



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



Evaluación de las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de aislados e hidrolizado proteico de Habichuela baby lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) y su digestibilidad *in vitro*.

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, 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.

Autor: Javier Alberto Tamayo García.

Tutor: PhD. William Ricardo Calero Cáceres.

Ambato – Ecuador

Julio-2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres.

CERTIFICA:

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

Ambato, 14 de Mayo del 2018



William Ricardo Calero Cáceres, PhD
C.I. 171434885-9
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Javier Alberto Tamayo García, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Javier Alberto Tamayo García

C.I. 180541870-2

AUTOR

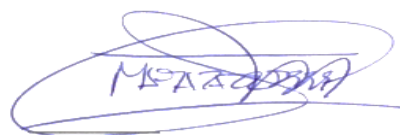
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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



PhD. Mayra Liliana Paredes Escobar
C.I. 050187395-4



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9

Ambato, 09 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 esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Javier Alberto Tamayo García

C.I. 180541870-2

AUTOR

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado para mis Padres, que supieron guiarme en toda mi vida y darme todo el apoyo necesario para seguir adelante.

A mi abuelita que me sigue enviando la fuerza necesaria para seguir en este caminar.

A mi hermano, un ejemplo de vida que ha estado en todos los momentos y en todas las adversidades.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todas las bendiciones q me ha dado, y siempre ser la guía e ilumina mi camino.

A la Universidad Técnica de Ambato, a mis profesores de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por todo el conocimiento y apoyo brindado.

A mis Padres, que supieron guiarme en toda mi vida y darme todo el apoyo necesario para seguir adelante.

A mi abuelita que me sigue enviando la fuerza necesaria para seguir en este caminar.

A toda mi familia, que han sido un ejemplo de vida y siempre han estado todos los momentos y en todas las adversidades.

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión del Dr. William Calero, a quien agradezco por su apoyo incondicional y paciencia. Además de manera especial al apoyo de la Dirección de Investigación y Desarrollo DIDE-Universidad Técnica de Ambato (Proyecto 2074-CU-P-2016 "Valorización de la Calidad Nutricional de Alimentos Tradicionales de la Población Ecuatoriana") y a todos los colaboradores (PhD. Mayra Paredes, Ing. Cecilia Carpio, PhD. Dayana Morales, Ing. Tatiana Poveda, Ing. Paulo Baquero) que participaron en este exitoso proyecto.

INDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA.....	3
1.1 Tema de investigación.....	3
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
CAPITULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Antecedentes Investigativos.....	7
2.2 Hipótesis.....	11
2.3 Señalamiento de las variables de hipótesis.....	14
CAPÍTULO III.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Materiales.....	16
3.1.1 Materia Prima.....	16
3.1.2 Equipos.....	16
3.1.3 Materiales de laboratorio (Vidrio, Plástico).....	17

3.1.4	Reactivos empleados en la investigación.....	17
3.1.5	Insumos y utensilios.....	18
3.2	Aislado de Proteínas de Habichuela.....	19
3.3	Cuantificación Proteica.....	19
3.4	Obtención del hidrolizado proteico.....	20
3.5	Caracterización de los aislados proteicos.....	21
3.5.1	Electroforesis (SDS-PAGE):.....	21
3.5.2	Simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal <i>in vitro</i> :	23
3.6	Actividades biológicas:	23
3.6.1	Actividad antioxidante de los aislados proteicos y del hidrolizado proteico (mejor tratamiento):	23
3.6.2	Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos y del hidrolizado proteico <i>in vitro</i>	24
3.6.3	Actividad antimicrobiana del aislado proteico e hidrolizado proteico.....	25
3.7	Análisis estadístico y Diseño Experimental.	26
CAPÍTULO IV.....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
4.1	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
4.1.1	Análisis Proximal	27
4.1.2	Rendimiento de los aislados proteicos de la harina de habichuela	28
4.1.3	Cuantificación proteica por Biuret.....	30
4.1.4	Caracterización de los Aislados proteicos.....	31
4.1.5	Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i>	34
4.1.5	Actividad Antioxidante.	36
4.1.6	Actividad Antiinflamatoria.....	41
4.1.7	Actividad Antimicrobiana	47
4.2	Verificación de la hipótesis	51
4.2.1	Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.	51
4.2.2	Cuantificación de la proteína de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.	51
4.2.3	Digestibilidad de las proteínas de habichuela baby lima bean.....	51
4.2.4	Actividad Antiinflamatoria de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.	51

4.2.5 Actividad Antioxidante de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.	51
4.2.6 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (mejor tratamiento).....	52
4.2.7 Actividad Antiinflamatoria del hidrolizado proteico (mejor tratamiento).	52
4.2.8 Actividad Antioxidante del hidrolizado proteico (mejor tratamiento).	52
4.2.9 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela (mejor tratamiento).	52
CAPÍTULO V	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
5.1 Conclusiones	53
5.2 Recomendaciones.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	68

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1 Análisis proximal de la harina de Habichuela	27
Tabla 2. Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación (%)	29
Tabla 3. Contenido proteico de los aislados obtenidos a diferentes pH mediante el método de Biuret.	30
Tabla 4. Actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH de precipitación.	36
Tabla 5. Actividad antioxidante del aislado obtenido a pH 5 y Control (BHT).....	38
Tabla 6. Actividad antioxidante del hidrolizado proteico y Control (BHT)	40
Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH de precipitación.	42
Tabla 8. Actividad antiinflamatoria del aislado obtenido a pH 5 y el control (Diclofenaco).....	44
Tabla 9. Actividad antiinflamatoria del Hidrolizado proteico y el control (Diclofenaco)	46
Tabla 10. Distancias (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones .	50
Tabla 11. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pH de precipitación. .	70
Tabla 12. Rendimiento (ANOVA).....	70
Tabla 13. Prueba de Comparación (Tukey).....	71
Tabla 14. Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación (%) (Mejor tratamiento).....	71
Tabla 15. Datos para la construcción de la curva estándar albúmina de suero bovina (BSA)	73
Tabla 16. Valores de absorbancia de los aislados proteicos de habichuela medidos a 540 nm.....	74
Tabla 17. Cálculo del contenido proteico (%) de aislados proteicos de habichuela (mejor tratamiento).....	74
Tabla 18. Contenido Proteico (ANOVA)	74
Tabla 19. Comparación entre pH de precipitación (Test Tukey).....	75
Tabla 20. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria obtenidas de los aislados proteicos de Habichuela	77

Tabla 21. ANOVA para Actividad por pH.....	77
Tabla 22. Medias para Actividad por pH con intervalos de confianza del 95,0%	78
Tabla 23. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria del patrón positivo y del pH 5 de acuerdo al contenido proteico.....	78
Tabla 24. Análisis de Varianza para % Actividad Antiinflamatoria - Suma de Cuadrados Tipo III	79
Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Diclofenaco y pH 5	79
Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Concentración	80
Tabla 27. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria del patrón positivo y del Hidrolizado proteico.....	82
Tabla 28. Análisis de Varianza para % Actividad Antiinflamatoria - Suma de Cuadrados Tipo III	82
Tabla 29. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Diclofenaco y pH 5	83
Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Concentración	83
Tabla 31. Porcentaje de Actividad Antioxidante obtenidas de los aislados proteicos de Habichuela.....	86
Tabla 32. ANOVA para Actividad por PH.....	86
Tabla 33. Porcentaje de la Actividad Antioxidante del patrón positivo y del pH 5 de acuerdo al contenido proteico.	87
Tabla 34. Análisis de Varianza para % Inhibición lipídica - Suma de Cuadrados Tipo III.....	87
Tabla 35. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por BHT y pH 5 .	88
Tabla 36. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por Concentración	88
Tabla 37. Porcentaje de la Actividad Antioxidante del patrón positivo y el Hidrolizado proteico.....	90
Tabla 38. Análisis de Varianza para % Inhibicion lipídica - Suma de Cuadrados Tipo III.....	90

Tabla 39. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por BHT e Hidrolizado.....	91
Tabla 40. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por Concentración	91
Tabla 41. Halos de inhibición del aislado proteico (Mejor Tratamiento).	94
Tabla 42. Halos de inhibición del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento).....	96
Tabla 43. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente <i>L. monocytogenes</i> (ANOVA).....	96
Tabla 44. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente <i>E. coli</i> . (ANOVA).	97
Tabla 45. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente <i>P. aeruginosa</i> (ANOVA).....	99
Tabla 46. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente <i>B. cereus</i> (ANOVA).....	100

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura. 1 Rendimiento de los aislados proteicos.....	29
Figura. 2 Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.....	32
Figura. 3 Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.	33
Figura. 4 Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.	34
Figura. 5 Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas	35
Figura. 6 Gráfica de medias de los 4 pH ensayados	37
Figura. 7 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de los aislados proteicos de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.	37
Figura. 8 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) del aislado proteico de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.	39
Figura. 9 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) del hidrolizado proteico de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.	41
Figura. 10 Gráfica de medias de los 4 pH ensayados	43
Figura. 11 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.	43
Figura. 12 Actividad antiinflamatoria del aislado proteico obtenido a pH 5 y el control a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.....	45
Figura. 13. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico y del diclofenaco a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.	47
Figura. 14 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.....	48
Figura. 15 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela.....	49
Figura. 16 Curva estándar de BSA.....	73
Figura. 17 Medias del Diclofenaco y pH 5	80
Figura. 18 Interacción del Diclofenaco y pH 5	81
Figura. 19 Medias del Diclofenaco e Hidrolizado	84
Figura. 20 Interacción del Diclofenaco e Hidrolizado	84
Figura. 21 Medias del BHT e pH 5	89

