Infinitas gracias a todos ustedes.*

*Anita*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	4
EL PROBLEMA.....	4
1.1 Tema.....	4
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
CAPITULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Antecedentes investigativos.....	7
2.2 Hipótesis.....	10
2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis.....	11
2.3.1 Variable independiente.....	11
2.3.2 Variables dependientes.....	11
CAPITULO III.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Materiales.....	12
3.1.1 Materia prima.....	12
3.1.2 Recursos materiales.....	12
3.1.3 Equipos.....	13
3.1.4 Reactivos.....	14
3.2 Métodos.....	15
3.2.1 Aislado de proteínas de haba pallar.....	15
3.2.2 Cuantificación proteica por el método de Biuret.....	15
3.2.2.1 Preparación reactivo Biuret.....	16
3.2.2.2 Preparación de la muestra.....	16
3.2.3 Cuantificación Proteica por el método de Kjeldahl.....	16
3.2.4 Electroforesis SDS-PAGE.....	17
3.2.4.1 Preparación de la muestra.....	18



3.2.4.2 Preparación del gel de poliacrilamida .....	18
3.2.5 Electroforesis Native-PAGE .....	19
3.2.6 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	19
3.2.6.1 Digestión gástrica .....	19
3.2.6.2 Digestión duodenal.....	20
3.2.7 Actividades biológicas .....	20
3.2.7.1 Actividad antiinflamatoria .....	20
3.2.7.1.1 Preparación buffer fosfato pH 6,4.....	20
3.2.7.1.2 Preparación muestra.....	21
3.2.7.2. Actividad antioxidante.....	22
3.3 Diseño experimental.....	23
CAPITULO IV .....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
4.1 Análisis y discusión de resultados .....	24
4.1.1 Aislamiento de proteína de haba pallar ( <i>Phaseolus lunatus</i> . L) .....	24
4.1.2 Rendimiento de los aislados proteicos .....	24
4.1.3 Cuantificación proteica de los aislados .....	25
4.1.3.1 Cuantificación proteica por el método de Biuret y Kjeldahl .....	25
4.1.4 Caracterización de la proteína de haba pallar por el método de electroforesis SDS - PAGE y Native - PAGE.....	28
4.1.5 Digestión gástrica y duodenal de las proteínas aisladas de haba pallar ( <i>in vitro</i> ) .....	31
4.1.6 Actividades biológicas .....	34
4.1.6.1 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar ( <i>in vitro</i> ) .....	34
4.1.6.2 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar ( <i>in vitro</i> ).....	36
4.2 Verificación de hipótesis .....	38
CAPÍTULO V .....	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	39
5.1 Conclusiones .....	39
5.2 Recomendaciones .....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
ANEXOS .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de Phaseolus lunatus. 1. ramas de floración y fructificación; 2. flor; 3. Semillas .....	1
Figura 2. Formación del complejo de Biuret. ....	26
Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferentes pH. ....	28
Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferentes pH. ....	30
Figura 5. Electroforesis Native-PAGE de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferente pH. ....	31
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas de haba pallar. (172 U/ml pepsina). PM: Estándar de peso molecular. DG: Digestión gástrica. DD: Digestión duodenal. ....	32
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas de haba pallar. (2000 U/ml pepsina). PM: Estándar de peso molecular. DG: Digestión gástrica. DD: Digestión duodenal. ....	33
Figura 8. Gráfico de medias del porcentaje de rendimiento de proteína aislada a diferente pH.....	49
Figura 9. Curva estándar de BSA.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de frijoles en América Latina.....	7
Tabla 2. Materiales de laboratorio empleados en la investigación. ....	12
Tabla 3. Equipos de laboratorio empleados en la investigación. ....	13
Tabla 4. Reactivos empleados en la investigación. ....	14
Tabla 5. Reactivos empleados en la preparación del gel de poliacrilamida.....	18
Tabla 6. Rendimiento de los aislados de proteína de haba pallar .....	25
Tabla 7. Rendimiento del contenido proteico por el método de Biuret. ....	26
Tabla 8. Rendimiento del contenido proteico por el método de Kjeldahl. ....	27
Tabla 9. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar.....	35
Tabla 10. Porcentaje de actividad antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar a diferente pH.....	37
Tabla 11. Datos obtenidos de los pesos iniciales de la muestra de harina de haba pallar y peso final, posterior a su liofilización. ....	48
Tabla 12. Datos del porcentaje de rendimiento del proceso de liofilización de cada pH por triplicado. ....	48
Tabla 13. Análisis de varianza del porcentaje de rendimiento de proteína de haba pallar.....	49
Tabla 14. Análisis estadístico del porcentaje de rendimiento de proteína de haba pallar, precipitada a diferente pH. ....	49
Tabla 15. Datos de la curva estándar de BSA .....	50
Tabla 16. Valores de absorbancia de los aislados proteicos a diferente pH, analizados por el método Biuret y medidos a 540 nm .....	51
Tabla 17. Concentración de Proteína presente en cada muestra a diferente pH .....	51
Tabla 18. Rendimiento (%R) de la proteína de haba pallar aislada a diferente pH ...	51
Tabla 19. Análisis de varianza del contenido proteico presente en los aislados de haba pallar a diferente pH .....	51
Tabla 20. Análisis estadístico del contenido proteico de haba pallar por el método Biuret.....	52
Tabla 21. Porcentaje de Nitrógeno en los aislados de haba pallar .....	53

Tabla 22. Análisis de varianza del contenido proteico presente en los aislados de haba pallar a diferente pH .....	53
Tabla 23. Análisis estadístico del contenido proteico de haba pallar por el método Kjendahl .....	54
Tabla 24. Valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 660 nm de la actividad antiinflamatoria por el método de desnaturalización de albúmina .....	55
Tabla 25. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar.....	56
Tabla 26. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 3.....	56
Tabla 27. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 3 .....	57
Tabla 28. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 4.....	57
Tabla 29. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 4 .....	57
Tabla 30. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 5.....	58
Tabla 31. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 5 .....	58
Tabla 32. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 6.....	58
Tabla 33. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 6 .....	59
Tabla 34. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria del control positivo Diclofenaco de sodio.....	59
Tabla 35. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del control positivo Diclofenaco de sodio.....	59
Tabla 36. Valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 532 nm de la actividad antioxidante por el método TBARS .....	60
Tabla 37. Porcentaje de inhibición antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar.....	61
Tabla 38. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 3 .....	62
Tabla 39. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 3 .....	62
Tabla 40. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 4 .....	62
Tabla 41. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 4.....	63
Tabla 42. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 5 .....	63
Tabla 43. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 5.....	63
Tabla 44. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 6 .....	64
Tabla 45. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 6.....	64

Tabla 46. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del control positivo TBA	
.....	64
Tabla 47. Análisis estadístico de la actividad antioxidante del control positivo TBA	
.....	65

## RESUMEN

En esta investigación se aisló la proteína de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) por medio de precipitación isoeléctrica a pH 3, 4, 5 y 6, obteniendo un rendimiento superior a pH 6 (32, 58 %  $\pm$  0.30). Además, se realizó la cuantificación de los aislados proteicos mediante el método de Biuret y Kjeldahl, en ambos casos el mayor contenido proteico fue a pH 5 con un 71,33 % y 42,31 %, respectivamente.

Los aislados proteicos se caracterizaron mediante electroforesis SDS-PAGE con el empleo de 2-mercaptoetanol, obteniendo fracciones proteicas de alto peso molecular como las Globulinas 7 S y 11 S (subunidad ácida y básica) y albúminas 2 S de bajo peso molecular. La digestión gástrica (DG) de la proteína (*in vitro*) se llevó a cabo a pH 1.2, 2 y 3.2 con la enzima pepsina y la digestión duodenal (DD) se llevó a cabo a pH 3.2 con pancreatina, tanto en la DG como en la DD, la fracción de peso molecular alto correspondiente a las globulinas 7S, fueron digeridas, mientras que las proteínas de peso molecular < 45 kDa presentaron una baja digestibilidad.

Las actividades biológicas: antiinflamatoria por el método de desnaturalización de albúmina y antioxidante por el método TBARS fueron analizadas a diferentes concentraciones de proteína (100, 200, 500 y 1000 ug/ml). A pH 3 a una concentración de 1000 ug/ml se obtuvo la mayor inhibición antiinflamatoria (37, 55 %), mientras que a pH 6 se obtuvo la mejor actividad antioxidante (68 %) a una concentración de 1000 ug/ml, en comparación a los demás pH estudiados.

**Palabras clave:** haba pallar, aislados proteicos, digestibilidad *in vitro*, actividad antioxidante.

## ABSTRACT

In this research, the protein present in the lima-bean (*Phaseolus lunatus* L.) was isolated by isoelectric precipitation at pH 3, 4, 5 and 6, obtaining a superior yield at pH 6 (32, 58 %  $\pm$  0,30). In addition, quantification of protein isolates was carried out using the Biuret and Kjeldahl method, obtaining in both cases the higher protein content in the treatment at pH 5 corresponding to 71,33 % and 42,31 %, respectively.

The protein isolates were characterized by the SDS-PAGE electrophoresis technique with the use of 2-mercaptoethanol, obtaining from it, high molecular weight protein fractions such as 7 S and 11 S globulins (acid and basic subunit) and 2 S albumins low molecular weight.

Gastric digestion (DG) of the protein (*in vitro*) was carried out at pH 1.2, 2 and 3.2 by the action of the enzyme pepsin and duodenal digestion (DD) was carried out at pH 3.2 with pancreatin, both in the DG and DD, only the high molecular weight fraction corresponding to 7S globulins were digested, while proteins of molecular weight <45 kDa showed a low digestibility.

Biologic activities: such as anti-inflammatory and antioxidant, were evaluated by the protein denaturation and the TBARS method, respectively; using the bean protein at different concentrations (100, 200, 500 and 1000) ug/ml. At pH 3 at a concentration of 1000 ug/ml, the highest anti-inflammatory inhibition was obtained, corresponding to 37,55 %, while at pH 6 the best antioxidant activity (68 %) was obtained at a concentration of 1000 ug/ml, compared to the other pH studied.

**Key words:** bean pallar, protein isolates, *in vitro* digestibility, antioxidant activity.

## INTRODUCCIÓN

El haba pallar (*P. lunatus* L.), conocida también como frijol de luna, haba lima, judía de Lima o garrofón, guaracaro, es una especie herbácea trepadora, cuyo cultivo provee vainas con semillas comestibles de diversos tamaños (Heuzé et al., 2015), en su forma silvestre fue hallada solamente en América, mientras que sus formas cultivadas se encuentran ampliamente distribuidas en zonas tropicales y templadas alrededor del mundo, las condiciones de cultivo de esta leguminosa va desde el clima extremadamente seco de la costa peruana hasta el clima tropical húmedo de la Amazonía ecuatoriana, (Baudoin et al., 2004). En la Figura 1 se describe las características morfológicas de la planta de haba pallar.

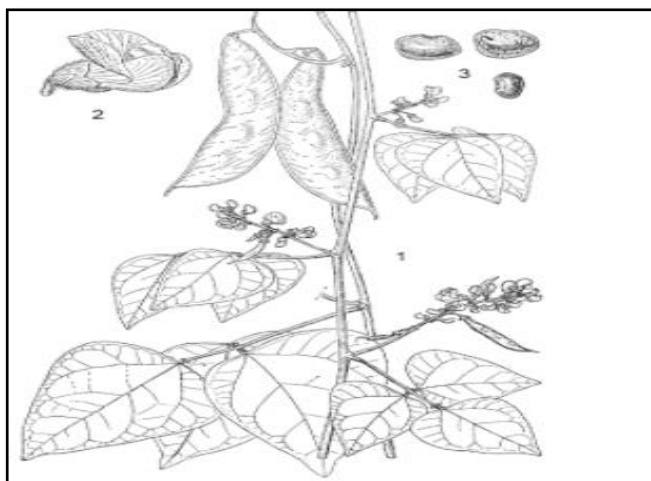


Figura 1. Morfología de *Phaseolus lunatus*. 1. ramas de floración y fructificación; 2. flor; 3. Semillas

El mayor productor de esta leguminosa a nivel mundial es Estados Unidos con aproximadamente 21000 ha distribuidas a lo largo de California, Delaware, Maryland y Wisconsin, mientras que Madagascar ocupa el segundo lugar con una superficie de cultivo de 3000 a 19000 ha, el tercer lugar es para el vecino país, Perú; con una producción de semilla seca de 5000-5500 t en 5000-6000 ha (Brink y Belay, 2006).

En Ecuador, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a partir del año 1992, con el propósito de promover e incrementar la producción e ingresos económicos de los agricultores pertenecientes al litoral ecuatoriano liberó dos variedades mejoradas de haba: INIAP PORTOVIEJO- 490



(invernera) e INIAP PORTOVIEJO- 491 (veranera), estas dos variantes, poseen una alta capacidad de producción en época lluviosa y seca, respectivamente, además de una alta tolerancia a enfermedades, lo cual permite a los agricultores del litoral ecuatoriano incrementar el desarrollo económico en sectores marginales, además de rescatar un cultivo de tipo tradicional.

En los países en desarrollo, actualmente las leguminosas ocupan el segundo lugar en fuente alimenticia, después de los cereales, pues uno de los principales componentes nutricionales de las leguminosas es la proteína que oscila entre 17 y 40 g / 100 g, superando al contenido presente en la proteína de base animal correspondiente a 18-25 g / 100 g (Yellavila et al., 2015). El haba pallar además de tener un alto contenido de proteína, es una fuente importante de vitaminas, minerales, antioxidantes, esteroides vegetales y fibra dietética, esta última está presente tanto en el grano seco o fresco en un porcentaje aproximado de 50 % por cada 100 g CDR (Cantidad Diaria Recomendada) (NutritionFacts, 2018).

En el estudio “Alimentos funcionales y nutraceuticos exclusivos y frecuentes en el mercado de inmigrantes bolivianos en Liniers, Ciudad de Buenos Aires, Argentina” realizado por Pochettino et al. (2012) señalan que la semilla seca de la leguminosa *Phaseolus lunatus* L. es empleada como un alimento funcional o nutraceutico presentando características astringentes, febrífugos y emolientes.

Las leguminosas en la actualidad están siendo ampliamente estudiadas pues sus frutos proporcionan grandes beneficios al ser consumidos, es así que aportan al cuerpo una gran cantidad de antioxidantes y compuestos bioactivos como polifenoles, isoflavones, etc. (Guerra, 2016).

Agostini-Costa et al. (2015), caracterizaron el perfil fenólico y la actividad antioxidante de 50 muestras de *Phaseolus lunatus* cultivadas en un banco de germoplasma en Brasil, encontrando una amplia diversidad de polifenoles (compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos condensados) los cuales estaban fuertemente relacionados con la actividad antioxidante, las muestras que tenían mayor coloración presentaron alto contenido de polifenoles y por tanto mayor actividad antioxidante. Así también Oomah et al. (2010) evaluaron la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la cáscara de cuatro cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.),

encontrando una gran cantidad de compuestos fenólicos totales, los cuales inhibían ciclooxigenasas (COX), que son causantes de inflamación, el efecto inhibidor superó incluso al antiinflamatorio comercial aspirina.