Figura. 22 Interacción del BHT y el pH 5.....	89
Figura. 23 Medias del BHT e pH 5	92
Figura. 24 Interacción del BHT y el pH 5.....	92
Figura. 25 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.....	94
Figura. 26 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.....	95
Figura. 27 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente L. monocytogenes a diferentes concentraciones.	97
Figura. 28 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente L. monocytogenes.....	97
Figura. 29 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente E. coli a diferentes concentraciones.	98
Figura. 30 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a E. coli.	98
Figura. 31 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente P. aeruginosa a diferentes concentraciones.	99
Figura. 32 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a P. aeruginosa.....	100
Figura. 33 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente B. cereus a diferentes concentraciones.	101
Figura. 34 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a B. cereus.....	101
Figura. 35 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a S. aureus.	102
Figura. 36 Control del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento).	102
Figura. 37 Precipitación de proteínas.....	104
Figura. 38 Almacenamiento de las muestras.....	104
Figura. 39 Liofilización de las muestras.	104
Figura. 40 Pesaje de las muestras.....	105
Figura. 41 Preparación de las muestras Digestión gástrica y duodenal.	105
Figura. 42 Electroforesis SDS-PAGE.	105
Figura. 43 Oxidación del Aceite de oliva.....	106
Figura. 44 Inoculación del hidrolizado proteico.	106

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de los aislados proteicos de habichuela (*P. lunatus L.*), producida en el Ecuador. Los aislados fueron obtenidos a pH 3, 4, 5 y 6 por precipitación isoeléctrica, el pH 5 presentó mayor contenido proteico con un valor de 62,53 %. Por medio de la electroforesis SDS PAGE se llevó a cabo la caracterización identificándose globulinas 7S 60 kDa; mientras que las globulinas subunidades ácidas y básicas se encuentran entre los 33 a 44 kDa y 20 a 28 kDa, respectivamente. De acuerdo a la digestión gastrointestinal *in vitro* las fracciones proteicas de la habichuela son muy resistentes a la hidrólisis. La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo por el ensayo TBARS encontrando mayor actividad en el hidrolizado proteico obtenido a través de una hidrolisis secuencial con pepsina y pancreatina, con valores de inhibición lipídica de 77,17 %. Los aislados proteicos no exhibieron actividad antimicrobiana; mientras que el hidrolizado presentó actividad frente a las bacterias patógena: *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *B. cereus*.

Palabras claves: Actividad antiinflamatoria, Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana, Hidrolizado proteico, digestibilidad *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of the protein isolates of snap beans (*P. lunatus L.*), produced in Ecuador. The isolates were obtained at pH 3, 4, 5 and 6 by isoelectric precipitation, pH 5 presented higher protein content with a value of 62.53 %. By SDS PAGE electrophoresis, the characterization was carried out identifying 7S 60 kDa globulins; while the acidic and basic globulin subunits are between 33 to 44 kDa and 20 to 28 kDa, respectively. According to the gastrointestinal digestion in vitro, the protein fractions of the snap bean are very resistant to hydrolysis. The evaluation of the antioxidant activity was carried out by the TBARS assay finding higher activity in the protein hydrolyzate obtained through a sequential hydrolysis with pepsin and pancreatin, with lipid inhibition values of 77.17 %. Protein isolates did not exhibit antimicrobial activity; while the hydrolyzate showed activity against the pathogenic bacteria: *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *B. cereus*.

Keywords: Anti-inflammatory activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, protein hydrolyzate, in vitro digestibility.

INTRODUCCIÓN

La habichuela (*P. lunatus, L.*), es una leguminosa de mucha importancia en regiones como Europa, Norteamérica, África y Latinoamérica (**Lioi & Galasso, 2002; Vallejo & Estrada, 2004**). El papel de esta leguminosa en la alimentación es muy importante, por su riqueza en proteínas e hidratos de carbono (**Avalos, 2001**). Tiene una composición química de 59,7 % de humedad; 26 % de proteínas; 27,20 % de carbohidratos totales (**Chel-Guerrero et al., 2002; Guzmán, 2012**). Estos datos pueden sufrir modificaciones con el tiempo, por esta razón es recomendable actualizar los datos de la composición de los alimentos ecuatorianos.

En los últimos años la obtención de aislados proteicos han ganado gran importancia en la industria alimentaria, ya que representa una alternativa el uso de legumbres en productos alimenticios (**Boye et al., 2010; Fernández-Quintela et al., 1997**). La importancia radica en que estas leguminosas cuentan con un alto contenido proteico; por tal razón se busca impulsar a la expansión estos cultivos. Las técnicas más frecuentes para la obtención de los aislados proteicos son la precipitación por punto isoelectrico o por ultrafiltración (**Vioque et al., 2001**). La calidad, así como el contenido de proteína del aislado dependerá del punto isoelectrico con el que se trabaje (**Martínez, Augustin O. Martínez de Victoria, 2006**).

La caracterización de proteínas se lleva a cabo mediante la técnica de electroforesis, con la cual es posible separar moléculas biológicas en dependencia de su carga y peso molecular, bajo la influencia de un campo eléctrico (**Rivera, 2006**).

Existen varias razones que pueden explicar las diferencias de digestibilidad entre las proteínas de leguminosas, como la presencia de compuestos no proteicos (fibra dietaria, taninos y fitatos), la naturaleza (configuración, unión de los aminoácidos), o por factores antinutricionales (**Padilla et al., 2010**).

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etno-farmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica (**Handley et al., 2004**). En general, las leguminosas poseen una gran cantidad de sustancias bioactivas entre ellas proteínas, carbohidratos,

fibra dietética, aminoácidos, saponinas, alcaloides, antocianinas, flavonoides, entre otras (Mishra et al., 2010); abriéndose un amplio campo de investigación para evaluar sus propiedades terapéuticas como antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, ya que pueden tener grandes beneficios contra algunas enfermedades crónicas (Carbonaro et al., 2015; Puertas et al., 2016).

En varias fuentes vegetales como verduras, frutas, hojas, semillas, se han buscado las posibles fuentes de compuestos antioxidantes (Kähkönen et al., 1999). De acuerdo a la revisión bibliográfica las proteínas de leguminosas exhiben actividad antioxidante *in vitro*, debido a la abundancia de ácidos fenólicos y flavonoides (Amarowicz et al., 2004).

Enfermedades antiinflamatorias, cardiovasculares pueden ser desencadenadas debido al estrés oxidativo que altera el estado redox del cuerpo humano; por tal razón en los últimos años se han venido estudiando que alimentos a base de plantas son capaces de evitar estas perturbaciones, debido a los compuestos fitoquímicos que posee (Wang et al., 2011); además se impulsa al desarrollo de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales evitando los daños adversos como gastritis, fatiga, náuseas, vómito e incluso problemas renales que provocan los antiinflamatorios sintéticos (Amir, et al., 2010; Moreno-Ortiz et al., 2013).

Estudios relacionados realizados con otras variedades de *Phaseolus vulgaris* (frijol común) han detectado el efecto inhibitor, antimicrobiano y antioxidante en péptidos bioactivos (Ariza et al., 2014; Oliveira et al., 2014), despertado el interés en el uso de productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Ramirez & Castaño, 2009).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

Evaluación de las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de aislados e hidrolizado proteico de Habichuela baby lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) y su digestibilidad *in vitro*.

1.2 Justificación

La habichuela es una leguminosa comestible, perteneciente a la especie *Phaseolus lunatus L.*, la cual tiene una considerable importancia alimentaria, ocupa el segundo lugar en importancia económica entre las especies cultivadas del género *Phaseolus* (Fofana, et al., 1999), su cultivo se encuentra en crecimiento en el Ecuador, específicamente en la región Costa y en los valles interandinos (El Productor, 2015; Nienhuis, et al., 1995). La baja inversión que representa su siembra y cosecha ha impulsado a los comuneros de la provincia de Manabí dedicarse a su siembra, los cuales han observado considerables réditos económicos. En el país, se cultivan tres tipos de habichuela; sin embargo, la que mayor acogida presenta es la habichuela blanca (El Productor, 2015). En muchos países, esta leguminosa es básica dentro de la alimentación diaria de la población, por su alto contenido nutricional en proteínas, vitaminas y minerales (Balogun & Fetuga, 1986; North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, 2017; Trinidad, Mallillin, Loyola, Sagum, & Encabo, 2010). Con respecto a su composición, de acuerdo a Betancur-Ancona et al., (2004), por cada 100 g de habichuela comestible, se encuentra 20,62 g de proteína; mientras que en datos presentados por el INIAP, (1992), el contenido proteico es de 26,3 g sobre la materia seca del grano.

Nuestro país es considerado como un gran productor de legumbres (C. Caicedo & Peralta, 2000); aunque en los últimos años su producción se ha visto desplazada por otros cultivos. Esta tendencia no es solo focalizada en el Ecuador, sino también a nivel de América Latina y el Caribe (FAO, 2016). El desconocimiento sobre sus beneficios alimentarios nos ha llevado a consumir alimentos altos en azúcares refinados, grasas saturadas y colesterol, descuidando el valor proteico de nuestros productos ancestrales. Este problema es notable en países con altos y bajos ingresos económicos (CEPAL, PMA, & MCDS, 2017); afectando en menor proporción a países sub desarrollados; ya que las leguminosas representan la única fuente de proteínas en la dieta de algunas regiones (Duranti & Gius, 1997) y son consideradas como un sucedáneo cárnico, debido a su elevado contenido proteico y bajo costo en comparación con la carne y los productos cárnicos (Balogun & Fetuga, 1986). Se estima que el consumo de estas legumbres representa un porcentaje superior al 33 % de la proteína ingerida a nivel mundial (Graham, 2003).

Diversas investigaciones han evaluado los potenciales beneficios a la salud por parte leguminosas (Trinidad et al., 2010), ya que la proteína que poseen no sólo es considerada una fuente de aminoácidos con efecto metabólico, sino que estos componentes pueden representar un papel bioactivo por sí mismos, o pueden ser los precursores de péptidos con actividad biológica y con varias funciones fisiológicas (Duranti, 2006; Moughan et al., 2014).

Según el North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, 2017, la habichuela representa una rica fuente de vitamina C, K y A (beta-caroteno). Los beta-carotenos, al igual que la vitamina C, contienen propiedades desinflamantes (Sudhahar & Fukai, 2014); además es considerada como una fuente potencial de compuestos con actividad antioxidante, antimicrobiana y de otros compuestos bioactivos (Kanatt, Arjun, & Sharma, 2011). Por estas razones, se ha fomentado la investigación en leguminosas para identificar nuevos compuestos antioxidantes, contribuyendo con la industria alimentaria (Williams, et al., 1999).