Las características nutricionales del haba pallar en la actualidad presentan un gran atractivo para la realización de estudios que permitan potenciar dichos componentes, generalmente para la obtención de productos con mayor valor nutricional como lo son los alimentos funcionales los cuales al ser consumidos contribuyen de manera favorable a la alimentación y a la salud de los consumidores.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### 1.1 Tema

Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).

#### 1.2 Justificación

Los alimentos de origen vegetal tienen gran importancia en la alimentación, el estudio elaborado por Olmedilla Alonso et al. (2010), resalta que el consumo de leguminosas incrementa el aporte nutricional, en la dieta animal y humana.

El haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.), también conocida como frijol lima, pallar o frijol mantequilla, es una leguminosa que presenta una extensa distribución geográfica en zonas con características tropicales y subtropicales, siendo cultivada en varios países de América, Europa, África y Asia, (López Alcocer et al., 2016). En el continente americano el cultivo de este grano va desde el norte de México al norte de Argentina (Andueza Noh et al., 2016).

En nuestro país, el haba pallar es un producto de consumo tradicional en el Litoral, en el grano seco, su principal componente son los hidratos de carbono, pero además posee una gran cantidad de proteína de alta calidad que va del 20 al 25 % y un contenido de grasa inferior al 3 % por unidad de peso (Mendoza y Linzán, 1993), además presenta otros componentes como fibra y ceniza que hacen de este alimento una fuente importante de nutrientes necesarios en la ingesta diaria.

Uno de los principales problemas que inquieta a la población ecuatoriana es la desnutrición, el Plan Nacional de desarrollo “Toda una vida” (PNBV, 2017-2021), entre sus objetivos de desarrollo sostenible pretende erradicar la desnutrición y promover hábitos y prácticas de vida saludable, impulsando la producción de

alimentos suficientes y saludables para mejorar los patrones alimentarios. Además, este plan patrocinará la iniciativa de investigadores y emprendedores que permitan ampliar la oferta alimentaria con productos alternativos, siempre y cuando el aprovechamiento de la biodiversidad sea responsable, este apartado abre la brecha a la búsqueda de productos de origen vegetal que sustituyan a la alimentación tradicional.

La diversidad de microclimas existentes en el Ecuador, permite que la agricultura sea una de las actividades principales a las que la población se dedica, por lo cual; el estudio de las proteínas presentes en el haba pallar es de gran importancia puesto que por sus atributos nutricionales se convierte en una alternativa viable para solventar problemas como la hambruna y la desnutrición, ya que al explotar al máximo sus características nutricionales, se impulsa a la población a la generación de productos no tradicionales como los alimentos funcionales que además de incentivar a la población al cultivo frecuente de esta leguminosa, contribuye de manera positiva a la economía popular y solidaria.

En el laboratorio de alimentos funcionales de la Universidad Técnica de Ambato se han realizado distintos estudios en matrices vegetales como sachá inchi, tocte, sésamo entre otras, demostrando la presencia de actividades biológicas como la antioxidante y la antiinflamatoria (León, 2016; Poveda, 2016; Quinteros, 2016), dichas actividades han sido experimentadas *in vitro* (simulando condiciones fisiológicas) e *in vivo* (modelo del pez cebra). En nuestro país no se han realizado estudios correspondientes a digestibilidad y actividades biológicas en la proteína aislada de haba pallar, por lo que este estudio será de gran importancia para el área de investigación, pues a partir de ello se podrá contribuir de manera favorable a las pequeñas y grandes empresas dedicadas a la fabricación de alimentos funcionales.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Estudiar la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Aislar las proteínas presentes en la harina del haba pallar mediante precipitación isoeléctrica.
- Evaluar la digestibilidad gastrointestinal y duodenal (*in vitro*) de los aislados proteicos de haba pallar empleando la técnica de electroforesis SDS-PAGE.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de las proteínas aisladas de *Phaseolus lunatus* L. (*in vitro*).
- Determinar la actividad antioxidante de las proteínas aisladas de la harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L) por medio del método TBARS.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

El cultivo de las leguminosas a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años, ya que éstas representan una fuente importante de proteína de gran calidad y de bajo costo en comparación a la proteína de origen animal. Los sembríos de frijoles se han extendido alrededor del mundo, su producción sobrepasa los 23 millones de toneladas métricas (TM). En América Latina y África se producen alrededor de 7 millones de TM. Este cultivo se lo realiza generalmente en pequeñas parcelas, laderas o granjas agrícolas, una práctica común es la intercalación de ésta leguminosa con cereales, plátanos y tubérculos, sin embargo existen ciertas limitaciones en su cultivo, ya que éste depende de factores climáticos edáficos, bióticos y factores sociales (Broughton et al., 2003). En la Tabla 1 se representa la producción de frijoles en los diferentes países y regiones de América latina.

**Tabla 1. Producción de frijoles en América Latina**

<b>País/Región</b>	<b>Área (ha x 10<sup>-3</sup>)</b>	<b>Producción (TM x 10<sup>-3</sup>)</b>
Brasil	5092	3055
México	2259	1300
América central (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá)	526	337
Zona Sur (Chile, Argentina, Paraguay)	357	398
Zona Andina (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia)	299	265
Caribe (Cuba, Haiti, República Dominicana)	157	141
<b>TOTAL</b>	<b>8690</b>	<b>5496</b>

Fuente: Broughton et al., 2003

En Ecuador *Phaseolus lunatus* L. es cultivada en ciertas regiones del litoral, especialmente en las provincias de Manabí, Guayas y Los Ríos, considerándose como un producto de sustento de la zona, pues posee una demanda local elevada, además de un precio moderado. La forma de consumo es especialmente como grano verde (Villavicencio Linzán y Zambrano Mendoza, 2008).

Las propiedades funcionales de las proteínas presentes en ciertos vegetales son ampliamente aprovechadas en la industria alimentaria para obtener características organolépticas, kinestésicas, de hidratación, reológicas entre otras, en los productos terminados, sin embargo Kinsella y Melachouris (1976) mencionan que ninguna proteína efectúa todas las funcionalidades descritas anteriormente, y que sólo ciertos componentes presentes en la estructura de la proteína son responsables de dichas características funcionales, es por ello que, para determinar dicho compuesto primero hay que realizar un estudio previo para comprobar si los elementos presentes en la estructura de la proteína pueden ser usados para simular o reemplazar las proteínas convencionales en el desarrollo de nuevos productos con un amplio rango de funcionalidades o para dar forma a productos terminados.

Una de las semillas como una fuente potencial de proteína es *Phaseolus lunatus* L., y cuyas propiedades funcionales y nutricionales no han sido muy estudiadas. Es importante recalcar que los métodos desarrollados para la obtención de proteína implican técnicas que permitan conservar las características funcionales y nutricionales intactas al momento de su extracción, así Chel-Guerrero et al. (2002) en su estudio denominado Propiedades funcionales de las harinas y aislados proteicos de semillas de *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis*, aislaron la proteína presente en la harina de estos dos granos por medio de precipitación isoelectrica, empleando inicialmente una relación (1:6) harina/agua, los puntos isoelectricos fueron ajustados a pH 4,5 para *Phaseolus lunatus* y pH 4,9 para *Canavalia ensiformis*, obteniendo un rendimiento de proteína de 71,13 % y 73,75 % respectivamente. Por otro lado, Salcedo-Chávez et al. (2002) optimizaron el método de precipitación isoelectrica de proteínas en la harina obtenida a partir de las semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus*), para ello emplearon un intervalo de pH de extracción de 7,8 - 9,2 y el pH de precipitación en un rango de 4,3 - 5,7, alcanzando el mejor tratamiento en valores correspondientes a 8 y 9,2 para pH de extracción y 5,7 para pH de precipitación.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS- PAGE por sus siglas en inglés) es un método muy empleado en la actualidad para la caracterización de moléculas biológicas; esta técnica permite purificar proteínas e identificar las subunidades de pesos moleculares mediante la migración de partículas sobre un campo eléctrico; el fraccionamiento o separación de las moléculas presentes

en las proteínas se da en función de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (García Pérez, 2000; Garfín, 2009)

En la actualidad existen estudios relevantes que permiten conocer los atributos nutricionales de leguminosas como el elaborado por Marrugo et al. (2012), con el tema "Potencial nutricional de tres cultivares de frijol Zaragoza (*Phaseolus lunatus* L.) y estimación de su digestibilidad “*in vitro*””; en este trabajo se encontró que los atributos nutricionales de los cultivares de frijol, como la cantidad proteica, una digestibilidad aceptable y un mínimo contenido de componentes antinutricionales hacen de estos ejemplares un atractivo para la elaboración de productos enriquecidos. Así mismo Marrugo et al. (2016) realizaron un estudio en concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*, encontrando valores del concentrado proteico correspondientes a 66,8 % y 65,29 % para la proteína y un coeficiente de digestibilidad de 83,93 % y 82,1 % respectivamente; por lo tanto, la matriz vegetal *Phaseolus lunatus* L. puede ser tomada en cuenta como un ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales.

Hoy en día el concepto de alimentos funcionales se va expandiendo cada vez más, pues el actual ritmo de vida exige un creciente interés por el consumo de alimentos que, a más de contribuir con los elementos esenciales para un balance óptimo nutricional, contribuyan a prevenir enfermedades comunes que afectan a la población, como la diabetes, obesidad, distintos tipos de cáncer, entre otras. Además que permitan disminuir la desnutrición energético proteínica en la población con bajos recursos económicos, al fomentar la producción y consumo de proteínas de origen vegetal (Figuroa González et al., 2015).

Es así que investigaciones recientes intentan resaltar el poder biológico inmerso en matrices vegetales, como la elaborada por Padmanabhan y Jangle (2012) quién emplea una combinación de cuatro plantas medicinales para evaluar la actividad antiinflamatoria (*in vitro*), para ello empleó el método de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo); así mismo Rojano et al. (2008) evaluaron la capacidad antioxidante del isoespintanol, que fue aislado de las hojas de *Oxandra cf xylopioides* (Annonaceae), empleando el método TBARS (sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico), cuyo ensayo permite medir espectrofotométricamente el producto final



de la peroxidación lipídica producida por la unión del malondialdehído (MDA) y el ácido tiobarbitúrico.

Jacinto Hernández et al. (2002) mencionan que la proteína que se obtiene de origen vegetal tiene un costo menor que la de origen animal, por lo tanto, el estudio de la concentración proteica, la digestibilidad, y actividades biológicas presentes en la proteína del haba pallar puede abrir un camino importante para potenciar el consumo y empleo de esta leguminosa como un ingrediente para la elaboración de alimentos enriquecidos.

## **2.2 Hipótesis**

**Tema:** “Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*).”

### **Planteamiento de la hipótesis:**

¿El pH de precipitación influye sobre el rendimiento y las actividades biológicas antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar?

### **Hipótesis Nula ( $H_0$ ):**

**$H_0$ :** El pH de precipitación no influye sobre el rendimiento y las actividades biológicas antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar.

### **Hipótesis Alternativa ( $H_a$ ):**

**$H_a$ :** El pH de precipitación si influye sobre el rendimiento y las actividades biológicas antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar.

## **2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **2.3.1 Variable independiente**

- Diferentes pH de precipitación proteica.

### **2.3.2 Variables dependientes**

- Rendimiento de aislados proteicos.
- Actividad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas preliminares y la parte experimental fueron ejecutadas en el laboratorio de alimentos funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Materia prima

En esta investigación se empleó la matriz de harina de haba pallar, proporcionada por la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

##### 3.1.2 Recursos materiales

En la Tabla 2 se muestran los materiales empleados en ésta investigación.

**Tabla 2. Materiales de laboratorio empleados en la investigación.**

<b>Materiales</b>
Balones de aforo
Envases con cierre hermético
Espátulas
Goteros
Guantes de látex
Magnetos
Micropipetas (0,5- 1000 $\mu$ l)
Papel plástico
Probetas
Puntas para micropipetas
Rotuladores
Tiras medidoras de pH

Toallas absorbentes  
 Tubos Eppendorf (2 ml)  
 Tubos falcon (50 ml)  
 Parafilm  
 Gradillas  
 Botellas de tapa azul  
 Tubos de ensayo con y sin rosca  
 Peras de succión  
 Soporte universal  
 Mortero  
 Varillas de agitación  
 Vasos de precipitación

---

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

### 3.1.3 Equipos

Los equipos empleados en la parte experimental de ésta investigación, están enmarcados en la Tabla 3.

**Tabla 3. Equipos de laboratorio empleados en la investigación.**

<b>Equipos</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Agitador vórtex	VWR	VWR vortex mixer 120 V
Balanza analítica	VWR	VWR-224AC
Centrífuga	eppendorf	Centrifuge 5702
Congelador	MABE	Alaska 300BO
Equipo de electroforesis	BIORAD	Power pac Basic
Espectrofotómetro	Thermo SCIENTIFIC	EVOLUTION 201
Estufa	VWR	414005-110
Liofilizador	LABCONCO	800-522-7658
Micro incubador	ESCO	Provocell shaking micro incubator
Microcentrífuga	Labnet	24D Spectrafuge
pH-metro	Mettler Toledo	Seven easy pH
Plancha de calentamiento	VWR	VWR 10 X 10 CER HOT/STIR
Refrigerador	Indurama	RI-470
Congelador de ultra baja temperatura	Panasonic	MDF-U33V

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

### 3.1.4 Reactivos

El resumen de los reactivos, marca comercial y grado de pureza empleados en las distintas fases de éste trabajo se encuentra detallados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Reactivos empleados en la investigación.**

<b>Reactivos</b>	<b>Marca</b>	<b>Grado de pureza</b>
2-mercaptoetanol	Aldrich chemistry	99 %
Aceite	ARBOLITO	-
Ácido acético	Emsure R	100 %
Ácido clorhídrico (HCl)	Merck	37 %
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Bio Chemica AppliChem/Panreac	98 %
Acrilamida	BIORAD	Solución al 30 %
Agua destilada	-	-
Azul de bromofenol	BIORAD	Reactivo puro
Azul de comassie	BIORAD	No especificado
Bicarbonato de sodio	Merck	Para análisis
Cloruro de sodio	Merck	37 %
DMSO	Emsure R	No especificado
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	BIORAD	Reactivo puro
Estándar de proteínas	BIORAD	-
Fosfato dibásico de sodio	Merck	99 %
Fosfato monobásico de sodio	Merck	99 - 102 %
Glicerol	Invitrogen	99,50 %
Glicina	BIORAD	Reactivo puro
Hidróxido de sodio	Merck	99 %
Metanol	Emsure R	para análisis
Pancreatina	Emprove	350 FIP-U/g
Pepsina	SIGMA - ALDRICH	3200 - 4500 u/mg de proteína
Persulfato de amonio (PSA)	Fisher Chemical	10 %
Sulfato de cobre	Merck	99 - 100.5 %
Tartrato de sodio y potasio	Merck	99 - 102 %
Temed	Invitrogen	99 %
Tris- HCl	BIORAD	Reactivo puro

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Aislado de proteínas de haba pallar

Los aislados proteicos de harina de haba pallar fueron obtenidos mediante la técnica de precipitación isoeléctrica, empleando el protocolo descrito por Martínez y Añón (1996) con modificaciones; para ello se suspendió en un vaso de precipitación 5g de harina de haba pallar en 50 ml de agua destilada, luego el pH de solubilización fue ajustado a 8 con NaOH 1 M, la suspensión se mantuvo con agitación magnética constante durante 1 hora, controlando regularmente que se mantenga el valor del pH. Luego se centrifugó la muestra durante 30 minutos a 4400 rpm y temperatura ambiente. El precipitado, producto de la centrifugación, fue descartado. Y el sobrenadante fue ajustado a un pH de precipitación de 3, 4, 5 y 6 con HCl 1M. La solución se dejó precipitar durante 24 horas, transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y el precipitado se liofilizó en un equipo de marca Labconco a una presión de 0,2 Pa y una temperatura de -57 °C. Las muestras liofilizadas fueron almacenadas en frascos estériles, sellados con parafilm, y almacenados en un congelador de ultra baja temperatura (-80 °C), hasta su posterior análisis. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada pH. El rendimiento de la proteína se calculó de acuerdo a la ecuación 1:

$$(1) \quad \% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso final del concentrado (g)}}{\text{peso inicial de la harina (g)}} * 100$$

### 3.2.2 Cuantificación proteica por el método de Biuret

Para llevar a cabo la cuantificación proteica, se empleó el método colorimétrico de Biuret descrito por Gornall et al. (1949), para lo cual a continuación se detalla la preparación del reactivo de Biuret y la muestra.

### **3.2.2.1 Preparación reactivo Biuret**

La preparación del reactivo se llevó a cabo pesando 9 g de tartrato de sodio y potasio, 3g de sulfato de cobre y 5 g de yoduro de potasio. Éstos reactivos fueron disueltos en 400 ml NaOH 0,2 M en el orden antes mencionado, y aforados finalmente a 1 L con 600 ml de agua destilada.

### **3.2.2.2 Preparación de la muestra**

Se pesó en tubos Eppendorf de 2 ml de 10 a 13 mg de los aislados proteicos y se añadió 1 ml de agua destilada y 75  $\mu$ l de NaOH 0,2M. Se colocaron las muestras en el micro-incubador a temperatura ambiente, durante 10 minutos y 450 rpm; transcurrido este tiempo se procedió a tomar 250  $\mu$ l de la muestra en un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml y se añadió 1,25 ml del reactivo Biuret, las muestras fueron homogenizadas con la ayuda de un vórtex. Posterior a ello, las alícuotas fueron centrifugadas durante 30 minutos a 13000 rpm, los tubos con las muestras fueron colocados en una base previamente enfriada en la nevera, y se procedió a medir las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro. Los tratamientos se realizaron con dos réplicas para cada pH (3, 4, 5 y 6) y por duplicado para cada réplica.

### **3.2.3 Cuantificación Proteica por el método de Kjeldahl**

El método de cuantificación por Kjeldahl se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por (A.O.A.C, 1980; Nielsen, 1994) con ciertas modificaciones.

Para el proceso de digestión de la muestra se pesó 0,15 g de proteína por triplicado de cada pH en un matraz micro-kjeldahl, luego se añadió 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y aproximadamente 1,0 g de mezcla catalizadora.

La muestra fue sometida a un proceso de digestión, el cual terminó al observar el cambio de coloración de la muestra hacia un color azul-verde claro. Luego se dejó enfriar las muestras, y se añadió agua destilada.

Las digestiones obtenidas fueron sometidas a un proceso de destilación, añadiendo previamente solución de NaOH al 30 %; se colectó 20 ml de destilado, el cual fue de color verde.

El producto destilado fue posteriormente titulado con HCl 0,1 N, usando como indicador para este proceso se empleó como indicador una mezcla de bromocresol al 0,1 % y rojo de metilo al 0,1 %. El final de la titulación fue identificado por la presencia de una coloración violeta. Ésta determinación se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los pH y la cantidad total de nitrógeno presente en cada muestra se calculó por medio de la ecuación 2:

$$(2) \quad \% \text{ Nitrógeno} = N \text{ HCl} \times \frac{VAC}{g \text{ muestra}} \times 14g \text{ N} \times 100$$

Donde:

$14g \text{ N}$  = *Peso molecular del Nitrógeno*

$N \text{ HCl}$  = Normalidad del HCl en moles/1000 ml

$VAC$  = Volumen del ácido corregido (ml del ácido estandarizado para la muestra – ml del ácido estandarizado para el blanco).

Para la determinación del % de proteína se multiplica el % de nitrógeno por el factor proteico 6,25.

### **3.2.4 Electroforesis SDS-PAGE**

Se empleó la técnica de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la cual permitió separar las moléculas en función de su tamaño y su carga eléctrica, para ello se empleó el método descrito por Laemmli (1970) con modificaciones.



### 3.2.4.1 Preparación de la muestra

Se pesó 10 mg de proteína liofilizada de cada pH en tubos Eppendorf de 2 ml, y se añadió 1 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7 y de la solución anterior se tomó 200 µl y se añadió 200 µl de 2-mercaptoetanol, se calentó a 80 °C durante 10 minutos y 450 rpm en un microincubador. Las muestras fueron almacenadas en un congelador a -4 °C para su posterior análisis.

### 3.2.4.2 Preparación del gel de poliacrilamida

El gel separador (abajo) al 12 % y el gel concentrador (arriba) al 4 % se prepararon de acuerdo a las especificaciones descritas en la Tabla 5.

**Tabla 5. Reactivos empleados en la preparación del gel de poliacrilamida**

REACTIVO	GEL SEPARADOR (ABAJO)	GEL CONCENTRADOR (ARRIBA)
Agua destilada	1,425 ml	2,2 ml
Tris HCl (1M), pH 8,8	3 ml	-
Tris HCl (1,5M), pH 6,8	-	0,42 ml
Acrilamida (30 %)	3 ml	0,7 ml
SDS	75 µl	3,3 µl
TEMED	9 µl	6 µl
PSA (10 %)	30 µl	20 µl

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

Posterior a ello se armó el equipo de electroforesis Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA). Entre las placas de vidrio se colocó el gel separador y se esperó su polimerización, luego se colocó el gel concentrador, formando así un solo gel de 1 mm de espesor. La cubeta de electroforesis se llenó con buffer running preparado a partir de 3 g/L de Tris-HCl, 15 g/L de Glicina y 1 g/L de SDS, luego de ello se cargó en cada pocillo 30 µl de la muestra proteica y 15 µl del estándar Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, el equipo Bio- Rad modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA) fue empleado para la corrida de electroforesis con un voltaje continuo de 200.

Una vez terminada la corrida, se sacaron los geles y se colocaron en un recipiente con Coomassie brilliant blue R-250 para teñir las bandas de los polipéptidos durante un periodo de 12 horas; transcurrido ese tiempo se destiñó el gel usando una solución de 45 % de agua destilada, 50 % de metanol y 5 % de ácido acético durante 5 horas, luego los geles fueron lavados con abundante agua destilada.

### **3.2.5 Electroforesis Native-PAGE**

Las muestras fueron preparadas a partir de 10 mg de proteína a la cual se le añadió directamente 600 µl de buffer de muestra Native-PAGE preparado a partir de 3,1 ml de Tris-HCl 1M a pH 6,8; 0,5 ml de azul de bromofenol; 1,4 ml de agua destilada y 5 ml glicerol. La preparación de los geles se llevó a cabo con todas las especificaciones de la Tabla 5, excepto el SDS. El buffer running que se emplea para la corrida de la muestra contenía 1,5 g Tris; 7,2 g glicina y un aforo de 500 ml de agua destilada.

### **3.2.6 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro***

Para la simulación de la digestibilidad gastrointestinal se empleó el mejor tratamiento en cuantificación; éste fue sometido a una digestión gástrica *in vitro*, simulando las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, siguiendo el protocolo descrito por Jiménez-Saiz et al. (2011), el grado de hidrólisis gástrica y duodenal, fue examinada mediante la técnica de electroforesis SDS- PAGE.

#### **3.2.6.1 Digestión gástrica**

Se prepararon soluciones de NaCl 0,35 M a diferente pH (1,2; 2 y 3,2), para simular las condiciones del estómago. Para la digestión gástrica se empleó el tratamiento con el mayor contenido proteico (pH 5), para ello se pesó 10 mg de proteína en 4 tubos Eppendorf, en cada uno se agregó 1000 µl de la solución de NaCl a diferente pH y 100 µl de pepsina (172 U/ml de pepsina), se agitó en un vórtex. Los tubos fueron incubados durante 2 horas a 37 °C y 450 rpm. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 200 µl de Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) e incubando

nuevamente por 10 minutos a 80 °C y 450 rpm. Las muestras fueron congeladas hasta su posterior análisis.

Se realizó además una segunda digestión gástrica a las mismas condiciones, con la variación de la concentración de la enzima pepsina (2000 U/ ml de pepsina).

### **3.2.6.2 Digestión duodenal**

Para la simulación de la digestión duodenal *in vitro* se tomó un 1 ml del tubo sometido a digestión gástrica a pH 3,2, a este tubo se le añadió 1ml de pancreatina 100 U/mg (1,5 mM CaCl + 10 mM sales biliares), la muestra fue llevada a pH 7 e incubada durante un periodo de 2 horas a 37 °C y 450 rpm, transcurrido este tiempo se procedió a inactivar las enzimas mediante un incremento de temperatura de 80 °C durante un periodo de 10 minutos y con una agitación de 450 rpm. Las muestras se congelaron a -4 °C hasta su análisis mediante la técnica electroforética antes mencionada.

### **3.2.7 Actividades biológicas**

#### **3.2.7.1 Actividad antiinflamatoria**

La actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos fueron probados a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) con el método de desnaturalización de la proteína (albúmina de huevo), para ello se empleó el protocolo descrito por Padmanabhan y Jangle (2012) con ciertas modificaciones, el experimento se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los aislados obtenidos a diferente pH y el control positivo fue diclofenaco de sodio a las mismas concentraciones.

##### **3.2.7.1.1 Preparación buffer fosfato pH 6,4**

Se preparó una solución inicial a concentración 1M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para ello se pesó 1,42 g de éste compuesto y se aforó a un volumen de 10 ml. Se preparó también una solución 1M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pesando 1,19 g y llevando a un aforo de 10 ml con agua

destilada. De las soluciones antes preparadas se tomó 4,63 ml y 5,37 ml respectivamente y se llevó a un aforo de 100 ml. El buffer preparado fue ajustado a pH 6,4 añadiendo HCl 2M.

### 3.2.7.1.2 Preparación de la muestra

Se prepararon soluciones de proteína de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml con agua destilada en balones de aforo de 10 ml, de las soluciones antes preparadas se tomó 2 ml (proteína solubilizada) y se colocaron en tubos de ensayo, a los cuales se les añadió también 0,2 ml de albúmina de huevo fresco y 2,8 ml de buffer fosfato pH 6,4, los tubos de ensayo fueron tapados y agitados por inversión, para evitar la formación de espuma. Luego se incubó las muestras en una estufa a 37 °C durante 15 minutos, y luego se sometió a un baño María a 70 °C por un periodo de 10 minutos, se enfriaron las muestras y se procedió a medir las absorbancias a una longitud de onda de 660 nm en una celda de plástico de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro de marca Thermo SCIENTIFIC modelo EVOLUTION 201, empleando agua destilada como blanco. Las muestras de diferente pH fueron trabajadas por triplicado para cada concentración, se empleó además la droga diclofenaco de sodio (75 mg) a las mismas concentraciones como patrón positivo para comparar con la actividad antiinflamatoria obtenida de los aislados proteicos.

El porcentaje de actividad antiinflamatoria fue calculado con la ecuación 3:

$$(3) \quad \% \text{ Act. antiinflamatoria} = \frac{B-A}{B} * 100$$

**Donde:**

A = Absorbancia de la muestra (concentración proteica + albúmina), (diclofenaco + albúmina)

B = Absorbancia de la albúmina desnaturalizada.

### 3.2.7.2. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de las proteínas aisladas de harina de haba pallar se analizaron mediante el método TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), descrito por (Rojano et al., 2008) con algunas modificaciones.

Se pesó en tubos Eppendorf de 2ml de cada aislado proteico a diferente pH, la cantidad de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml, se añadió 2 ml de agua destilada para solubilizar la proteína y se agitó con la ayuda de un vórtex de marca VWR. De los tubos antes preparados se tomó 500 µl y se lo transfirió a nuevos tubos Eppendorf de 2 ml y se agregó 500 µl de aceite oxidado.

Para el proceso de oxidación del aceite, se empleó aceite de oliva comercial de la marca “ARBOLITO”, el aceite fue colocado en un envase de vidrio sin tapa y oxidado dos semanas antes, una semana a 40 °C y la siguiente semana a 70 °C en la estufa.

Los tubos previamente preparados fueron colocados en el micro incubador a 28 °C durante 13 horas y 450 rpm, transcurrido este tiempo se procedió a colocar en cada tubo 1000 µl de una solución de TBA (0,5 g de ácido tiobarbitúrico, 40 ml de ácido acético y 10 ml de agua destilada), y se incubaron las muestras a 95 °C durante 1 hora y 450 rpm.

Luego de ello las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente. Para las muestras del pH 4, 5 y 6, se realizó una dilución con 400 µl de la muestra en 600 µl de agua destilada. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante un periodo de 15 minutos a 13000 rpm. Se enfriaron las muestras en el congelador durante 10 minutos y se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 532 nm, empleando agua destilada como referencia.

Se preparó además un patrón con un antioxidante comercial Butilhidroxitolueno (BHT) con las mismas concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. El porcentaje de oxidación de cada una de las muestras se calculó empleando la ecuación 4:

$$(4) \quad \% \text{ Act. antioxidante} = \frac{B-A}{B} * 100$$

**Donde:**

$A$  = Absorbancia de la muestra (concentración proteica + aceite oxidado), (BHT + aceite oxidado)

$B$  = Absorbancia del aceite oxidado.