El incremento en los niveles de resistencia bacteriana alrededor del mundo ha promovido la investigación sobre alimentos con componentes bioactivos, sin embargo la exploración sobre nuevos compuestos antimicrobianos a partir de fuentes naturales es aún compleja (Ghanbari et al., 2012). En la última década, los péptidos bioactivos

con actividad antibacteriana han sido el punto de atención en la industria alimentaria (**Life Science Weekly, 2015**), no solo por su baja toxicidad, sino también por sus mecanismos biológicos que alteran la membrana de los patógenos (**Hong, Park, & Lee, 2001**). A nivel productivo, el interés por los aislados proteicos en la fabricación de alimentos funcionales sigue vigente (**Granado & Hernández, 2016**). Estudios relacionados con la evaluación de las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana en aislados proteicos de la habichuela cultivada en el Ecuador no se encuentran reportados en bibliografía. Estudios relacionados realizados con otras variedades de *P. vulgaris* (frijol común) han detectado el efecto inhibitor, antimicrobiano y antioxidante en péptidos bioactivos (**Ariza et al., 2014; Oliveira et al., 2014**). Por tal razón, esta investigación buscamos aportar resultados para la comunidad científica; y adicionalmente buscamos contribuir con la industria alimentaria dedicada a la elaboración de alimentos con nutrientes y propiedades funcionales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Evaluar las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de aislados e hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) y su digestibilidad *in vitro*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aislar las proteínas presentes en la habichuela baby lima bean por el método de precipitación por punto isoeléctrico.
- Hidrolizar las proteínas de habichuela baby lima bean simulando las condiciones fisiológicas de la digestión humana.
- Caracterizar por peso molecular las proteínas de habichuela baby lima bean mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

- Cuantificar el contenido proteico de habichuela baby lima bean mediante método Biuret.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los aislados e hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean.
- Identificar la presencia de actividad antioxidante en los aislados e hidrolizados proteicos de habichuela baby lima bean mediante el método TBARS.
- Determinar la actividad antibacteriana de los aislados e hidrolizados proteicos de la habichuela baby lima bean contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

La habichuela baby lima bean (*Phaseolus lunatus L.*), es uno de los cultivos con gran relevancia dentro de la agricultura (Caicedo & Peralta, 2000). La siembra y cosecha de este tipo de leguminosas figuran entre los primeros productos alimenticios cultivados por el hombre. Su historia como cultivo se remonta a los tiempos neolíticos (Aykroyd & Doughty, 1982). La evolución y el esparcimiento de *Phaseolus*, ha sido explorado y estudiado por Evans, (1980). Las diferencias entre variedades geográficas no solo se encuentran marcadas morfológicamente; sino también con características moleculares distintas (Caicedo et al., 1999; Jaaska, 1996; Koenig & Gepts, 1989). Se evidenciaron a nivel botánico, arqueológico, bioquímico y molecular dos escenarios importantes en el proceso de domesticación de la especie, uno en Mesoamérica y otro en los Andes; siendo los principales centros del origen de esta especie (Lioi & Galasso, 2002). Las semillas mesoamericanas se distribuyen desde el norte de México al noroeste de Argentina (Betancur-Ancona et al., 2004; Singh et al., 1991).

Las diferencias que presentan son de acuerdo al tamaño de la semilla y el hábito de crecimiento (Hamblin & Evans, 1976); así como también en los patrones de proteína de la semilla, la textura, forma y los días de floración entre las poblaciones de frijol silvestre de diferentes regiones de América Latina (Singh et al., 1991). Se encuentra distribuido en México, Panamá, Brazil, Argentina, Venezuela, Colombia, Ecuador, y el norte de Perú donde poseen rasgos similares (Simmonds et al., 1989; Singh et al., 1991). Posteriormente, el material de este tipo se introdujo a Norteamérica, donde se lograron importantes avances en calidad y rendimiento de nuevas variedades (Agudelo & Montes de Oca, 1988; Simmonds et al., 1989).

En el Ecuador esta leguminosa está ubicada en la región Costa, especialmente en la provincia de Manabí, y en los valles interandinos a una altitud entre 1.000 y 2.500 msnm (**El Productor, 2015; Yepes, 1987**). En la región costa de nuestro país esta leguminosa es conocida como “habichuela manaba” (**El Productor, 2015**). En zonas tropicales y subtropicales, este cultivo presenta una temperatura óptima entre 16 y 23 °C (**Betancur-Ancona et al., 2004; Federación Nacional de Cafeteros, 1985**), mientras que, en zonas templadas, está entre 15,5 y 21,0 °C, principalmente sembrándose en las estaciones de otoño y primavera (**Curwen & Schulte, 1982**). Tiene un periodo vegetativo aproximado de 60-90 días según la variedad y la altitud de la zona donde es sembrada (**Casseres, 1981**).

El fruto de las habichuelas es una vaina lineal más o menos comprimida de color verde, después de la fecundación y amarillenta, violácea o jaspeada al momento de la maduración (**Secretaría de Estado de Agricultura, 2007**). Tiene un bajo contenido de fibra en su etapa inmadura, se le conoce como habichuela, vainita, judía, frijol agita y otros. Esta leguminosa es de mucha importancia en regiones como Europa, Norteamérica, África y Latinoamérica (**Vallejo & Estrada, 2004**). El papel de esta leguminosa en la alimentación es muy importante, por su riqueza en proteínas e hidratos de carbono (**Avalos, 2001**). La composición química de la semilla de habichuela contiene por cada 100 g en base seca: 20,62 g de proteína, 62,83 g de carbohidratos (**Betancur-Ancona et al., 2004; Ramírez Ortiz et al., 2015**). Estos datos sufren modificaciones temporales, por esta razón es recomendable actualizar los datos de la composición de los alimentos ecuatorianos.

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etno-farmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica (**Handley et al., 2004**). En el Ecuador, existen pocos estudios que demuestren las actividades biológicas en leguminosas. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de las proteínas e hidrolizados de la habichuela;

considerando que en los últimos años se ha despertado el interés en el uso de productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas **(Ramirez & Castaño, 2009)**.

La precipitación de proteínas puede realizarse en base a diferentes principios: disminución de la solubilidad, desnaturalización selectiva y afinidad **(Tejeda, 1988)**. Entre los métodos basados por disminución de la solubilidad se encuentran la precipitación con solventes, con sales, punto isoelectrico y con solventes no iónicos **(Carmona, 2015)**. La precipitación isoelectrica separa las partículas sobre la base de su punto isoelectrico y tiene la ventaja de requerir solo adición de ácido (o base) para inducir la precipitación de proteínas **(Universidad Nacional de Quilmes, 2008)**. Es de conocimiento que la aplicación de tratamientos alcalinos altos ($\text{pH} > 9$), afectan negativamente a los aminoácidos azufrados y a otros aminoácidos; además de causar desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, bajando así la calidad del aislado proteico **(Callisaya & Alvarado, 2009)**. De manera comercial, para producir aislados de proteínas habitualmente se modifica las condiciones del medio a pH alto y la posterior precipitación a pH bajo **(Manamperi, Chang, Ulven, & Pryor, 2010)**. Los aislados de proteína han demostrado tener una buena funcionalidad para la aplicación en diferentes fórmulas de alimentos **(Nolsøe & Undeland, 2009)**, además contienen altas cantidades de todos los aminoácidos esenciales para los seres humanos **(Marmon & Undeland, 2013)**.

La cuantificación de los aislados proteicos se realiza por varios métodos colorimétricos; como el ácido bicinónico (BCA), Bradford, Biuret, entre otros **(García & Vázquez, 1998)**. La cuantificación por Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos amino (NH_4^+) de los enlaces peptídicos en medio básico **(Fernández & Galván, 2009)**. El intenso color es directamente proporcional a la presencia de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren **(Grefa, 2017)**. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados **(Fernández & Galván, 2009)**.

Uno de los métodos utilizados para la caracterización de proteínas es la electroforesis, técnica mediante la cual es posible separar moléculas biológicas en dependencia de su carga y peso molecular, bajo la influencia de un campo eléctrico (**Rivera, 2006**). Por ejemplo, para la caracterización de aislados proteicos de *Sacha inchi*; de acuerdo con el método propuesto por **Laemmli, 1970**; se utilizaron concentraciones de 4-8 % y 4-12 % de gel de poliacrilamida en un sistema de electroforesis mini-proteico (Bio -Rad, Hercules, CA, EE. UU.) (**Quinteros et al., 2016**).

Se ha encontrado información bibliográfica que las proteínas de leguminosas exhiben actividad antioxidante *in vitro*, debido a la abundancia de ácidos fenólicos y flavonoides (**Amarowicz et al., 2004**). Diferentes estudios han demostrado que las leguminosas poseen actividades hipoglucémicas, antimicrobianas, antioxidantes y antitumorales (**F. Chen et al., 2006**); atribuyéndose estas actividades a la presencia de metabolitos secundarios como: vitaminas, aminoácidos, flavonoides y fenólicos (**Amarowicz et al., 2004; North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, 2017**). Sin embargo, las habichuelas cultivadas en el Ecuador no han sido sometidas a pruebas de actividad antioxidante o antiinflamatoria; por lo tanto, la actividad antiinflamatoria se evaluará mediante el método descrito por **Padmanabhan, 2012**. Mientras que la actividad antioxidante se determinará de acuerdo al contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), utilizando el procedimiento de **Guzmán-Chozas, et al., 1997**.

Existen diferentes técnicas o metodologías para evaluar la actividad antibacteriana; uno de ellos es el método de difusión, que ha sido ampliamente utilizado para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana (**Freixa et al., 1998**). Gran parte de los laboratorios de microbiología clínica en Estados Unidos adoptaron el método de difusión en disco (**Hudzicki, 2009**); en la actualidad, sigue en vigencia este método con ligeras modificaciones, de acuerdo a las necesidades de los investigadores (**Acharya, 2013**). Para la determinación de la susceptibilidad y resistencia de las bacterias a los antimicrobianos, se basaron en la presencia o ausencia de una zona de

inhibición que rodea el disco, realizando ensayos a diferentes concentraciones del antimicrobiano contra del patógeno (**Bauer, Perry, & Kirby, 2015**).