### **3.3 Diseño experimental**

El diseño experimental que se empleó en esta investigación fue el análisis de comparación de medias por medio del ANOVA de un factor, y una comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 0,05, mediante el Software estadístico IBM SPSS Statistic.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de resultados

##### 4.1.1 Aislamiento de proteína de haba pallar (*Phaseolus lunatus. L*)

La matriz de harina de haba pallar suministrada por la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) fue empleada para la obtención de aislados proteicos por medio de precipitación isoeléctrica. Callisaya A y Alvarado K (2009) mencionan que un pH de solubilización de proteína alto ( $\text{pH} > 9$ ) afecta negativamente a las características de la proteína e incluso puede causar su hidrólisis o desnaturalización, además de producir una precipitación de componentes no proteicos que pueden afectar a la pureza del aislado a obtener, por lo tanto, en la experimentación el pH de solubilización de las proteínas fue ajustado a 8 para evitar que se disuelvan componentes no deseados junto a la proteína, mientras que a pH 3, pH 4, pH 5 y pH 6 se realizó la precipitación, la cual luego de 24 horas de reposo fue apreciable en el pH 3, pH 4 y pH 5, sin embargo, a pH 6 la precipitación es mínima, pues las proteínas se encontraban solubilizadas en el agua destilada. Los precipitados obtenidos a diferente pH fueron liofilizados y se calculó su rendimiento.

##### 4.1.2 Rendimiento de los aislados proteicos

El rendimiento de cada tratamiento fue calculado a partir del peso inicial de la harina y el peso final del aislado luego del proceso de liofilización, los porcentajes de rendimiento se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Rendimiento de los aislados de proteína de haba pallar**

<b>pH</b>	<b>Rendimiento proteico (%)</b>
<b>3</b>	8.64 <sup>a</sup> ± 0.10
<b>4</b>	18.56 <sup>c</sup> ± 1.14
<b>5</b>	12.86 <sup>b</sup> ± 0.16
<b>6</b>	32.58 <sup>d</sup> ± 0.30

Media ± Desviación estándar con n= 3. Las diferentes letras indican las diferencias significativas (p <0.05)  
Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

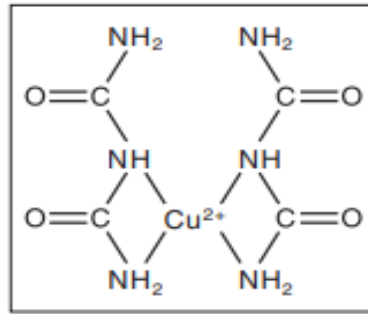
El estudio realizado por Johnston et al. (2015) indica que el punto isoeléctrico de ciertas leguminosas está comprendido entre (~ 4,5 y 5), en este rango de pH es dónde ocurre la mayor precipitación de las proteínas pues allí es donde las proteínas adquieren una carga neutra, se agregan y caen de la solución. En el caso del haba pallar el tratamiento a pH 6 presentó el mejor rendimiento de extracción con un valor correspondiente a 32.58<sup>d</sup> ± 0.30, mientras que a pH 3 se obtuvo el menor rendimiento 8.64<sup>a</sup> ± 0.10, sin embargo, el rendimiento real de la precipitación isoeléctrica de las proteínas pudo haber sido influenciado por agentes no proteicos que poseen solubilidad en agua a dicho pH, por lo tanto, el contenido proteico será contrastado posteriormente mediante los métodos de cuantificación proteica (Biuret y Kjeldahl).

#### **4.1.3 Cuantificación proteica de los aislados**

##### **4.1.3.1 Cuantificación proteica por el método de Biuret y Kjeldahl**

La cuantificación de proteína de los aislados de haba pallar fueron analizados por el método colorimétrico de Biuret, el cual permitió que el Cu<sup>+2</sup> se una a los grupos funcionales en los enlaces peptídicos de la proteína de haba pallar, el producto de esta reacción fue un complejo de color violeta el cual fue medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm. Kruezigler y Allen (2016) representan la unión del Cu<sup>+2</sup> a la proteína en la Figura 3.





**Figura 2.** Formación del complejo de Biuret.  
(Kruezigler y Allen, 2016).

Los datos obtenidos de la cuantificación proteica a diferente pH (3, 4, 5 y 6) registrados en la tabla 7 muestran que el pH 5 corresponde al mejor tratamiento en cuanto al contenido proteico con un  $71.33^c \pm 0.92$ .

**Tabla 7. Rendimiento del contenido proteico por el método de Biuret.**

pH	Contenido de proteína (%)
3	$69.96^c \pm 0.78$
4	$62.39^b \pm 0.35$
5	$71.33^c \pm 0.92$
6	$56.80^a \pm 1.77$

Media  $\pm$  Desviación estándar con n= 4. Las diferentes letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ )  
Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

Al aplicar el test HSD (Honestly-significant-difference por sus siglas en inglés) de Tukey o de comparaciones múltiples se encontró diferencias significativas en el contenido proteico entre el pH 4 (62,39 %) y el pH 6 (56,80 %), mientras que para el contenido proteico del pH 3 y el pH 5 no existen diferencias significativas puesto que el porcentaje de proteína presente en ambos aislados es muy semejante.

Se realizó también la determinación del contenido proteico total en los aislados por medio del método de Kjeldahl el cual mide la cantidad de nitrógeno total presente en la muestra, para ello este método emplea tres reacciones sucesivas que son digestión, neutralización y destilación y por último una valoración ácido - base o titulación (Verdini, 2017).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteína de los aislados a diferente pH por el método Kjeldahl representados en la tabla 8., ratifican que el mayor contenido proteico se encuentra en el tratamiento a pH 5 con un contenido proteínico correspondiente al 42,31 %, seguido del pH 3 con un 41,19 %, además en éstos dos tratamientos no existe diferencia significativa alguna, el pH 6 presentó el contenido más bajo de proteína 34,36 %.

**Tabla 8. Rendimiento del contenido proteico por el método de Kjeldahl.**

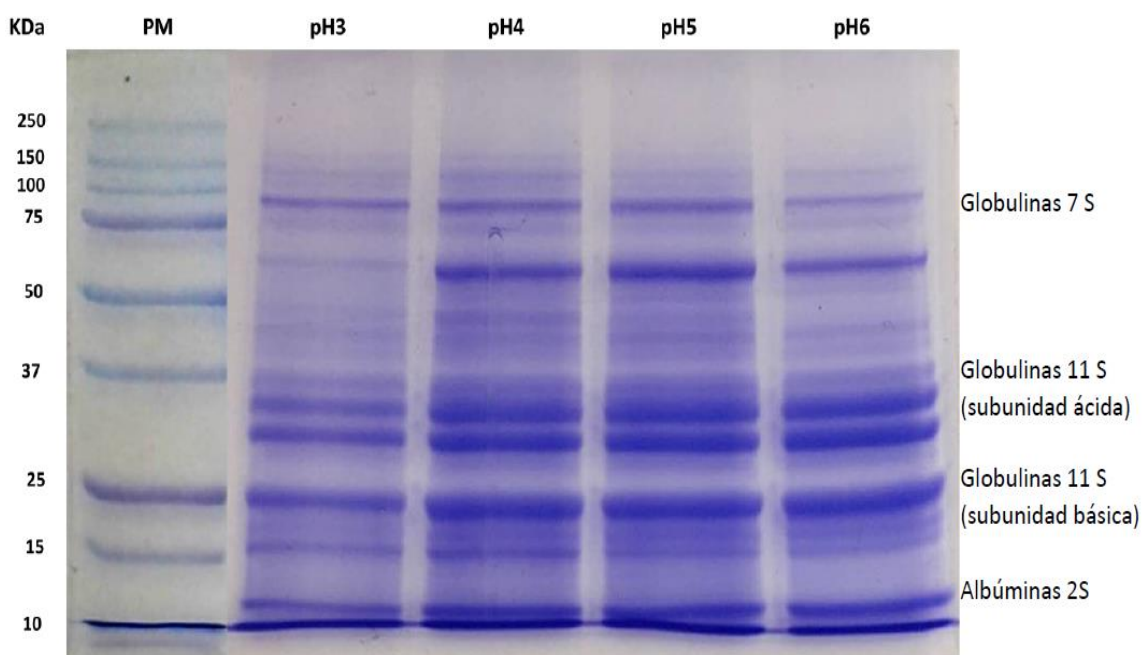
pH	Contenido de proteína (%)
3	41,19 <sup>c</sup> ± 1,10
4	38,92 <sup>b</sup> ± 0.14
5	42.31 <sup>c</sup> ± 0.58
6	34,36 <sup>a</sup> ± 0,44

Media ± Desviación estándar con n= 3. Las diferentes letras indican las diferencias significativas (p <0.05)  
Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

Indistintamente del método empleado en esta investigación para la cuantificación de proteína, la tendencia del rendimiento proteico se mantiene al emplear tanto el método de Biuret o el método de Kjeldahl, es así, que el contenido proteico va disminuyendo a pH 5, pH 3, pH 4 y pH 6 respectivamente, además se corrobora que la precipitación de proteína a pH 5 representa el mejor tratamiento en cuanto al contenido proteico, evidenciando que el punto isoeléctrico de las proteínas de haba pallar se encuentran cercanas a este pH. Se comprueba además que el rendimiento calculado a pH 6 fue interferido por agentes no proteicos los cuales fueron liofilizados conjuntamente con la proteína y por ello se obtuvo el mejor rendimiento a dicho pH, sin embargo, en la cuantificación por ambos métodos el porcentaje de proteína es el más bajo en comparación a los otros pH estudiados pues la muestra evaluada a pH 6 se aleja del punto isoeléctrico de esta leguminosa.

#### 4.1.4 Caracterización de la proteína de haba pallar por el método de electroforesis SDS - PAGE y Native - PAGE

Los aislados proteicos obtenidos mediante precipitación isoelectrónica a diferente pH (3, 4, 5 y 6) fueron caracterizados por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS - PAGE). Esta técnica permitió estudiar el perfil de las proteínas mediante separación de las moléculas en un campo eléctrico acorde a su peso molecular (PM), tal como se puede observar en la figura 4. Para la identificación de los distintos pesos moleculares se empleó un estándar de pesos moleculares conocidos comprendidos entre 10 kDa y 250 kDa, las bandas coloreadas de azul muestran las distintas proteínas presentes en los aislados de haba pallar.



**Figura 3.** Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferentes pH.

En matrices vegetales las proteínas que se pueden encontrar tradicionalmente son las albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas. Nikokyris y Kandylis (1997) manifiestan que las albúminas (ALB) y las globulinas (GLB) son las proteínas que se encuentran en mayor proporción en leguminosas, mientras que las prolaminas (PRO) y las glutelinas (GLT) se encuentran en una cantidad mucho menor. Además Gallegos Tintoré et al. (2004) en su estudio “Extracción y caracterización de las fracciones

proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L” menciona a Chan y Phillips (1994) quienes sustentan que la proporción de cada fracción proteica determina la calidad nutricional de la proteína así como también sus características fisicoquímicas y funcionales.

Al realizar la electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol (2-ME), las proteínas están en presencia de un agente desnaturizante, dodecilsulfato de sodio (SDS), el cual forma complejos desnaturizados que poseen carga negativa y el 2-mercaptoetanol actúa como un agente reductor, los enlaces disulfuro intra-catenarios e inter-catenarios son disgregados, por lo tanto, la estructura cuaternaria desaparece, y las subunidades se separan en forma de cadenas peptídicas individuales (García Pérez, 2000; Lomonte, 2007). En el gel de electroforesis con 2-mercaptoetanol, en todos los tratamientos se observaron bandas comprendidas en un peso molecular (PM) aproximado de 12-100 kDa.

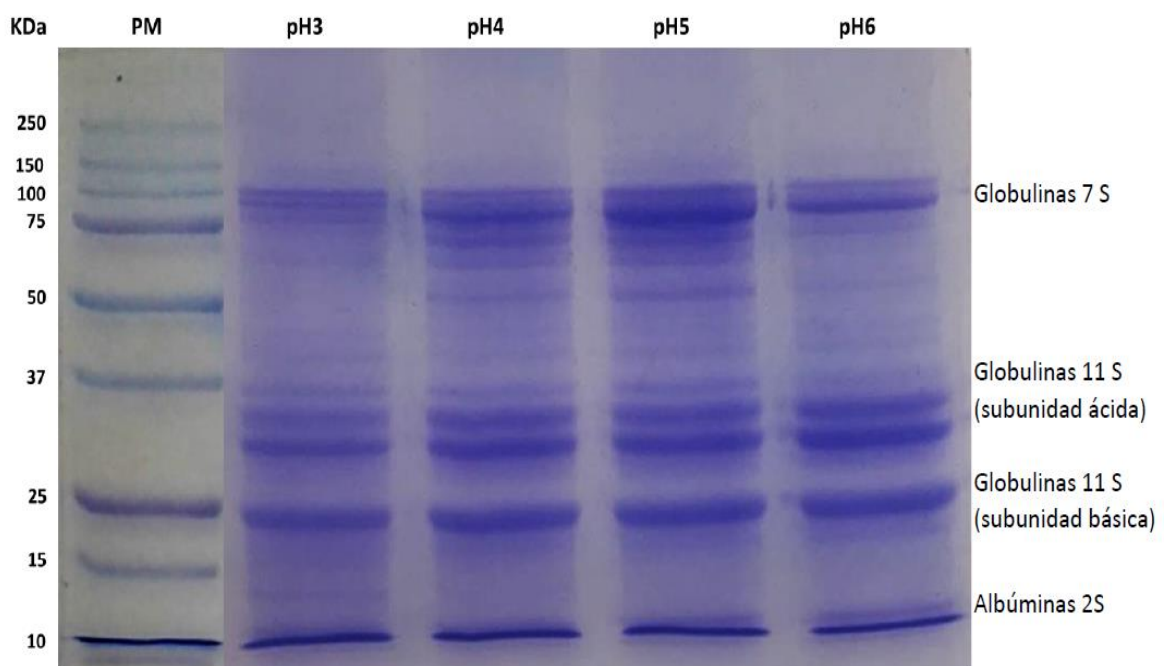
Jones et al. (1922) indican que en la composición de la proteína de *Phaseolus lunatus* están presentes globulinas y albúminas. Las globulinas son consideradas como proteínas de reserva y las fracciones proteicas 2S, 7S y 11S están presentes en la soya, perteneciente a la familia de las leguminosas, dichas fracciones se solubilizan a un pH superior a 8 (Calderón Domínguez, 2006).

El perfil proteico de las proteínas de haba pallar bajo condiciones del agente reductor (2-ME) muestran la presencia de proteínas de alto peso molecular correspondientes a 65 y 85 kDa, dichas bandas podrían corresponder a las globulinas 7S. Se asume además que las bandas encontradas a un peso molecular aproximado de 30 – 37 kDa se enmarcan como posibles globulinas 11S subunidad ácida y las bandas observadas entre 15 – 25 kDa como globulinas 11S subunidad básica, pues Romero-Zepeda y Paredes-López (1995) mencionan que las globulinas 11S o leguminas son hexámeros compuestos de dos subunidades ácida y básica con pesos moleculares aproximados de (29 – 35 kDa) y (18 – 28 kDa) respectivamente.

Las proteínas de bajo peso molecular (~12 kDa), mostradas en el perfil electroforético de haba pallar pueden corresponder a las albúminas 2S, pues en el estudio realizado por Brinegar et al. (1996) encontraron en quinua un perfil polipeptídico de masa

molecular aparente de 8 – 9 kDa en condiciones reductoras, reportando dicha fracción como subunidad 2S.

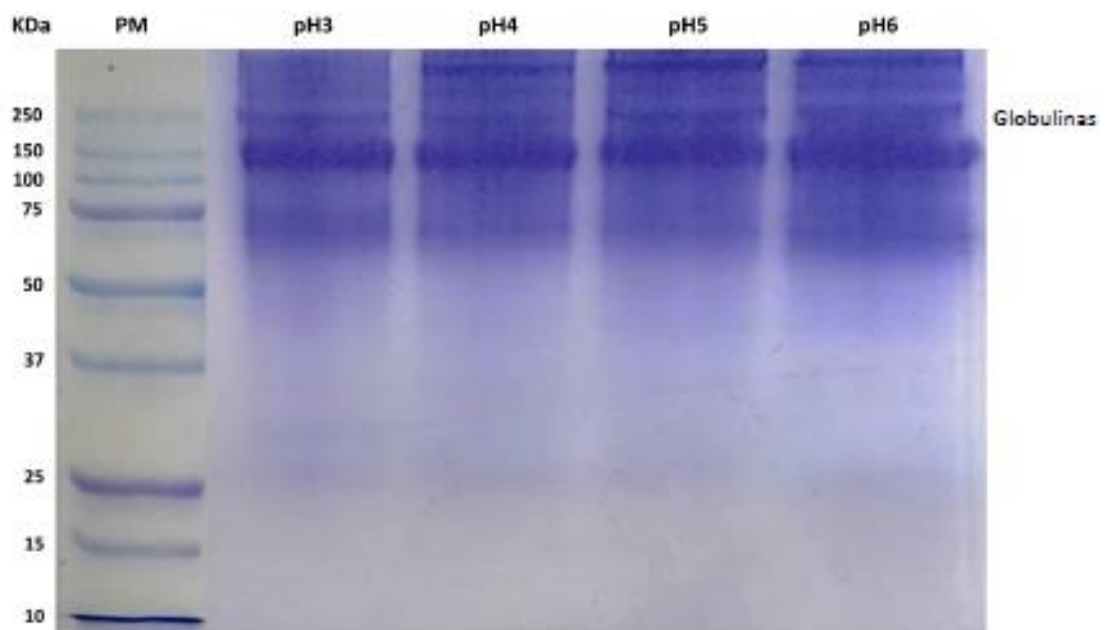
Lomonte (2007) menciona que el análisis de las muestras proteicas que no se encuentran bajo el efecto de reducción, generalmente sirven para evaluar la composición de sus subunidades, pues la proteína mantiene su forma y sus pliegues característicos de los enlaces disulfuro, es así que el gel de poliacrilamida sin 2-mercaptoetanol de las proteínas de haba pallar representadas en la figura 5, muestran que el perfil proteico con o sin el agente reductor (2-ME) son similares, presentando bandas de expresión que pueden ser correspondientes a las globulinas 7S y 11 S (ácida y básica) con peso molecular alto y albúminas 2S de bajo peso molecular.



**Figura 4.** Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferentes pH.

Al ser muy parecidos los perfiles proteicos de los aislados de haba pallar con 2-ME y sin 2-ME, se induce que la presencia de enlaces disulfuro en la estructura de las proteínas es mínimo.

La figura 6 muestra el análisis de la agregación de proteínas mediante el empleo del método electroforético Native – PAGE, en el gel se puede observar que la banda que se expresa en todos los aislados a diferente pH (3, 4, 5 y 6) es la correspondiente a 140 kDa, el peso molecular alto expresado en el gel denota la presencia de la fracción proteica Globulinas. Los pesos moleculares bajos no se visualizan en el gel puesto que en este método las proteínas se encuentran en su estado natural, es decir, no se emplea un agente reductor ni un agente desnaturizante en la preparación de la muestra, por lo tanto, la estructura secundaria de las proteínas y la densidad de carga nativa se mantienen, además la movilidad electroforética está estrictamente ligada a la carga eléctrica, tamaño y forma de la muestra (Arakawa et al., 2006).



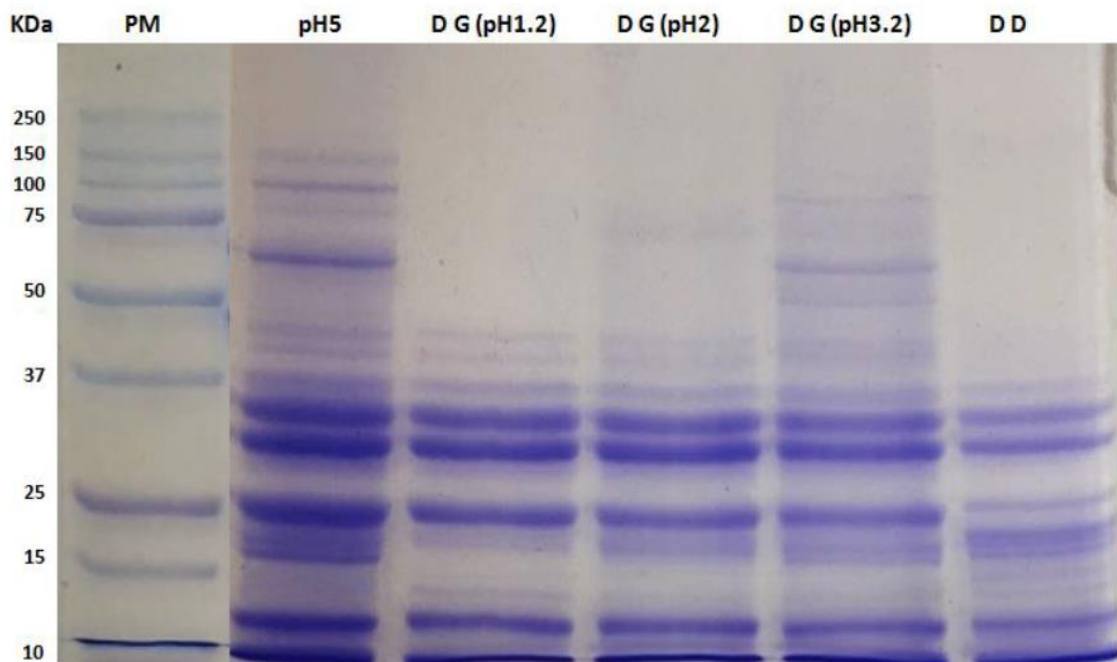
**Figura 5.** Electroforesis Native-PAGE de aislados proteicos de haba pallar precipitados a diferente pH.

#### **4.1.5 Digestión gástrica y duodenal de las proteínas aisladas de haba pallar (*in vitro*)**

Las proteínas son consideradas como uno de los componentes nutricionales más importantes dentro de la alimentación humana, éstas son procesadas en el aparato digestivo, dónde sus aminoácidos o pequeños péptidos son liberados, absorbidos y transportados hacia la sangre (Berg et al., 2002). La digestión de las proteínas empieza

en el estómago dónde las proteínas entran en contacto con la enzima proteolítica primaria denominada pepsina la cual actúa en un ambiente ácido propiciado por el estómago a pH 2 y continúa en el intestino delgado con la acción de enzimas pancreáticas como la tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Berg et al., 2002; León Sanz, 2006).

En este estudio, el ensayo de la digestibilidad gástrica y duodenal (*in vitro*) fue realizado con el aislado a pH 5 (mejor tratamiento), el cual fue tratado con fluidos gástricos simulados a diferentes pH, puesto que Lebenthal et al. (1983) y Jiménez-Saiz et al. (2011) aseveran que el pH influye significativamente en la hidrólisis enzimática, es así que el pH promedio de un individuo sano es cercano a 2.0, mientras que el pH de un niño se mantiene en un rango de entre 3-6 y el pH de un individuo que sufre de enfermedades gástricas es mucho más ácido (pH < 1.2).

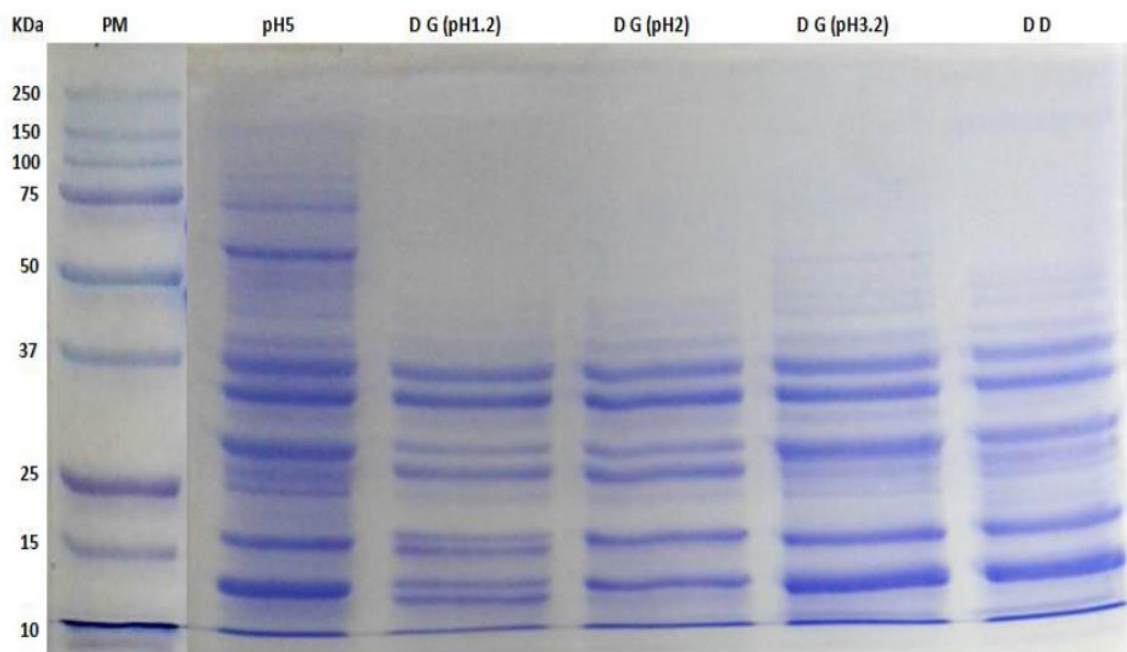


**Figura 6.** Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas de haba pallar. (172 U/ml pepsina). PM: Estándar de peso molecular. DG: Digestión gástrica. DD: Digestión duodenal.

En la Figura 7 se observa que en la digestión gástrica a pH 1,2 y 2 las proteínas con mayor peso molecular son digeridas sin ningún problema, sin embargo, las proteínas de peso molecular más bajo (PM < 45 kDa) no fueron digeridas con la acción de la

enzima (pepsina) a una concentración de 172 U/ml. También se observa que la digestión a pH 3.2 se da en menor grado que la llevada a cabo a pH 1.2 y 2 puesto que las fracciones proteicas a partir de 100 kDa no son digeridas. La digestión duodenal representada en el pocillo marcado como DD muestra que al emplear una mezcla de enzimas pancreáticas la digestión de las proteínas aumenta, sin embargo, las proteínas con un peso molecular menor a 37 kDa (Globulinas 11S (ácidas y básicas) y Albúminas 2S) siguen siendo resistentes a la acción enzimática.

Para comprobar si la concentración de enzima influye de manera significativa sobre la digestión de las proteínas de haba pallar se incrementó su concentración de 172 U/ml a 2000 U/ml, tal como se muestra en la figura 8, evidenciando que las fracciones proteicas con PM < 37 kDa, siguen siendo difíciles de digerir tanto gástrica como duodenalmente.



**Figura 7.** Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas de haba pallar. (2000 U/ml pepsina). PM: Estándar de peso molecular. DG: Digestión gástrica. DD: Digestión duodenal.

El haba pallar se caracteriza por tener una deficiencia de cistina, el cual es un aminoácido que está formado por un dímero de cisteína, unido entre sí por puentes disulfuro, por lo tanto la resistencia a la proteólisis de las globulinas y albúminas no está relacionado a los puentes disulfuro (S-S) (Skorecki et al., 2018). Las proteínas



presentes en la composición de los frijoles presentan baja digestibilidad, que se suele remediar con su cocción (Jones et al., 1922)

La indigestibilidad que presentan nuestros aislados al someterse a una digestión gástrica con pepsina y luego a una digestión duodenal con una mezcla de enzimas concuerda con los resultados obtenidos por Orruño y Morgan (2011) quienes realizaron una investigación sobre la resistencia de las proteínas de almacenamiento a enzimas proteolíticas en sésamo, pues en ambos casos las albúminas 2S y las Globulinas 11S generaron resistencia a la proteólisis, siendo la albúmina 2S la más resistente a la acción de la enzima pepsina. Molinas et al. (2004) menciona que las reacciones alérgicas producidas por alimentos, presentan características generales como por ejemplo las causadas por proteínas o glicoproteínas con peso molecular bajo (PM < 70 kDa), resistencia a la desnaturalización por la acción de proteasas, calor o acidificación. Por lo antes mencionado se puede deducir que las fracciones proteicas albúminas y globulinas de los aislados de haba pallar con peso molecular < 37 kDa que no fueron digeridas por acción enzimática, podrían estar asociadas a un factor de tipo alérgico.

#### **4.1.6 Actividades biológicas**

##### **4.1.6.1 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar (*in vitro*)**

Para mitigar los efectos de una inflamación, la droga más empleada durante muchos años es diclofenaco sódico el cual pertenece al grupo de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), éste posee una elevada acción analgésica y antiinflamatoria, sin embargo éste medicamento presenta efectos colaterales como la formación de úlceras pépticas e insuficiencia renal además de un alto riesgo de complicaciones cardiovasculares (Henrikson et al., 1985; Pinheiro, 2018).

En la actualidad se pretende encontrar componentes bioactivos inmersos en matrices vegetales o alimentarias que puedan tener un efecto igual o superior al proporcionado por los medicamentos elaborados de manera sintética. En el caso de la familia de las leguminosas se han realizado investigaciones en modelos (*in vivo*), la investigación

realizada por Chkhikvishvili et al. (2017) demuestra la existencia de actividad antiinflamatoria en extractos de habichuelas, y frijoles de Shulavera, empleando los modelos experimentales de líneas celulares MDCK y de células Jurkat. Por tanto los aislados proteicos obtenidos a partir de haba pallar a pH 3, pH 4, pH 5 y pH 6 fueron evaluados como potenciales antiinflamatorios mediante el método de desnaturalización de albúmina fresca de huevo descrita por Padmanabhan y Jangle (2012) a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml por triplicado y comparado con un antiinflamatorio comercial (diclofenaco de sodio) a las mismas concentraciones, los resultados obtenidos se enmarcan en la tabla 9.