2.2 Hipótesis

Tema: “Evaluación de las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de aislados e hidrolizado proteico de Habichuela baby lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) y su digestibilidad *in vitro*”.

Hipótesis 1. Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: Existe influencia del pH de precipitación en el rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*).

Hipótesis alternativa

H_a: No existe influencia del pH de precipitación en el rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*).

Hipótesis 2. Cuantificación de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: El contenido de proteína de los aislados de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) es igual en todos los valores de pH de precipitación.

Hipótesis alternativa

H_a: El contenido de proteína de los aislados de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) es diferente en todos los valores de pH de precipitación.

Hipótesis 3. Digestibilidad de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) son digeridos por las enzimas proteolíticas.

Hipótesis alternativa

H_a: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no son digeridos por las enzimas.

Hipótesis 4. Actividad Antiinflamatoria de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) presentan actividad antiinflamatoria.

Hipótesis alternativa

H_a: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no exhiben actividad antiinflamatoria.

Hipótesis 5. Actividad Antioxidante de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) muestran actividad antioxidante.

Hipótesis alternativa

H_a: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no muestran actividad antioxidante.

Hipótesis 6. Actividad Antimicrobiana de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) exhiben actividad antimicrobiana.

Hipótesis alternativa

H_a: Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no exhiben actividad antimicrobiana.

Hipótesis 7. Actividad Antiinflamatoria del hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) presenta actividad antiinflamatoria.

Hipótesis alternativa

H_a: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no presenta actividad antiinflamatoria.

Hipótesis 8. Actividad Antioxidante del hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) exhibe actividad antioxidante.

Hipótesis alternativa

H_a: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no exhibe actividad antioxidante.

Hipótesis 9. Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean.

Hipótesis nula

H₀: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) presenta actividad antimicrobiana.

Hipótesis alternativa

H_a: El hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (*P. lunatus L.*) no presenta actividad antimicrobiana.

2.3 Señalamiento de las variables de hipótesis

Variable independiente (H₁): Diferentes pH de precipitación (3, 4, 5, 6).

Variable dependiente (H₁): Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean (%).

Variable independiente (H₂): Aislados proteicos de habichuela baby lima bean (de diferentes pH).

Variable dependiente (H₂): Contenido de proteína.

Variable independiente (H₃): Aislados proteicos de habichuela baby lima bean (del mejor tratamiento).

Variable dependiente (H3): Digestión Gastrointestinal.

Variable independiente (H4): Aislados proteicos de habichuela baby lima bean (de diferentes pH).

Variable dependiente (H4): Actividad Antiinflamatoria.

Variable independiente (H5): Aislados proteicos de habichuela baby lima bean (de diferentes pH).

Variable dependiente (H5): Actividad Antioxidante.

Variable independiente (H6): Aislado proteico de habichuela baby lima bean (mejor tratamiento).

Variable dependiente (H6): Actividad antimicrobiana (5 cepas diferentes).

Variable independiente (H7): Hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (mejor tratamiento).

Variable dependiente (H7): Actividad antiinflamatoria.

Variable independiente (H8): Hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (mejor tratamiento).

Variable dependiente (H8): Actividad antioxidante.

Variable independiente (H9): Hidrolizados proteicos de habichuela baby lima bean (del mejor tratamiento).

Variable dependiente (H9): Actividad antimicrobiana (5 cepas diferentes).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se realizó en las instalaciones del laboratorio de alimentos funcionales BIO-PROPEPTI y en el laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

3.1 Materiales

3.1.1 Materia Prima

Se utilizaron dos libras de la semilla de habichuela baby lima bean proporcionadas por la Universidad Politécnica del Litoral (ESPOL). Primero se deshidrataron las semillas en una incubadora marca ESCO a 50°C, por 48 h. Transcurrido ese tiempo, se realizó una molienda en un molino micro pulverizador modelo MG 1511, con capacidad de 50 kg, hasta obtener un polvo fino (harina), de granulometría de 200 μm .

3.1.2 Equipos

- Balanza analítica VWR 224AC
- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Plancha de calentamiento VWR
- Agitador vórtex Mixer VWR
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470
- pH metro Mettler Toledo
- Espectrofotómetro convencional de haz simple Modelo DR-500
- Centrifuga, eppendorf Modelo 5702
- Estufa VWR

- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Destilador de agua, Easy Linea 150
- Microincubador, Esco, Provolcell Shaking
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- Sheker
- Liofilizador Bench Top Pro Modelo BTP-3ES0VW
- Cámara de flujo laminar ESCO

3.1.3 Materiales de laboratorio (Vidrio, Plástico)

- Vasos de precipitación 50 ml, 100, 250, 500, y 1000 ml
- Matraz
- Tubos falcon de 15 y 50 ml
- Tiras de medidoras de pH
- Tubos Eppendorf 2 ml
- Probetas 10, 100 y 250 ml
- Goteros
- Envases con cierre hermético
- Balones de aforo
- Cajas Petri
- Mortero
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con rosca
- Papel plástico
- Botellas de tapa azul 250 ml, 500 ml

3.1.4 Reactivos empleados en la investigación

- Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M
- Ácido clorhídrico (HCl) 2M
- Bicarbonato de sodio

- Diclofenaco sódico (Laboratorios MK) 25 mg/mL
- Butil hidroxil tolueno (BHT)
- Azul de bromofenol (Bio-Rad)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-diamina) de Bio-Rad
- Acrilamida de Invitrogen
- DMSO
- Bis-acrilamida de Invitrogen
- Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- Glicerol de Invitrogen
- Sulfato de cobre
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) de Panreac
- Sales biliares
- Pancreatina de Sigma
- Pepsina gástrica porcina de Sigma
- Metanol
- Reactivo de Biuret
- 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- Alcohol antiséptico
- Persulfato de amonio (PSA)
- Tris (C₄H₁₁NO₃) # 161-0716, BIO-RAD
- Tartrato de potasio
- Cloruro de sodio
- Coomassie Blue R-250 de Bio-Rad
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) de Invitrogen
- Aceite
- Ácido acético glacial Merck

3.1.5 Insumos y utensilios

Agua destilada, bandejas plásticas, cámara fotográfica, envases plásticos, espátulas, gradillas, guantes de látex, micropipetas, papel aluminio, parafilm, puntas plásticas

para pipetas, toallas absorbentes, cinta adhesiva , etiquetas adhesivas, gotero, marcador permanente, magnetos.

3.2 Aislado de Proteínas de Habichuela.

La obtención de los aislados proteicos de habichuela se llevó a cabo mediante precipitación isoeléctrica según el método descrito por **Martínez & Añón, 1996**, con ligeras modificaciones. La harina obtenida fue suspendida en agua en relación 1:10 (p/v). Se ajustó al pH de solubilización de las proteínas (8,0), con la ayuda de hidróxido de sodio (NaOH) 2 M, por una hora y agitación constante entre 800-900 rpm. Luego la muestra fue centrifugada a 4400 rpm por 30 min. Posteriormente, se precipitaron las proteínas ajustando el sobrenadante al pH requerido (3, 4, 5 ó 6), utilizando ácido clorhídrico (HCl) 2 M o hidróxido de sodio NaOH 2 M de ser necesario. Ajustado el pH, se agitó vigorosamente por 5 min y se guardaron a 4° C por 24 h. Transcurrido el tiempo, se desechó el sobrenadante y los precipitados se congelaron en un ultracongelador (Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer), para posteriormente liofilizar en el equipo Bench Top Pro modelo BTP-3ES0VW a -50 °C y 0,2 Pa. Este proceso se llevó a cabo por triplicado para cada pH. El cálculo del rendimiento se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{P_f}{P_o} * 100$$

Dónde:

P_o: Peso inicial de la harina de habichuela

P_r: Peso final de la muestra liofilizada

3.3 Cuantificación Proteica

La cuantificación se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico, utilizando el procedimiento descrito por **Nielsen, 2010**. Se pesaron los aislados proteicos en tubos

eppendorf de 2 ml, registrando el valor entre 10 – 10,5 mg, seguido se adicionaron 1 ml de agua desionizada y 75 µL de NaOH 0,2 M. Luego se agitaron por 10 minutos, transcurrido el tiempo se tomaron 2 alícuotas de 250 µL y se colocaron en otros tubos eppendorf con 1,25 ml de reactivo de Biuret; seguido las muestras se centrifugaron por 30 minutos a 13.000 rpm y se enfriaron por 15 min. Finalmente con mucha sutileza se procedió a realizar las lecturas a una longitud de onda de 540 nm.

Preparación del blanco: Se realizó el mismo procedimiento sin la adición del aislado proteico.

Preparación del reactivo de Biuret: Se pesaron 2,25; 0,75 y 1,25 g de tartrato sódico-potasico, sulfato de cobre pentahidratado y yoduro de potasio, respectivamente. Se disolvieron 100 ml de NaOH 0,2 M, en el orden antes mencionado y finalmente se aforó a 250 ml con agua desionizada.

3.4 Obtención del hidrolizado proteico.

Para la obtención del hidrolizado proteico se simularon las condiciones fisiológicas del fluido gástrico del ser humano, realizando modificaciones al método descrito por **Minikus et al., 2014**. Para la digestión gástrica se pesaron 100 mg del aislado proteico que presentó mayor contenido proteico y se disolvieron en 10 ml de cloruro de sodio (NaCl) 0,35 M, pH 2,0. Se realizó una relación 50:50 de la proteína diluida y el fluido gástrico simulado (FSG). Las muestras sometieron a baño maría por 2 h, 37°C y 500 rpm.

Inmediatamente se llevará a cabo la digestión duodenal por acción de la pancreatina (23875 U/ml); que fue diluida hasta llegar a una concentración final de 109 U/ml. Seguido se realizó una relación 1:1 (v/v) del digerido gástrico obtenido y la pancreatina 109 U/ml. Nuevamente se realizó una relación 1:1 (v/v) de la mezcla y del fluido intestinal simulado (FSI). Finalmente se dejó a baño maría por 2 h, 37 °C y 500 rpm. Transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida con 200 µL bicarbonato de sodio 1M por 10 min y 80°C. Las muestras se congelaron a -80 °C y posteriormente se liofilizaron. Este proceso se llevó a cabo por triplicado.

Preparación del fluido gástrico simulado (FSG): Se pesaron 25 mg de la pepsina (2000 U/ml) y se diluyeron en 50 ml de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0,35 M a pH 2,0.

Preparación del fluido intestinal simulado (FSI): Se pesaron 61,6 mg y 680 mg de hidróxido de sodio NaOH y fosfato monobásico de sodio NaHPO₄, respectivamente. Se disolvieron en 100 ml de agua desionizada en el orden antes mencionado y la solución se ajustó a pH 7.

3.5 Caracterización de los aislados proteicos.

3.5.1 Electroforesis (SDS-PAGE):

Para la caracterización de los aislados proteicos de habichuela se empleó la técnica descrita por **Laemmli, 1970** con ligeras modificaciones. El equipo a utilizar es de la marca Bio-Rad modelo Mini Protean II (Bio-Rad LifeScience, USA). Esta técnica analítica se encarga de separar las moléculas de acuerdo a su tamaño molecular y carga.

Preparación de la muestra: Se pesó directamente en 3 tubos eppendorf 10 mg del aislado proteico de cada pH y se añadió 1 ml de agua desionizada. Posteriormente, a cada tubo se tomó en cuenta una relación 50:50 (v/v) de la solución proteica y del respectivo buffer. Al primer tubo se colocó el buffer con agente reductor, al segundo sin agente reductor y al tercer tubo con buffer native. Las muestras fueron calentadas en un microincubadora a 90°C por 5 minutos a 500 rpm. Inmediatamente las muestras con el buffer con y sin agente reductor fueron colocadas en un microincubador Esco (Provolcell Shaking) a 80°C por 10 minutos y 450 rpm.

Preparación del buffer con agente reductor: Agua desionizada (4,8 ml), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2 ml), glicerol puro (1,0 ml), SDS al 10 % (2,0 ml), 2-mercaptoetanol (6,0 ml) y azul de bromofenol (20 mg).

Preparación del buffer sin agente reductor. Agua desionizada (4,8 ml), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2 ml), glicerol puro (1,0 ml), SDS al 10 % (2,0 ml) y azul de bromofenol.

Preparación del buffer native. Agua desionizada (4,8 ml), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2 ml), glicerol puro (1,0 ml) y azul de bromofenol (20 mg).

Se emplearon 2 geles: El gel compactador tuvo una concentración del 4 % de poliacrilamida; mientras que el gel separador estaba a una concentración del 12 %; se formó un gel de 1 mm de espesor.

3.5.1.1 Gel compactador

Para la preparación se utilizó: agua desionizada (2.2 ml), Tris HCl 1.5 M a pH 6,8 (0.42 ml), Acrilamida al 30 % (0.7 ml), SDS al 10 % (3.3 µL), Tetramethyletilendiamina (TEMED) (6 µL), y Persulfato de amonio al 10 % (PSA) (20 µL).

3.5.1.2 Gel separador

Para la preparación se empleó: agua desionizada (1,425 ml), Tris HCl 1M a pH 8,8 (3,0 ml), Acrilamida al 30 % (3,0 ml), SDS al 10 % (75 µL), Tetramethyletilendiamina (TEMED) (9 µL), y Persulfato de amonio al 10 % (PSA) (30 µL).

Una vez que se obtiene los geles, se armó el equipo de electroforesis Bio-Rad, seguido se añadió el buffer running. En cada pocillo se colocaron 25 µL de las muestras preparadas, en el primer pocillo se colocó el estándar con pesos moleculares de 11 a 180 kDa marca Dual Color de Bio Rad # 161 03734. La corrida de los geles se realizaron a un voltaje contante de 200 V y se tiñeron los geles con la solución de azul de Coomassie brilliant R-250, misma que está compuesta por etanol (50,0 ml), ácido acético (10,0 ml), agua desionizada (40.0 ml) y R-250 (0,1 %). Finalmente se destiñeron con la solución metanólica compuesta por 50 % metanol, 5 % ácido acético y 45 % de agua.

Solución buffer running: Tris-HCl (5,0 g), glicina (7,5 g) y SDS (0,5 g)

Solución native: Tris-HCl (1,5 g) y glicina (7,5 g).

3.5.2 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal *in vitro*:

Para la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro*, se empleó el método descrito por **Minekus et al., 2014**; donde se simularon las condiciones fisiológicas de la digestión humana. Se pesaron 10,0 mg del aislado con el mayor contenido proteico. Seguido se prepararon tres soluciones de cloruro de sodio (NaCl) 0,35 M a diferentes pH 1,2; 2,0 y 3,2 respectivamente. Se colocó 1,0 ml del cloruro de sodio (NaCl) en las muestras antes pesadas y se agitaron con el vórtex. Posteriormente, para digerir las proteínas se colocaron 100 µL de pepsina (2000 U/ml), que actuará durante 2 horas a 37°C y 450 rpm, con la ayuda de un microincubador Esco, Provolcell Shaking. Transcurrido ese tiempo se paró la reacción de hidrólisis colocando 200 µL de Bicarbonato de Sodio 1 M y cambiando la temperatura a 80 °C por 10 min con la finalidad de inactivar la enzima.

La digestión duodenal se llevó a cabo seguido de la digestión gástrica, sin detener la reacción de hidrólisis, se tomó 1,0 ml del digerido gástrico y se añadió 1,0 ml de la solución duodenal, misma que consiste de pancreatina (100 U/ml), sales biliares (10mM) y CaCl₂ (1,5 mM). Nuevamente se incubaron por 2 h a 37 °C y con una agitación de 450 rpm. Finalmente la reacción fue detenida, al subir temperatura a 90°C durante 10 min. Este proceso también se llevó a cabo para el hidrolizado proteico. Para la verificar la hidrólisis del aislado proteico fue analizado por medio de la técnica de electroforesis en gel SDS-PAGE, utilizando el agente reductor 2-mercaptoetanol (**García Pérez, 2000**).

3.6 Actividades biológicas:

3.6.1 Actividad antioxidante de los aislados proteicos y del hidrolizado proteico (mejor tratamiento):

Para la actividad antioxidante se empleó el método descrito por **Rojano et al., 2008**, con ligeras modificaciones. Se pesaron 0,2; 0,4; 1,0 y 2,0 mg de los aislados y del hidrolizado proteico, a cada tubo se le añadieron 2 ml de agua desionizada.

Posteriormente se colocaron en relación 1:1 (v/v); 500 µL del aceite de oliva previamente oxidado y 500 µL de la solución proteica. Las muestras se dejaron en agitación de 450 rpm en un microincubador Esco, Provolcell Shaking por 13 horas a 28 °C. Transcurrido el tiempo se colocó 1 ml de TBA al 1 % e inmediatamente se incubaron durante 1 hora a 95°C. Finalmente las muestras se enfriaron por 15 min en la nevera y posteriormente se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 532 nm. Para el patrón positivo BHT se pesaron las mismas cantidades antes mencionadas y se disolvieron en 2 ml de etanol al 96 %, realizando el mismo procedimiento.

Preparación del Aceite oxidado: El aceite fue oxidado por 15 días, los primeros 8 días se oxidó a 70 °C; mientras que la segunda semana se oxidó a 40 °C. Este proceso fue llevado a cabo con la estufa VWR.

Los resultados obtenidos fueron comparados con el patrón positivo, determinando el porcentaje de actividad antioxidante con la siguiente formula:

$$\%AA = \frac{M - C}{C} * 100$$

Donde:

AA: Actividad Antioxidante

C: Absorbancia del aceite oxidado

M: Absorbancia de la muestra (Concentración proteica + aceite oxidado)

3.6.2 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos y del hidrolizado proteico *in vitro*.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los aislados y del hidrolizado proteico se llevó a cabo mediante la metodología descrita por **Padmanabhan, 2012**, con pequeñas modificaciones. El patrón positivo fue diclofenaco sódico (25 mg/ml) de los laboratorios Mk. Se pesaron 0,2; 0,4; 1,0 y 2,0 mg de los aislados y del hidrolizado proteico, se disolverán en 2 ml de agua desionizada. Se tomaron los 2 ml de la solución proteica, se le añadieron 2,8 ml buffer fosfato pH 4,0 y 0,2 ml de la albúmina de huevo; seguido se mezclaron y se incubaron en una estufa modelo BINDER a 37 °C por 15 minutos; seguido la desnaturalización de la proteína se llevó a cabo mediante un

baño de agua a 70 °C por 10 min. Posterior se enfriarán las muestras por 10 min en agua fría y se medirán las absorbancias a una longitud de onda de 660 nm en espectrofotómetro UV-Visible EVOLUTION 201, como blanco se utilizó agua desionizada.

Los datos obtenidos fueron comparados con el patrón positivo (diclofenaco), determinando el porcentaje de actividad antiinflamatoria con la siguiente formula:

$$\%Act. Antiinflamatoria = \frac{M - C}{C} * 100$$

Donde:

C: Absorbancia de la albumina desnaturalizada

M: Absorbancia de la muestra (Concentración proteica + albumina de huevo)

3.6.3 Actividad antimicrobiana del aislado proteico e hidrolizado proteico.

Para determinar la actividad antibacteriana frente *S. aureus* (ATCC® 25923™), *E. coli* (ATCC® 25922™), *B. cereus* (ATCC® 10876), *L. monocytogenes* (ATCC® 19115™) y *P. aeruginosa* (ATCC® 10145). se utilizaron placas de Petri estériles que contendrán 25 ml de agar Mueller Hinton, medio recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para la realización de pruebas a la sensibilidad de antimicrobianos (**Laboratorios Britania, 2001**). Primero se activarán los microorganismos en 5 ml de caldo de soja tripticasa (TSB) y se incubarán durante la noche a 37°C. La concentración de las bacterias se determinará siguiendo el procedimiento descrito por **Mine, Ma, & Lauriau, 2004** con ligeras modificaciones, las absorbancias se leerán a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente se determinará el volumen a tomar de cada microorganismo; de acuerdo a su concentración y aforando a 3 ml de solución salina 0.9 %, hasta llegar a una densidad óptica del cultivo de 0,5 Mc unidades de Farland.