**Tabla 9. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar**

	CONCENTRACIÓN			
	100 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
DICLOFENACO DE SODIO	18,31 ± 2,37 <sup>a</sup>	33,60 ± 2,21 <sup>b</sup>	56,15 ± 0,32 <sup>c</sup>	100,00 ± 3,53 <sup>d</sup>
<b>pH3</b>	11,38 ± 0,72 <sup>a</sup>	24,30 ± 0,08 <sup>b</sup>	36,97 ± 0,52 <sup>c</sup>	37,55 ± 0,94 <sup>c</sup>
<b>pH4</b>	5,55 ± 0,59 <sup>a</sup>	13,01 ± 0,20 <sup>b</sup>	21,27 ± 0,24 <sup>c</sup>	25,22 ± 0,25 <sup>d</sup>
<b>pH5</b>	19,27 ± 0,14 <sup>a</sup>	23,84 ± 0,11 <sup>b</sup>	30,86 ± 0,35 <sup>c</sup>	32,66 ± 0,76 <sup>d</sup>
<b>pH6</b>	7,47 ± 0,51 <sup>a</sup>	7,88 ± 0,26 <sup>a</sup>	12,67 ± 0,17 <sup>b</sup>	17,88 ± 0,17 <sup>c</sup>

Los valores que se presentan en la tabla reflejan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

La tabla anterior muestra que el patrón de diclofenaco sódico posee una relación directamente proporcional, es decir que, a mayor concentración de la droga, la inhibición antiinflamatoria es mayor, la misma tendencia se ve reflejada en los aislados proteicos de haba pallar a diferente pH. Los aislados proteicos a pH 3 y a pH 5 a una concentración de 1000 µg/ml muestran la mayor actividad antiinflamatoria con valores de 37,55 % y 32,66 % respectivamente, mientras que el aislado a pH 4 presenta la menor actividad antiinflamatoria (5,55 %) a una concentración de 100 µg/ml. A la máxima concentración testeada (1000 µg/ml), el pH 6 mostró el menor porcentaje de inhibición antiinflamatoria.

El estudio *in-vitro* realizado por Alhakmani et al. (2013) de la actividad antiinflamatoria con extractos de flores de Moringa oleífera mostró que los compuestos fenólicos presentes en la composición de las flores poseen una

significativa actividad antiinflamatoria pues se obtuvieron valores de 58,16, 88,10 y 101,50 % de inhibición de la desnaturalización de proteína a concentraciones de 100, 200 y 500  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, dichos valores son plenamente comparables con el medicamento estándar diclofenaco de sodio que presentó valores de inhibición de 84,95 % y 120,12 % a concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . A pesar de que los valores de inhibición de coagulación proteica de haba pallar no sobrepasa el 37,55 %, ésta sigue siendo una propiedad biológica atractiva para el mercado de producción de alimentos funcionales pues ésta actividad antiinflamatoria es proveniente de un producto de origen vegetal.

#### **4.1.6.2 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar (*in vitro*)**

Los radicales libres poseen uno o varios electrones desapareados, los cuales pueden resultar muy perjudiciales para la salud humana, puesto que estos producen daños en el cuerpo como el envejecimiento prematuro y enfermedades como la arterosclerosis, cáncer e incluso induce daños a nivel celular (Giraldo Vásquez y Ramírez Aristizabal, 2013; Mora, 2002). Una de las formas de inhibir o retardar los daños ocasionados por la presencia de radicales libres es el empleo de antioxidantes, los cuales pueden ser de origen natural o sintético, sin embargo el uso frecuente de antioxidantes sintetizados químicamente son restringidos por su alta incidencia carcinógena (Muñoz Juárez y Gutiérrez, 2009; Orjuela Rodriguez, 2015).

Los antioxidantes sintéticos al tener desventajas en la salud de quienes lo consumen, en la actualidad están siendo suplantados por antioxidantes de origen natural, los cuales no producen efectos colaterales al momento de su ingesta. Hoy en día las investigaciones que buscan descubrir actividades biológicas inmersas en matrices de origen vegetal se han incrementado notablemente, como es el caso de la investigación efectuada por Amarowicz (2008) quien señala que algunas fuentes de origen vegetal ricas en proteína, poseen efecto antioxidante, tales como la soja, canola y el maíz zein, además para la evaluación del efecto antioxidante se puede emplear distintas técnicas como la actividad antirradical contra el DPPH y radicales hidroxilo, actividad captadora de superóxido, sustancias ácidas reactivas (TBARS), entre otras. En esta investigación el método empleado para el análisis de la actividad antioxidante de las

proteínas de haba pallar fue el de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), dicha actividad fue probada a distintas concentraciones (100, 200, 500 y 1000)  $\mu\text{g/ml}$ . El control positivo BHT (Butil hidroxitolueno) fue sometido a las mismas condiciones y concentración.

**Tabla 10. Porcentaje de actividad antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar a diferente pH**

	CONCENTRACIÓN			
	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
<b>BHT</b>	62,74 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>	68,10 $\pm$ 2,35 <sup>ab</sup>	75,67 $\pm$ 6,09 <sup>bc</sup>	80,36 $\pm$ 2,34 <sup>c</sup>
<b>pH3</b>	3,17 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	4,52 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	8,61 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	16,48 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>
<b>pH4</b>	14,34 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	23,39 $\pm$ 1,78 <sup>b</sup>	23,54 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	29,28 $\pm$ 0,60 <sup>c</sup>
<b>pH5</b>	16,85 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	43,74 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	45,09 $\pm$ 2,72 <sup>b</sup>	64,29 $\pm$ 0,63 <sup>c</sup>
<b>pH6</b>	15,18 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	37,52 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>	51,78 $\pm$ 3,35 <sup>c</sup>	68,00 $\pm$ 1,31 <sup>d</sup>

Los valores que se presentan en la tabla reflejan la media de 3 mediciones  $\pm$  la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

Los porcentajes de la actividad biológica antioxidante de los aislados proteicos de *Phaseolus lunatus*. L están representados en la tabla 10. El antioxidante sintético empleado como control positivo (BHT) posee una actividad protectora de oxidación directamente proporcional, es decir que a mayor concentración de BHT, mayor es el porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica. Las muestras a diferente pH siguen también la tendencia del control positivo.

Los porcentajes más altos de la actividad antioxidante se obtuvieron a pH 6 y a pH 5 con valores entre (15,18 % - 68 %) y (16,85 % – 64,29 %) respectivamente, siendo el valor menor correspondiente a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y el porcentaje mayor correspondiente a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . El ensayo a pH 3 presentó la menor actividad antioxidante a comparación de los otros pHs estudiados, pues se obtuvieron valores bajos de actividad (3,17; 4,52; 8,61 y 16,48) % a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

El aislado proteico a pH 6 y una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  presenta la máxima actividad antioxidante 68 %, dicho valor al ser comparado con el valor obtenido a la

misma concentración, pero del control positivo BHT 80,36 % denota valores cercanos, por lo que se puede inferir que son valores comparables.

La capacidad antioxidante de los aislados obtenidos a pH 5 y pH 6 (alta capacidad protectora a la oxidación lipídica) pueden ser altamente beneficiosos para la industria alimentaria, ya que éstos aislados pueden ser usados como un ingrediente para la elaboración de productos funcionales.

#### **4.2 Verificación de hipótesis**

Se acepta la hipótesis Alternativa ( $H_a$ ), puesto que el pH de precipitación si ejerce influencia sobre el rendimiento y las actividades biológicas antiinflamatoria y antioxidante de los aislados de haba pallar.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Se aplicó el método de precipitación isoelectrica para la obtención de la proteína presente en la harina de haba pallar, obteniendo el mayor rendimiento a pH 6 con un valor de  $32.58^d \pm 0.30$ .
- La aplicación de la técnica de electroforesis SDS-PAGE mostró que en la digestión gástrica sólo la fracción considerada como globulinas 7S fueron digeridas casi en su totalidad a pH 1,2, 2 y 3,2, mientras que, en la digestión duodenal al aplicar una mezcla de enzimas, las globulinas 11S y las albúminas 2S (ambas de bajo PM < 37 KDa) que no fueron hidrolizadas por la enzima pepsina, mantienen una alta resistencia a la acción proteolítica.
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria (*in vitro*) de las proteínas aisladas de *Phaseolus lunatus* L. a diferente pH, obteniendo como resultado 33,55 % como el mayor porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albúmina a pH 3 a una concentración de 1000 µg/ml.
- Los aislados proteicos a pH 5 y pH 6 presentaron una alta capacidad antioxidante al aplicar el método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) con porcentajes de inhibición de 64,29 % y 68,00 %, respectivamente a una concentración de 1000 µg/ml.

## 5.2 Recomendaciones

- Probar la precipitación a valores intermedios de pH para conseguir una mayor aproximación al punto isoeléctrico de las proteínas del haba pallar y así mejorar el rendimiento.
- Elaborar un producto enriquecido con proteína aislada de haba pallar, puesto que en este estudio se obtuvo resultados satisfactorios en cuanto a las actividades biológicas antioxidante y antiinflamatoria.
- Aplicar a los aislados proteicos la técnica de electroforesis 2D SDS -PAGE para una mayor caracterización.
- Realizar el fraccionamiento de la proteína mediante precipitación selectiva con el empleo de H<sub>2</sub>O, NaCl, NaOH y Et-OH, y medir actividades biológicas en ellas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. (1980). Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. Whashington, D.C.
- Agostini-Costa, T. d. S., Teodoro, A. F. P., Alves, R. d. B. d. N., Braga, L. R., Ribeiro, I. F., Silva, J. P., . . . Burle, M. L. (2015). Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. *Ciência Rural*, 45(2), 335-341.
- Alhakmani, F., Kumar, S. y Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(8), 623-627.
- Amarowicz, R. (2008). Antioxidant activity of protein hydrolysates. *European journal of lipid science and technology*, 110(6), 489-490.
- Andueza Noh, R. H., Camacho Pérez, L., Martínez Castillo, J. y May Pat, F. (2016). Distribución geográfica de los parientes silvestres del acervo genético mesoamericano del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en México. *Polibotánica*(41), 101-113.
- Arakawa, T., Philo, J. S., Ejima, D., Tsumoto, K. y Arisaka, F. (2006). Aggregation analysis of therapeutic proteins, part 1. *BioProcess International*, 4(10), 32-42.
- Baudoin, J.-P., Baudoin, J.-P., Rocha, O., Degreef, J., Maquet, A. y Guarino, L. (2004). *Ecogeography, demography, diversity and conservation of Phaseolus lunatus L. in the central valley of Costa Rica* (Vol. 12): Bioersivity International.
- Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (Vol. 5). New York: W H Freeman.
- Brink, M. y Belay, G. (2006). *Céréales et légumes secs*: Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55-128. doi: 10.1023/a:1024146710611
- Calderón Domínguez, G. (2006). Obtención de la fracción proteínica 7S proveniente de soya germinada y sin germinar y su efecto en las propiedades reológicas de harina para panificación. Claves del Proyecto: 20060453 (original) y 20070335 (recurrente).



- Callisaya A, J. C. y Alvarado K, J. A. (2009). Aislados Proteínicos de granos altoandinos Chenopodiaceas; quinua *Chenopodium Quinoa* - Cañahua *Chenopodium Pallidicaule* por Precipitación Isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26, 12-20.
- Carrillo Terán, W. I., Vilcacundo, R. y Carpio, C. (2015). COMPUESTOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE AMARANTO Y QUINUA BIOACTIVE COMPONENTS DERIVED FROM AMARANTH AND QUINOA. *Actualización en Nutrición*, 16(1), 18-22.
- Chan, C.-W. y Phillips, R. D. (1994). Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1857-1860.
- Chel-Guerrero, L., Perez-Flores, V., Betancur-Ancona, D. y Davila-Ortiz, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-591.
- Chkhikvishvili, I., Mamniashvili, T., Gogia, N., Enukidze, M., Machavariani, M. y Sanikidze, T. (2017). ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEORGIAN LEGUMINOUS CROPS CULTURES. *Georgian medical news*(272), 147-153.
- Figueroa González, J. J., Guzmán Maldonado, S. H. y Herrera Hernández, M. G. (2015). Atributo nutricional y nutracéutica de panqué y barritas a base de harina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). 2015, 17(3), 6. doi: 10.18633/bt.v17i3.231
- Gallegos Tintoré, S., Pacheco Aguirre, J., Betancur Ancona, D. y Chel Guerrero, L. (2004). Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(1), 81-88.
- García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-34.
- Garfin, D. E. (2009). One-Dimensional Gel Electrophoresis1. In R. R. Burgess y M. P. Deutscher (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 497-513): Academic Press.

- Giraldo Vásquez, L. M. y Ramírez Aristizabal, L. S. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 47, 483-491.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. y David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751-766.
- Guerra, C. (2016). "Las leguminosas tienen un valor ambiental muy importante y desconocido". Recuperado de [http://www.saberuniversidad.es/actualidad/leguminosas-valor-ambiental-importante-desconocido\\_0\\_1008499151.html](http://www.saberuniversidad.es/actualidad/leguminosas-valor-ambiental-importante-desconocido_0_1008499151.html)
- Henrikson, P.-Å., Thilander, H. y Wåhlander, L. Å. (1985). Voltaren® as an analgesic after surgical removal of a lower wisdom tooth. *International Journal of oral surgery*, 14(4), 333-338.
- Heuzé, V., Tran, G., Sauvant, D., Bastianelli, D. y Lebas, F. (2015). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) *Feedipedia - Animal Feed Resources Information System*.
- Jacinto Hernández, C., Hernández Sánchez, H., Azpíroz Rivero, H. S., Acosta Gallegos, J. A. y Bernal Lugo, I. (2002). Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos componentes nutrimentales *Agrociencia*, 36(4), 451-459.
- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R. y Molina, E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food chemistry*, 127(4), 1719-1726. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Jones, D., Gersdorff, C., Johns, C. y Finks, A. (1922). The Proteins of the Lima Bean, *Phaseolus lunatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 53(2), 231-240.
- Kinsella, J. E. y Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7(3), 219-280.
- Kruezig, N. y Allen, M. (2016). The Biuret Method for the Determination of Total Protein Using an Evolution Array 8-Position Cell Changer. [https://www.analiticaweb.com.br/newsletter/16/51859\\_proteina\\_biureto.pdf](https://www.analiticaweb.com.br/newsletter/16/51859_proteina_biureto.pdf)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

- Lebenthal, E., Lee, P. y Heitlinger, L. A. (1983). Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *The Journal of pediatrics*, 102(1), 1-9.
- León, S. (2016). *Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de Aislados proteicos de torta de sésamo (Sesamum indicum)*. Universidad Técnica de Ambato. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22880/1/AL601.pdf>
- León Sanz, M. (2006). Proteínas en Nutrición Artificial. *Nutricion Enteral-EDIKAMED SL* [www.edikamed.com](http://www.edikamed.com).
- Lomonte, B. (2007). Manual de métodos inmunológicos.
- López Alcocer, J. d. J., Lépiz Ildelfonso, R., González Eguiarte, D. R., Rodríguez Macías, R. y López Alcocer, E. (2016). Variabilidad morfológica de *Phaseolus lunatus* L. silvestre de la región occidente de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 49-58.
- Marrugo, Y., Montero, P., Torregroza, E. y Duran, M. (2012). Potencial nutricional de tres cultivares de frijol Zaragoza (*Phaseolus lunatus* L.) y estimación de su digestibilidad "in vitro". *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 29, 314-326.
- Marrugo, Y., Montero, P. M. y Duran, 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
- Mendoza, H. y Linzán, L. (1993). Una variedad de haba veranera para el litoral ecuatoriano. In INIAP (Ed.): INIAP PORTOVIEJO.
- Molinas, J., Arduoso, L. y Crisci, C. (2004). Alergia alimentaria. *Invenio*, 7(12).
- Mora, R. J. (2002). *Soporte nutricional especial*: Ed. Médica Panamericana.
- Muñoz Juárez, M. y Gutiérrez, D. (2009). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana glauca*. *Facultad Química, Universidad Autónoma de Queretaro*.
- Nielsen, S. S. (1994). *Introduction to the Chemical Analysis of Foods*. U.S.A: Jones and Bartlett Publishers.