Se tomará el aislado con mayor contenido proteico, de acuerdo a su cuantificación por Biuret. Las concentraciones a ensayar serán de 500, 375, 250, 200, y 150 mg/ml. La siembra de los microorganismos se realizará con hisopos previamente esterilizados, difundiendo el inóculo por toda la superficie del medio; luego se seguirá el protocolo

descrito por **Ríos & Recio, 2005** con ligeras modificaciones; se realizaron sobre la superficie del agar unos pocillos con la ayuda de las puntas estériles de 200 µL y luego en cada uno de ellos se depositaran 70 µL del aislado proteico a evaluar. Como control positivo se utilizará gentamicina Mk (500 µg/ml); mientras que agua desionizada como control negativo. Las placas se dejarán reposar por 30 min y se incubarán por 48 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se medirán los halos de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para determinar el porcentaje de inhibición antimicrobiana se empleó formula descrita por **Ramírez & Diaz, (2007)**:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{B - A}{C - A} * 100$$

Donde:

A: Diámetro del halo del blanco.

B: Diámetro del halo del hidrolizado proteico.

C: Diámetro del halo del control positivo.

3.7 Análisis estadístico y Diseño Experimental.

Para el análisis estadístico, se aplicó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de TUKEY, para el rendimiento y cuantificación de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH; utilizando el programa estadístico SPSS con un nivel de confianza del 95 %.

Para las actividades antiinflamatoria y antioxidante se empleó un diseño factorial axb; donde: el factor A corresponde al pH y control; mientras que las diferentes concentraciones ensayadas conciernen al Factor B, como se detalla a continuación:

a0: pH (del mejor tratamiento); **a1:** Control o Patrón positivo

b0: 100 µg/ml; **b1:** 200 µg/ml; **b2:** 500 µg/ml; **b3:** 1000 µg/ml.

El diseño experimental fue llevado a cabo en el programa estadístico STATGRAPHICS, junto con la prueba de comparación de TUKEY.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.1 Análisis Proximal

Este análisis fue realizado en los Laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Estación Santa Catalina. En la tabla 1 se presenta la composición proximal (%) de la harina de habichuela en base seca, encontrando un contenido de proteína del 21,15 %. Estos resultados son semejantes a los que se encuentran reportados en la **FAO, (2005)** de 23,6 % de proteína; de igual manera, a los datos reportados por **Chel-Guerrero et al., (2002)** con un valor de 26 % de proteína.

Tabla 1 Análisis proximal de la harina de Habichuela

Análisis	Contenido (%)
Humedad	8,95
Proteína	21,15
Grasa	1,55
Cenizas	3,58
Fibra cruda	7,59
Carbohidratos totales	66,13

Fuente: INIAP (2017)

4.1.2. Rendimiento de los aislados proteicos de la harina de habichuela

La obtención de los aislados proteicos de habichuela se llevó a cabo utilizando un pH de solubilización de 8,0; con hidróxido de sodio NaOH (2 M), durante 1 hora. El rendimiento se evaluó a diferentes pH de precipitación: 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. En leguminosas el pH de solubilización se halla entre 7,0 – 11,0 dependiendo de las proteínas que serán aisladas (**Carbonaro et al. , 1997; León, 2000**); sin embargo hay que considerar que a pH muy alcalinos se provoca la desnaturalización e hidrólisis de proteínas, reduciendo la calidad del aislado proteico (**Wang et al., 1999**).

Varios autores aseveran que las proteínas poseen una alta solubilidad a valores de pH entre 9 – 10 y menor solubilidad con tratamientos alcalinos severos (**Karaca, et al., 2011; McCurdy & Knipfel, 1990; Petruccelli & Añón, 1995**); sin embargo se encuentra reportado en lima bean (*Phaseolus lunatus*) que a un pH de solubilización de 11 lograron aproximadamente el 70 % de contenido proteico en pH 4,5 (**Chel-Guerrero et al., 2001**).

En la figura 1 se puede observar el rendimiento de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH de precipitación. A pH 3, 4 y 5 se observó de manera clara la formación de un precipitado, efecto que no fue apreciable a pH 6; sin embargo, esta solución fue almacenada en congelación y posteriormente liofilizada para posteriores análisis. Los precipitados de los pH 3, 4 y 5 fueron recuperados y posteriormente liofilizados. Este efecto puede ser debido a que en leguminosas las fracciones proteicas más cuantiosas son globulinas y albúminas; con un pH isoeléctrico para globulinas entre 4,4 – 4,8 (**Leon, 2000**). El pH 3 y pH 5 presentan valores muy similares de rendimiento, generalmente este tipo de proteínas presentan una solubilidad mínima a valores de pH entre cuatro y cinco (punto isoeléctrico) (**Boye et al., 2010; Kaur & Singh, 2007**).

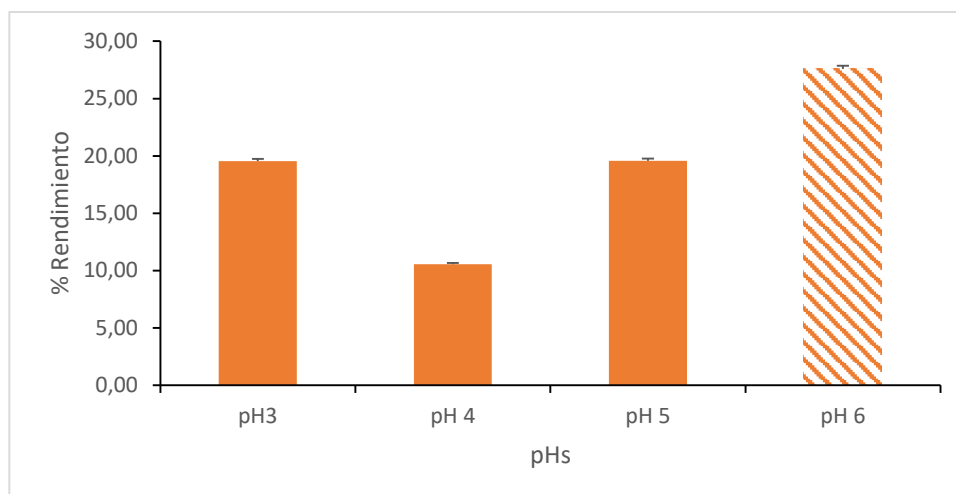


Figura. 1 Rendimiento de los aislados proteicos.

El rendimiento de los pH 3, 4 y 5 corresponde al precipitado (barras naranja), mientras que el pH 6 corresponde a la solución total liofilizada (barra entrecortada).

La tabla 2 muestra los porcentajes de rendimiento de cada aislado proteico. Se observa que el mayor rendimiento se obtuvo a pH 6 con el 27.59 %; mientras que en las fracciones precipitadas, el rendimiento más bajo fue obtenido a pH 4 con un 10,56 % y un rendimiento similar fue observado a pH 3 y 5 (19,55 y 19,56 %); cabe recalcar que a pH 6 no se precipitaron las proteínas, debido a que las proteínas vegetales generalmente presentan el punto isoeléctrico por debajo del pH 6 (Qi, Hettiarachchy, & Kalapathy, 1997), por lo cual esta muestra presentó mayor peso, después de ser liofilizada.

Tabla 2. Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación (%)

	Promedio	Varianza
pH3	19,55 ^a ± 1,55	0,08
pH 4	10,56 ^b ± 0,83	0,08
pH 5	19,56 ^a ± 1,55	0,08
pH 6 *	27,59 ^c ± 0,24	0,01

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación. ^

**pH 6 corresponde a la totalidad de la solución sin precipitar.*

El análisis de varianza aplicado, señala que el rendimiento proteico se ve influenciado por el pH de precipitación, por lo que se utilizó la prueba de comparación de Tukey al 95 % de confianza, resumiendo que en el pH 5 y pH 3 no existen diferencias significativas; obteniendo un rendimiento del 19,56 % y 19,55 %, respectivamente; en cambio en el pH 4 y pH 6 existe diferencias significativas. El aumento de la solubilización en proteínas puede ser justificado por una gran contenido de aminoácidos entre ellos el aspártico y glutámico que poseen puntos isoelectricos ácidos, por lo cual serán más solubles en medios acuosos básicos (Sathe, 2002).

4.1.3 Cuantificación proteica por Biuret

La tabla 3 indica que a pH 5 se obtuvo la mayor cuantía proteica con un 62,53 %; mientras que los pH 4 y 6 presentaron valores muy similares entre sí con un 57,85 % y 56,74 %, respectivamente. El pH 3 fue el que menor contenido proteico presentó con un 52,96 %. Una alta o baja concentración de proteína va a especificar la intensidad de la coloración; siendo esta directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos consecuentes en sus moléculas (Baudi, 2006; Cambell et al., 2006), se cuantifica espectrofotométricamente a 540 nm (György et al., 2013). Este método es bastante específico, pero calificado de baja sensibilidad, por lo que se recomienda utilizar gran cantidad de muestra (Fernández & Galván, 2009; Hidalgo, 2008; Nadia, 2010).

Tabla 3. Contenido proteico de los aislados obtenidos a diferentes pH mediante el método de Biuret.

Aislado	Contenido Proteico (%)
pH 3	52,96 ^a ± 0,031
pH 4	57,85 ^b ± 0,013
pH 5	62,53 ^c ± 0,018
pH 6	56,74 ^b ± 0,026

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD).

Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el % de pureza de los aislados obtenidos a diferentes pH de precipitación

De acuerdo al análisis de varianza aplicado, el pH 4 y pH 6 no presentan diferencias significativas; mientras que en los pH 5 y pH 3 existen diferencias significativas; por lo tanto, al modificar el pH, este va a influir en el contenido proteico presente en los aislados. El pH 5 es el mejor tratamiento debido a que este se encuentra cercano a su punto isoeléctrico; en leguminosas los valores mínimos de solubilidad se encuentran en un rango de pH entre 4,0 y 6,0.

4.1.4 Caracterización de los Aislados proteicos

Los aislados proteicos de habichuela baby lima bean fueron estudiados mediante la técnica de electroforesis Native-PAGE y SDS-PAGE.

4.1.4.1 Electroforesis Native-PAGE y SDS-PAGE

Varias investigaciones corroboran que las proteínas vegetales pueden fraccionarse de acuerdo a su solubilidad (**Chel-Guerrero et al., 2003**); en las semillas de leguminosas se encuentran entre el 30 a 80 % de globulinas y resto son albúminas; siendo estas solubles en soluciones salinas y agua, respectivamente (**Adebiyi & Aluko, 2011; Aguilera & Gutiérrez, 2009; Machuka, 2000**). En leguminosas las fracciones con mayor importancia son las albúminas y las globulinas; mientras que las prolaminas y glutelinas en cereales (**Luis a. Chel-Guerrero et al., 2003**).

Los aislados proteicos fueron estudiados con la técnica de electroforesis Native-PAGE; misma que se lleva a cabo en ausencia de SDS, utilizando condiciones no desnaturalizantes (**Arndt et al., 2012**); conservándose la estructura cuaternaria natural de los analitos (**Antrobus & Borner, 2011**).

En la figura 2 se observa perfiles muy similares para los 4 valores de pH, identificándose bandas proteicas de 140 KDa que puede relacionarse a globulinas 7S, debido a que su peso molecular puede variar entre 140 a 200 kDa (**Dávalos et al., 2008**); estos resultados son muy similares en comparación a otras leguminosas como la zarandaja (*Lablab purpureus*) y fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) (**Galarza, 2016; Moran, 2017**). El desplazamiento de las proteínas dependerá de su carga,

tamaño; así como el pH durante la electroforesis, los cuales son factores que influirán en su movilidad (Adebiyi & Aluko, 2011).

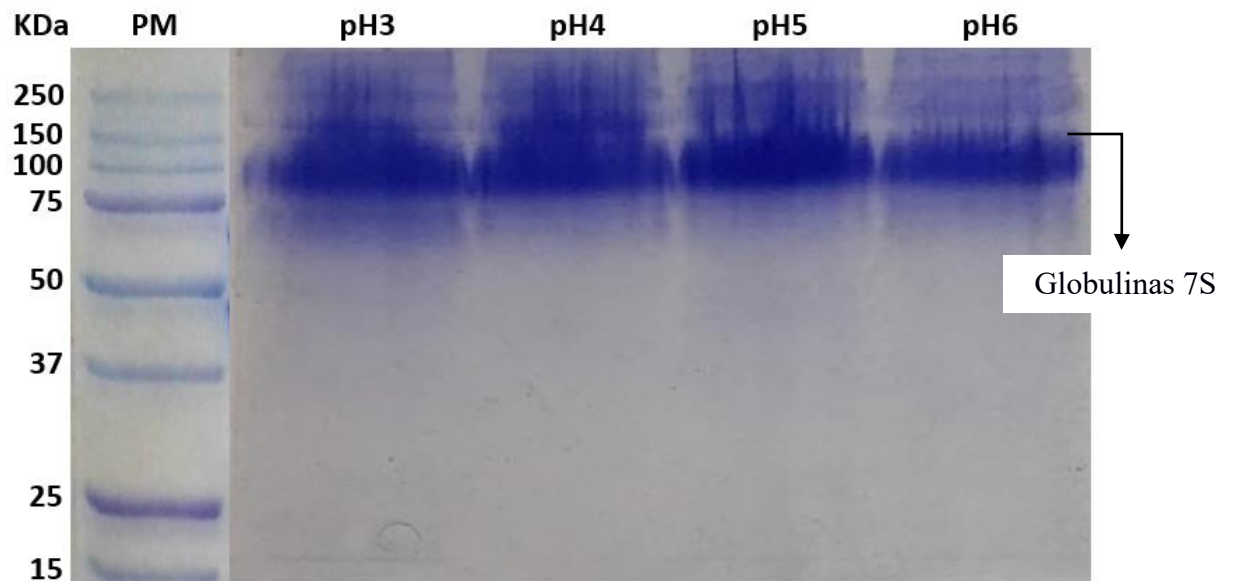


Figura. 2 Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.

En la figura 3 se presenta el análisis electroforético SDS – PAGE, con el agente reductor 2-β- mercaptoetanol, cuya función es romper los puentes disulfuro, además ocasiona bandas más visibles, manteniendo un alto grado de resolución después de la electroforesis (Marshall & Williams, 1984; Sigma-Aldrich, 2017). Claramente se puede observar el mismo perfil electroforético en los 4 pH, identificando bandas proteicas con pesos moleculares entre 15 a 60 kDa. Las bandas de 60 kDa pueden corresponder a globulinas 7S, mientras que las globulinas subunidades ácidas y básicas se encuentran entre los 33 a 44 kDa y 20 a 28 kDa, respectivamente. Finalmente se puede observar las albúminas 2S con un peso molecular de 15 kDa, siendo más evidentes en los pH 4, pH 5 y pH 6; estos datos son muy similares a los reportados en lima bean *Phaseolus lunatus*, albúminas (24, 22, 20 y 14 kDa) y globulinas (57, 32, 24 y 20 kDa) (Gallegos et al., 2004).

La mayoría de leguminosas contiene las fracciones proteicas de 2, 7 y 11S (Gallegos Tintoré et al., 2004; Ortiz de Bertorelli & Ramírez, 2000). La fracción 2S está compuesta básicamente por proteínas de bajo peso molecular (albúminas); en cambio

los componentes 7 y 11S son globulinas de alto peso molecular, mejor conocidas como proteínas de reserva (J. I. Boye et al., 2010; S. Chen & Paredes, 1997).

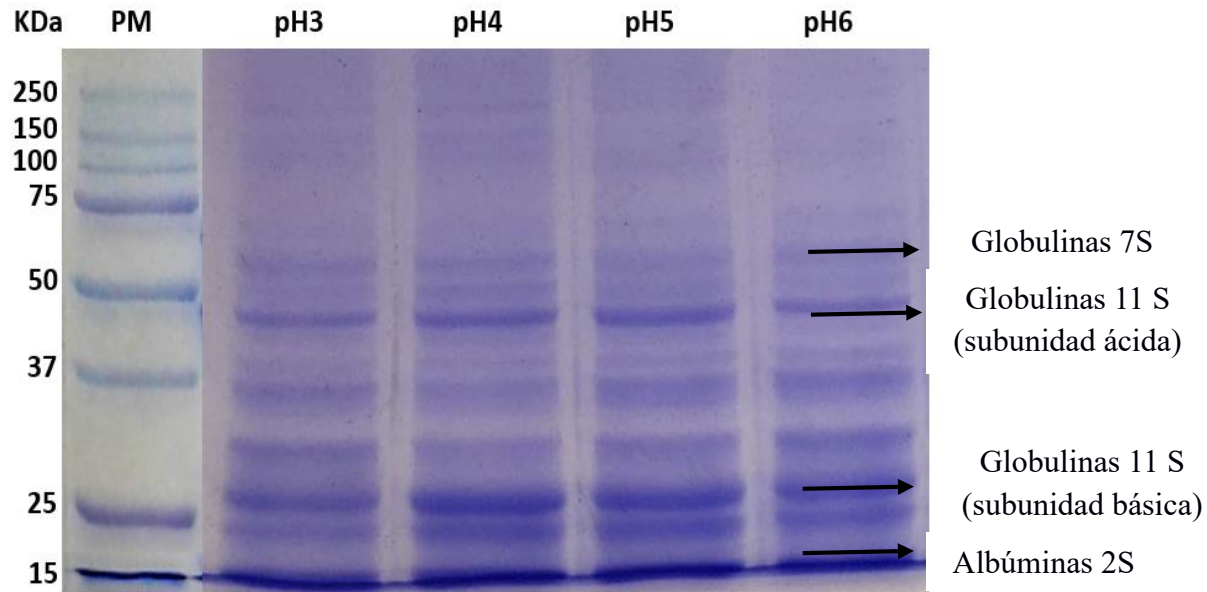


Figura. 3 Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.

En la figura 4 se presenta los aislados proteicos de habichuela estudiados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE sin el agente reductor 2- β - mercaptoetanol. Se observa que el perfil proteico es diferente en comparación con el análisis en presencia de 2- β - mercaptoetanol (Figura 3). Se evidencia un polipéptido con un peso molecular de 40 kDa que puede relacionarse a las globulinas 11S (subunidad ácida), mostrando una alta expresión en los pH 4, 5 y 6; mientras que en el pH 3 la banda proteica se torna muy tenue. Las globulinas 11S contiene una fracción ácida (29-35 kDa) y una fracción básica (18-28 kDa) (Chen & Paredes, 1997; Dávalos-Valle et al., 2008); además, se pudo observar bandas proteicas de 25 y 15 kDa que se asumen que pertenecen a las globulinas 11S (subunidad básica) y albúminas 2S, respectivamente.