- Nikokyris, P. N. y Kandylis, K. (1997). Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2), 198-204.
- NutritionFacts. (2018). Lima beans nutrition facts. Obtenido de <https://www.nutrition-and-you.com/lima-beans.html>
- Olmedilla Alonso, B., Farré Rovir, R., Asensio Vegas, C. y Martín Pedrosa, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*, 14(2), 72-76. doi: [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(10\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(10)70014-6)
- Oomah, B. D., Corbé, A. y Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8225-8230.
- Orjuela Rodríguez, A. A. (2015). *Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chromolaena perglabra (BL Robinson) RM King y H. Robinson.*
- Orruño, E. y Morgan, M. R. (2011). Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Food chemistry*, 128(4), 923-929.
- Padmanabhan, P. y Jangle, S. (2012). Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 109 -116.
- Pinheiro, P. (2018). DICLOFENACO – PARA QUÉ SIRVE, POSOLOGÍA Y EFECTOS SECUNDARIOS. Obtenido de <https://www.mdsau.de.com/es/2018/02/diclofenac.html>
- PNBV. (2017-2021). Plan Nacional para el Buen Vivir Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, Senplades.
- Pochettino, M. L., Puentes, J. P., Buet Costantino, F., Arenas, P. M., Ulibarri, E. A. y Hurrell, J. A. (2012). Functional foods and nutraceuticals in a market of Bolivian immigrants in Buenos Aires (Argentina). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/320193>
- Poveda, T. (2016). *Evaluación del grado de Digestibilidad gastrointestinal, Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de Aislados proteicos de torta de*

- sésamo (Sesamum indicum)*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23824/1/AL609.pdf>
- Quinteros, M. F. (2016). *Estudio de la Digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y Actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Universidad Técnica de Ambato Ambato. Obtenido de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23823/1/AL608.pdf>
- 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*, 15(2), 212-218.
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J. y Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520.
- Skorecki, K., Chertow, G. M., Marsden, P. A., Taal, M. W. y Alan, S. (2018). *Brenner y Rector. El riñón+ ExpertConsult*: Elsevier Health Sciences.
- Verdini, R. (2017). Análisis del contenido de proteínas en los alimentos. Recuperado de [http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/124179/mod\\_resource/content/4/QA-2017-PROTEINAS-METODOS.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/124179/mod_resource/content/4/QA-2017-PROTEINAS-METODOS.pdf)
- Villalba Herrera, E. W. (2014). INFLAMACION I. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 43, 2261-2265.
- Villavicencio Linzán, P. y Zambrano Mendoza, J. (2008). Guía para la producción de maíz amarillo duro, en la zona central del litoral ecuatoriano: INIAP.
- Yellavila, S., Agbenorhevi, J., Asibuo, J. y Sampson, G. (2015). Proximate composition, minerals content and functional properties of five Lima bean accessions. *J Food Sec*, 3, 69-74.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### RENDIMIENTO DE LOS AISLADOS DE HABA PALLAR A DIFERENTE pH

**Tabla 11. Datos obtenidos de los pesos iniciales de la muestra de harina de haba pallar y peso final, posterior a su liofilización.**

pH	Réplica	W INICIAL (g)	W FINAL (g)
3	1	5,0099	0,4380
	2	5,0026	0,4275
	3	5,0064	0,4328
4	1	5,0003	0,9282
	2	5,0007	0,8712
	3	5,0013	0,9852
5	1	5,0003	0,6433
	2	5,0008	0,6513
	3	5,0002	0,6353
6	1	5,0057	1,6458
	2	5,0058	1,6310
	3	5,0056	1,6162

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 12. Datos del porcentaje de rendimiento del proceso de liofilización de cada pH por triplicado.**

pH	Réplica	% Rendimiento
3	1	8,74
	2	8,55
	3	8,64
4	1	18,56
	2	17,42
	3	19,70
5	1	12,87
	2	13,02
	3	12,71
6	1	32,88
	2	32,58
	3	32,29

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 13. Análisis de varianza del porcentaje de rendimiento de proteína de haba pallar**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	980,336	3	326,779	920,698	,000
Dentro de grupos	2,839	8	,355		
Total	983,176	11			

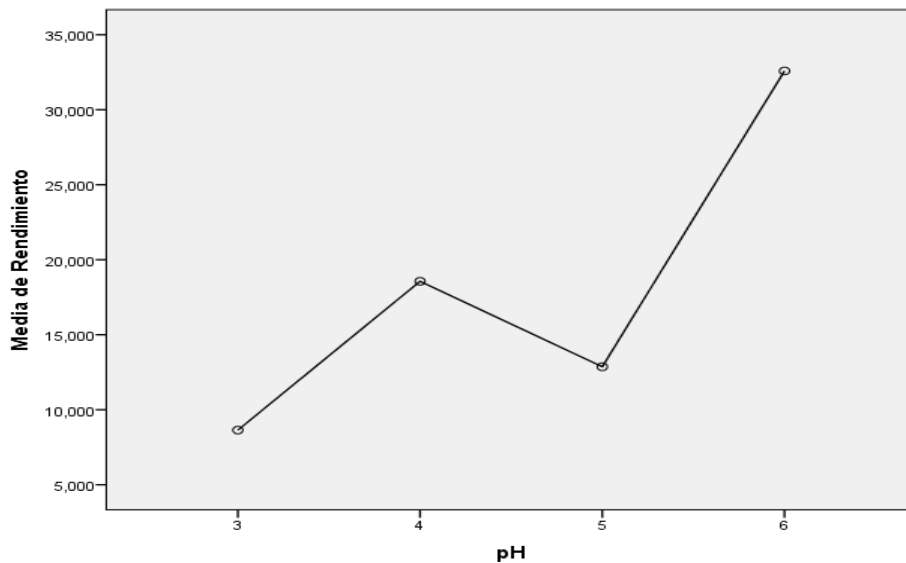
**Tabla 14. Análisis estadístico del porcentaje de rendimiento de proteína de haba pallar, precipitada a diferente pH.**

HSD Tukey<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3	3	8,64333			
5	3		12,86667		
4	3			18,56000	
6	3				32,58333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.



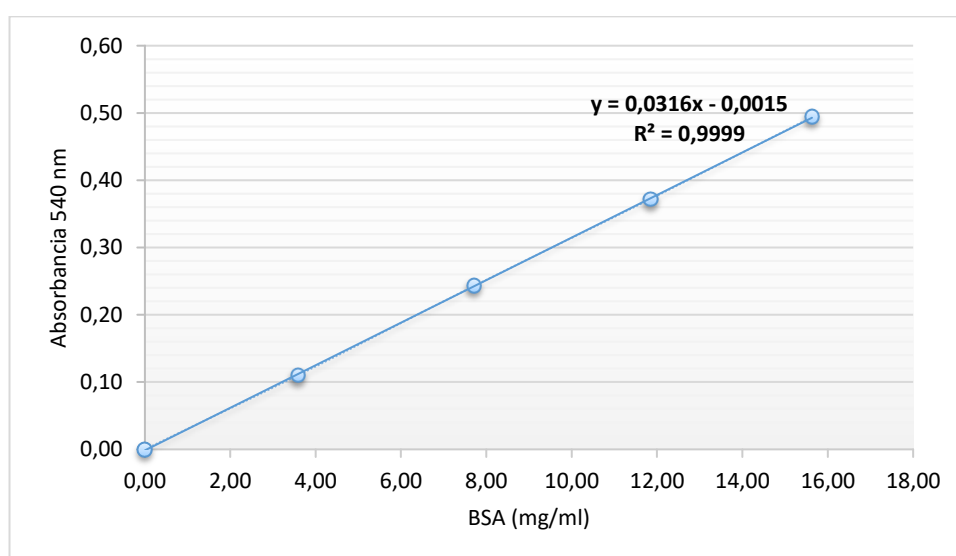
**Figura 8.** Gráfico de medias del porcentaje de rendimiento de proteína aislada a diferente pH



**Tabla 15. Datos de la curva estándar de pepsina de albúmina de suero bovina (BSA)**

<b>Concentración de BSA (mg/ml)</b>	<b>Absorbancia (nm)</b>
0,00	0,00
3,59	0,11
7,72	0,24
11,84	0,37
15,63	0,49

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.



**Figura 9.** Curva estándar de BSA

**Ecuación de la Recta:**

$$A = m * C + B$$

Donde:

**A:** Absorbancia

**m:** Pendiente de la recta

**C:** Concentración (mg/ ml)

**B:** Interacción del valor de la absorbancia

**Tabla 16. Valores de absorbancia de los aislados proteicos a diferente pH, analizados por el método Biuret y medidos a 540 nm**

pH	Longitud de onda	ABSORBANCIA			
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
3	540 nm	0,218	0,218	0,218	0,215
4	540 nm	0,197	0,198	0,216	0,218
5	540 nm	0,227	0,227	0,256	0,255
6	540 nm	0,208	0,208	0,212	0,212

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 17. Concentración de Proteína presente en cada muestra a diferente pH**

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
<b>Réplica 1</b>	6,9	6,3	7,2	6,6
<b>Réplica 2</b>	6,9	6,3	7,2	6,6
<b>Réplica 3</b>	6,9	6,9	8,1	6,7
<b>Réplica 4</b>	6,8	6,9	8,1	6,7

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 18. Rendimiento (%R) de la proteína de haba pallar aislada a diferente pH**

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
<b>Réplica 1</b>	69,38	62,43	72,12	55,27
<b>Réplica 2</b>	69,39	62,74	72,12	55,27
<b>Réplica 3</b>	71,02	61,90	70,67	58,33
<b>Réplica 4</b>	70,06	62,47	70,40	58,33
<b>PROMEDIO</b>	69,96	62,39	71,33	56,80

**Tabla 19. Análisis de varianza del contenido proteico presente en los aislados de haba pallar a diferente pH**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	580,327	3	193,442	160,670	,000
Dentro de grupos	14,448	12	1,204		
Total	594,775	15			

**Tabla 20. Análisis estadístico del contenido proteico de haba pallar por el método Biuret**

HSD Tukey<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	4	56,8000		
4	4		62,3850	
3	4			69,9625
5	4			71,8275
Sig.		1,000	1,000	,129

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

## ANEXO C

### CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS AISLADOS DE HABA PALLAR POR EL MÉTODO KJENDAHL

**Tabla 21. Porcentaje de Nitrógeno en los aislados de haba pallar**

		W muestra (g)	vol. HCl (ml)	blanco (ml)	ácido corregido (ml)	% N
pH3	R1	0,156	7,55	0,4	7,15	6,42
	R2	0,151	7,4	0,1	7,3	6,77
	R3	0,153	7,3	0,1	7,2	6,59
pH4	R1	0,152	7,15	0,4	6,75	6,22
	R2	0,15	7,1	0,4	6,7	6,25
	R3	0,151	6,8	0,1	6,7	6,21
pH5	R1	0,152	7,35	0,1	7,25	6,68
	R2	0,154	7,65	0,1	7,55	6,86
	R3	0,151	7,4	0,1	7,3	6,77
pH6	R1	0,151	6,1	0,1	6	5,56
	R2	0,151	5,95	0,1	5,85	5,42
	R3	0,151	6,04	0,1	5,94	5,51

Factor de conversión para obtener la cantidad de proteína bruta, a partir del nitrógeno total para haba pallar = 6,25

**Tabla 22. Análisis de varianza del contenido proteico presente en los aislados de haba pallar a diferente pH**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	111,414	3	37,138	84,505	,000
Dentro de grupos	3,516	8	,439		
Total	114,930	11			

**Tabla 23. Análisis estadístico del contenido proteico de haba pallar por el método Kjendahl**

HSD Tukey<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	3	34,3633		
4	3		38,9200	
3	3			41,1933
5	3			42,3133
Sig.		1,000	1,000	,241

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

## ANEXO D

### ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE HABA PALLAR POR EL MÉTODO DE DESNATURALIZACIÓN DE ALBÚMINA

**Tabla 24. Valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 660 nm de la actividad antiinflamatoria por el método de desnaturalización de albúmina**

Tratamiento	Blanco	Conc. Proteína ug/ml	Absorbancia		
			R1	R2	R3
pH 3	1,786	100	1,613	1,630	1,631
		200	1,440	1,440	1,442
		500	1,252	1,264	1,266
		1000	1,238	1,256	1,264
pH 4	1,595	100	1,517	1,524	1,532
		200	1,427	1,431	1,431
		500	1,322	1,324	1,328
		1000	1,271	1,276	1,277
pH 5	1,798	100	1,520	1,522	1,524
		200	1,455	1,457	1,458
		500	1,351	1,358	1,360
		1000	1,318	1,336	1,338
pH 6	1,784	100	1,674	1,674	1,687
		200	1,669	1,673	1,676
		500	1,603	1,604	1,607
		1000	1,529	1,530	1,533
DICLOFENACO DE SODIO	1,594	100	1,327	1,379	1,379
		200	1,151	1,152	1,200
		500	0,878	0,881	0,886
		1000	0,291	0,309	0,376

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 25. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de los aislados proteicos de haba pallar**

pH	Conc. Proteína ug/ml	% Actividad				
		R1	R2	R3	Promedio	DS
3	100	12,2135	10,9825	10,9473	11,3811	0,7211
	200	24,3479	24,3479	24,2072	24,3010	0,0812
	500	37,5727	36,7285	36,6230	36,9747	0,5205
	1000	38,5926	37,2913	36,7637	37,5492	0,9414
4	100	6,1162	5,6041	4,9344	5,5516	0,5927
	200	13,2469	12,8923	12,8923	13,0105	0,2047
	500	21,4807	21,3231	21,0079	21,2706	0,2407
	1000	25,4991	25,1445	25,0263	25,2233	0,2460
5	100	19,4118	19,2720	19,1322	19,2720	0,1398
	200	23,9546	23,8148	23,7449	23,8381	0,1068
	500	31,2580	30,7339	30,5941	30,8620	0,3500
	1000	33,5295	32,2714	32,1666	32,6558	0,7584
6	100	7,7636	7,7636	6,8834	7,4702	0,5082
	200	8,1509	7,8692	7,6228	7,8810	0,2643
	500	12,7985	12,7281	12,4816	12,6694	0,1664
	1000	18,0095	17,9390	17,6926	17,8804	0,1664
DICLOFENACO DE SODIO	100	21,0457	16,9469	16,9469	18,3132	2,3664
	200	34,9185	34,8397	31,0562	33,6048	2,2075
	500	56,4372	56,2007	55,8066	56,1482	0,3186
	1000	102,7063	101,2874	96,0063	100,0000	3,5306

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 26. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 3**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1382,227	3	460,742	1096,940	,000
Dentro de grupos	3,360	8	,420		
Total	1385,587	11			

**Tabla 27. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 3**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
100	3	11,3800		
200	3		24,3033	
500	3			36,9733
1000	3			37,5467
Sig.		1,000	1,000	,709

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 28. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 4**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	692,124	3	230,708	1786,242	,000
Dentro de grupos	1,033	8	,129		
Total	693,157	11			

**Tabla 29. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 4**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	5,5500			
200	3		13,0100		
500	3			21,2700	
1000	3				25,2233
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.



**Tabla 30. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 5**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	348,606	3	116,202	636,317	,000
Dentro de grupos	1,461	8	,183		
Total	350,067	11			

**Tabla 31. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 5**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	19,2700			
200	3		23,8333		
500	3			30,8600	
1000	3				32,6567
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 32. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria a pH 6**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	214,328	3	71,443	742,199	,000
Dentro de grupos	,770	8	,096		
Total	215,098	11			

**Tabla 33. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria a pH 6**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
100	3	7,4667		
200	3	7,8800		
500	3		12,6700	
1000	3			17,8800
Sig.		,415	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 34. Análisis de varianza de la actividad antiinflamatoria del control positivo Diclofenaco de sodio**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11383,268	3	3794,423	658,917	,000
Dentro de grupos	46,069	8	5,759		
Total	11429,337	11			

**Tabla 35. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del control positivo Diclofenaco de sodio**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	18,3167			
200	3		33,6067		
500	3			56,1500	
1000	3				100,0033
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

## ANEXO E

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE HABA PALLAR POR EL MÉTODO DE TBARS

**Tabla 36. Valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 532 nm de la actividad antioxidante por el método TBARS**

pH	Conc. Proteína ug/ml	Absorbancia			
		Blanco	R1	R2	R3
3	100	0,914	0,885	0,884	0,886
	200	0,914	0,871	0,872	0,875
	500	0,914	0,834	0,835	0,837
	1000	1,046	0,872	0,874	0,875
4	100	1,046	0,982	0,986	0,990
	200	0,914	0,993	1,006	1,000
	500	1,046	0,948	0,945	0,950
	1000	1,046	0,924	0,921	0,926
5	100	1,046	0,976	0,972	0,979
	200	1,046	0,852	0,874	0,863
	500	1,046	0,848	0,854	0,870
	1000	1,046	0,775	0,776	0,780
6	100	0,914	0,853	0,864	0,859
	200	1,046	0,882	0,896	0,889
	500	1,046	0,818	0,825	0,845
	1000	1,046	0,756	0,767	0,762
TBA	100	0,870	0,661	0,652	0,642
	200	0,870	0,626	0,631	0,642
	500	0,870	0,626	0,610	0,584
	1000	0,870	0,596	0,594	0,581

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 37. Porcentaje de inhibición antioxidante de los aislados proteicos de haba pallar**

Tratamiento	Conc. Proteína ug/ml	% Actividad				
		R1	R2	R3	Promedio	DS
pH 3	100	3,1729	3,2823	3,0635	3,1729	0,1094
	200	4,7046	4,5952	4,2670	4,5222	0,2278
	500	8,7527	8,6433	8,4245	8,6069	0,1671
	1000	16,6348	16,4436	16,3480	16,4755	0,1460
pH 4	100	15,2964	14,3403	13,3843	14,3403	0,9560
	200	21,6083	25,1641	23,3862	23,3862	1,7779
	500	23,5421	24,1396	22,9446	23,5421	0,5975
	1000	29,2782	29,8757	28,6807	29,2782	0,5975
pH 5	100	16,8499	17,6864	16,0134	16,8499	0,8365
	200	46,3671	41,1090	43,7380	43,7380	2,6291
	500	47,3231	45,8891	42,0650	45,0924	2,7181
	1000	64,7706	64,5315	63,5755	64,2925	0,6323
pH 6	100	16,6849	13,6761	15,1805	15,1805	1,5044
	200	39,1969	35,8509	37,5239	37,5239	1,6730
	500	54,4933	52,8203	48,0402	51,7846	3,3489
	1000	69,3117	66,6826	67,9971	67,9971	1,3145
TBA	100	60,0575	62,6437	65,5172	62,7395	2,7311
	200	70,1149	68,6782	65,5172	68,1034	2,3521
	500	70,1149	74,7126	82,1839	75,6705	6,0912
	1000	78,7356	79,3103	83,0460	80,3640	2,3404

Fuente: Laboratorio Bio-Propepti (FCIAL), 2018.

**Tabla 38. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 3**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	322,339	3	107,446	3800,627	,000
Dentro de grupos	,226	8	,028		
Total	322,565	11			

**Tabla 39. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 3**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	3,1729			
200	3		4,5223		
500	3			8,6068	
1000	3				16,4755
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 40. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 4**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	342,962	3	114,321	95,487	,000
Dentro de grupos	9,578	8	1,197		
Total	352,540	11			

**Tabla 41. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 4**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
100	3	14,3403		
200	3		23,3862	
500	3		23,5421	
1000	3			29,2782
Sig.		1,000	,998	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 42. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 5**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3423,286	3	1141,095	296,398	,000
Dentro de grupos	30,799	8	3,850		
Total	3454,085	11			

**Tabla 43. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 5**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
100	3	16,8499		
200	3		43,7380	
500	3		45,0924	
1000	3			64,2925
Sig.		1,000	,832	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 44. Análisis de varianza de la actividad antioxidante a pH 6**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4517,637	3	1505,879	334,541	,000
Dentro de grupos	36,011	8	4,501		
Total	4553,648	11			

**Tabla 45. Análisis estadístico de la actividad antioxidante a pH 6**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	15,1805			
200	3		37,5239		
500	3			51,7846	
1000	3				67,9971
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Tabla 46. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del control positivo TBA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	552,162	3	184,054	13,248	,002
Dentro de grupos	111,145	8	13,893		
Total	663,306	11			

**Tabla 47. Análisis estadístico de la actividad antioxidante del control positivo TBA**

HSD Tukey<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
100	3	62,7395		
200	3	68,1034	68,1034	
500	3		75,6705	75,6705
1000	3			80,3640
Sig.		,356	,137	,459

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

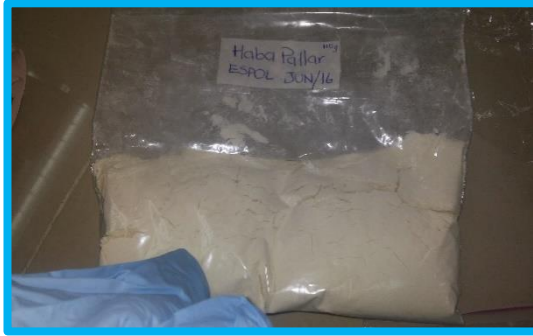
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.



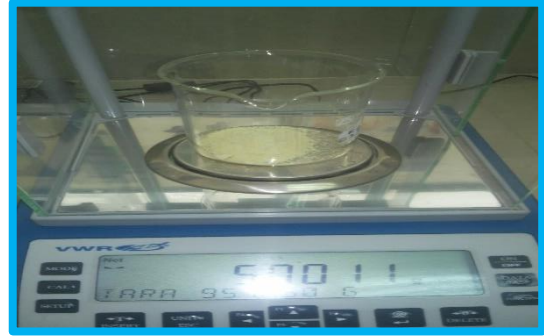
## ANEXO F

### FOTOGRAFÍAS

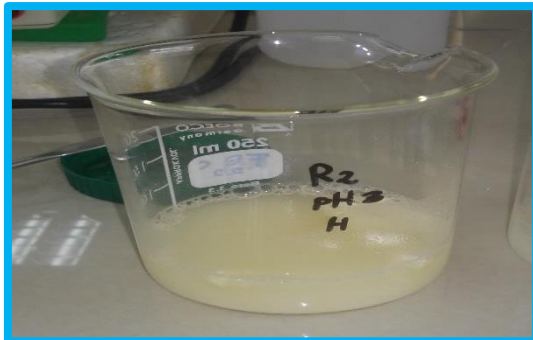
#### AISLADO DE PROTEÍNA



Harina de haba pallar



Pesado de la muestra



Solubilización de la muestra



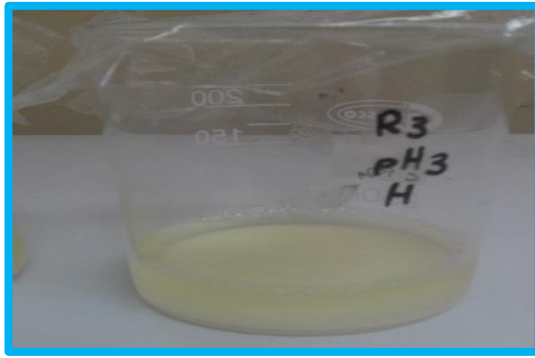
Ajuste pH 8 (Solubilización)



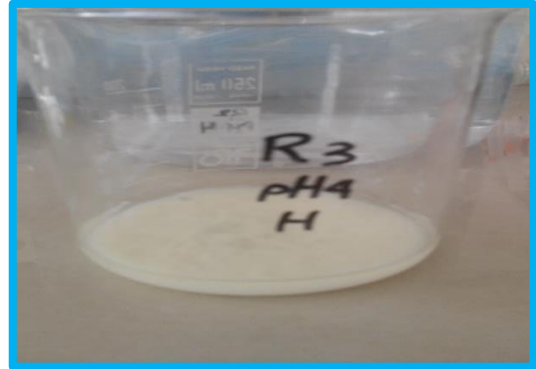
Centrifugado de las muestras



Ajuste pH precipitación (3, 4, 5 y 6)



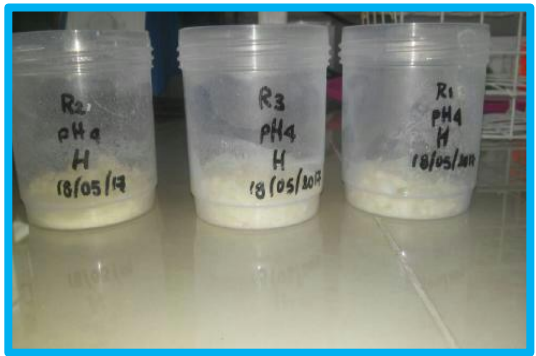
Precipitación (24 horas)



Eliminación del sobrenadante

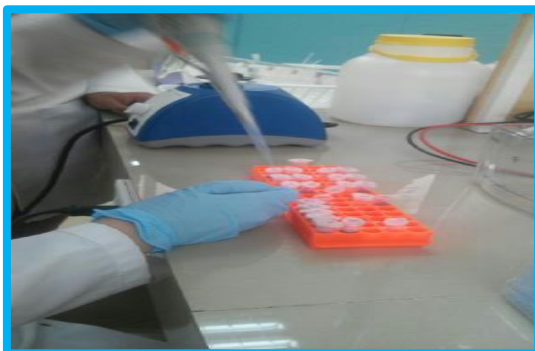


Liofilización



Muestras liofilizada

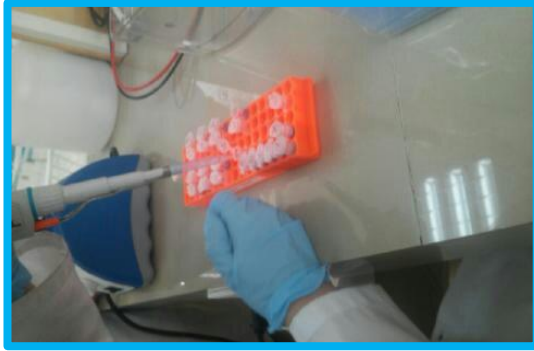
## CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE BIURET



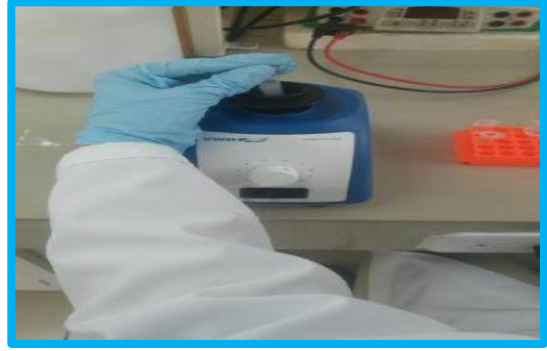
Preparación de la muestra



Incubación muestras



Adición del reactivo Biuret



Homogeneización de la muestra



Centrifugación



Medición de absorbancia

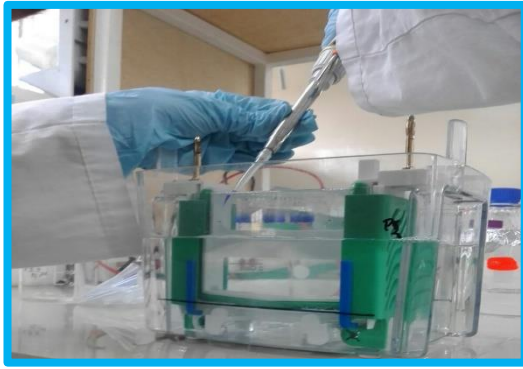
## ELECTROFORESIS



Equipo de electroforesis



Preparación muestras



Colocación de las muestras en el gel



Corrida de las muestras

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



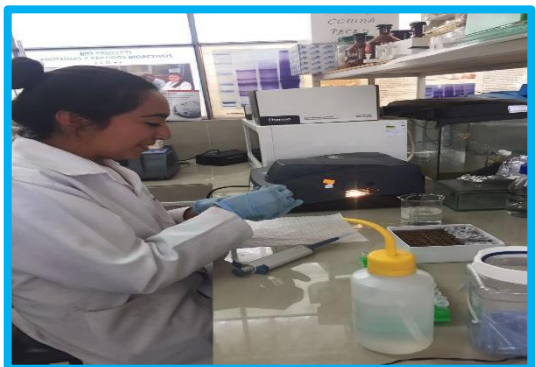
Muestras



Aceite oxidado



Incubación



Lectura espectrofotométrica