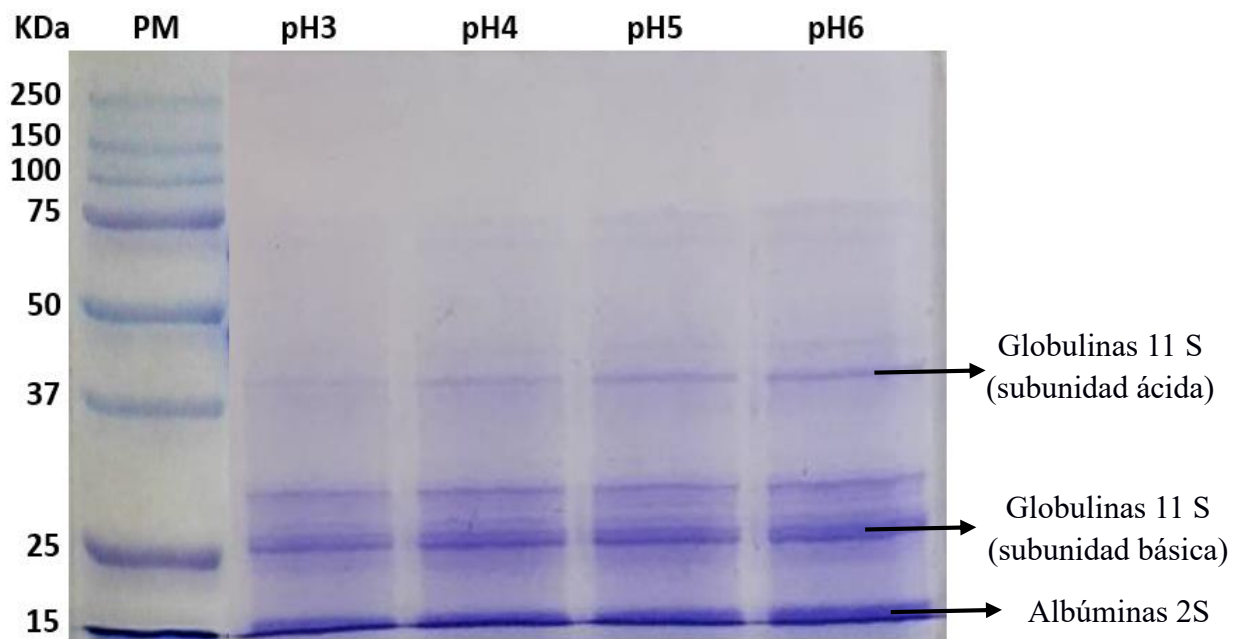


Figura. 4 Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de los aislados proteicos de habichuela precipitados a diferentes pH.

4.1.5 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Otro aspecto muy importante es la digestibilidad de las proteínas; debido a que no todas son digeridas, absorbidas y aprovechadas por el organismo humano (**Padilla et al., 2010**). La digestibilidad gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo simulando condiciones fisiológicas humanas, se trabajó con el aislado proteico pH 5, dado que este presenta un mayor contenido proteico, de acuerdo a la cuantificación realizada por Biuret.

En la figura 5 se presenta la digestión gástrica manejando 3 valores de pH; el pH 1,2 hace referencia a una persona enferma con problemas gastrointestinales; pH 2,0 (Adulto sano) y el pH 3,2 (a niños no lactantes) (**Jiménez-Saiz et al., 2011**), al compararlos con el aislado proteico pH 5 sin digerir, se observa claramente las bandas proteicas de entre 15 a 50 kDa en los 3 pH ensayados, que corresponde a la presencia de globulinas subunidades ácida y básica 11S y albúminas 2S.

Se evidencia que este tipo de proteínas presentan resistencia a la actividad de la pepsina, además se demuestra que la variación del pH no influye en la digestión; sin

embargo en la digestión a pH 1,2 la banda a 50 kDa presenta una menor expresión siendo ésta más tenue en comparación al resto. La disminución de la digestibilidad puede ser atribuida a que existe compuestos anti nutricionales (taninos, fitatos) en la proteína extraída (**Padilla et al., 2010**), estos compuestos pueden interferir inhibiendo la acción de las enzimas como tripsina, pepsina y la alfa-amilasa bajo condiciones *in vitro* (**Alvarado Quiroz, 2014**).

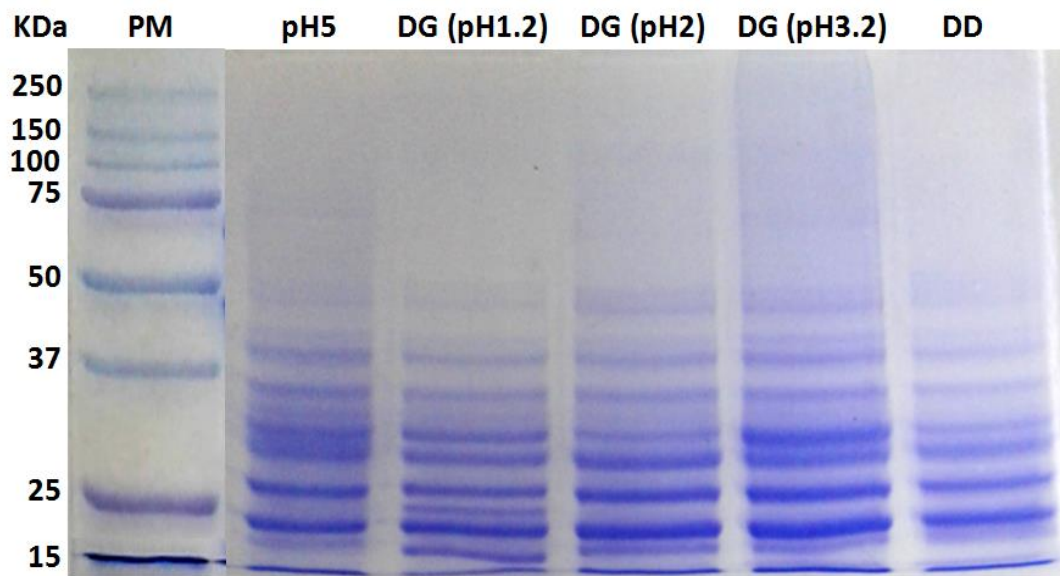


Figura. 5 Electroforesis SDS-PAGE de la digestión gástrica y duodenal de proteínas

Luego se llevó a cabo la digestión duodenal con pancreatina (100 U/ml), sales biliares (10mM) y CaCl₂ (1,5 mM). Se observa en la figura 5 bandas proteicas con menor expresión que van de 15 a 37 kDa que corresponde a globulinas 11S. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras especies de leguminosas; donde demuestran que la faseolina (*P. vulgaris* 7S globulina), vicilina (*P. sativum* L. 7S globulina), glicinina (*Glycine max* L. 11S globulina), tienen una alta resistencia para ser digeridas por varias proteasas (**Carbonaro et al., 2005; Deshpande & Damodaran, 1989**). Por lo tanto las proteínas presentes en habichuela baby lima bean no pueden ser hidrolizadas en su totalidad en la digestión humana.

4.1.5. Actividad Antioxidante.

4.1.5.1 Aislados proteicos de habichuela.

En la tabla 4, se presentan los porcentajes de la actividad antioxidante de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean a los pH 3,0; 4,0; 5,0 y 6,0. Se observa que el pH 5,0 posee un mayor porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica con un valor de 33,19 %, seguido de los pH 6,0 y 4,0 con 30,59 % y 32.69 %, respectivamente. El pH que presentó un valor más bajo de actividad fue el 3,0 con un valor de 29,99 %. Estos datos fueron interpretados por medio de un análisis de varianza simple para los diferentes pH ensayados, con la finalidad de analizar si existe o no diferencias significativas entre los pH e identificar cuál de ellos es el mejor tratamiento con respecto a la actividad antioxidante.

Tabla 4. Actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH de precipitación.

		Concentración	Promedio
pH	3	100 µg/ml	10,82 ^a ± 0,006
		200 µg/ml	15,69 ^a ± 0,007
		500 µg/ml	22,30 ^a ± 0,017
		1000 µg/ml	29,99 ^a ± 0,012
	4	100 µg/ml	13,97 ^a ± 0,012
		200 µg/ml	19,12 ^a ± 0,011
		500 µg/ml	23,81 ^a ± 0,022
		1000 µg/ml	32,69 ^a ± 0,008
	5	100 µg/ml	15,66 ^a ± 0,009
		200 µg/ml	19,65 ^a ± 0,008
		500 µg/ml	24,45 ^a ± 0,016
		1000 µg/ml	33,19 ^a ± 0,024
	6	100 µg/ml	13,40 ^a ± 0,006
		200 µg/ml	17,31 ^a ± 0,009
		500 µg/ml	22,60 ^a ± 0,010
		1000 µg/ml	30,59 ^a ± 0,027

Esta tabla muestra la media ± la desviación estándar de Actividad antiinflamatoria para cada pH. Las letras diferentes indican si existe diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la actividad antioxidante y los diferentes pH de los aislados proteicos de habichuela.

Los resultados arrojaron que se acepta la hipótesis nula, por lo que se concluye que no existe diferencias significativas entre los pH; por tal razón se propuso realizar un gráfico de comparación de medias (Fig. 6); donde se aprecia claramente que el pH 3, pH 4 y pH 6 tienden a una estabilidad en cuanto a sus medias, siendo el pH 5 quien sobresale respecto a los otros pH; por lo tanto se consideró trabajar con el aislado a pH 5 con una concentración proteica del 100 % y ser comparado con un antioxidante sintético (BHT).

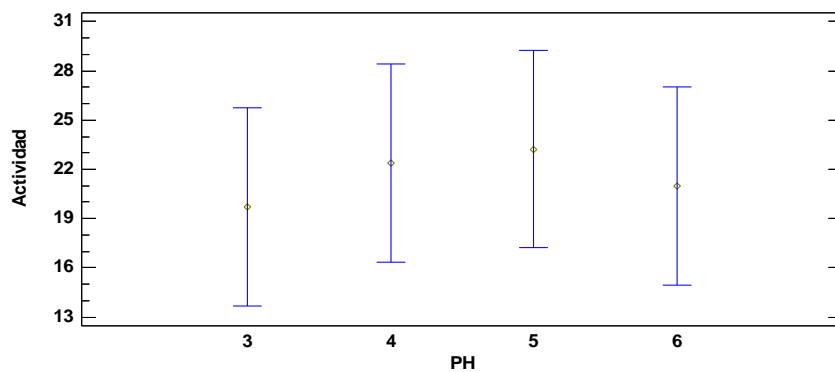


Figura. 6 Gráfica de medias de los 4 pH ensayados

En la figura 7 se evidencia que el aislado obtenido a pH 5 presenta mayor inhibición de peroxidación lipídica en todas las concentraciones probadas (100; 200; 500; 1000 µg/ml), en relación a los aislados obtenidos a pH: 3, 4 y 6.

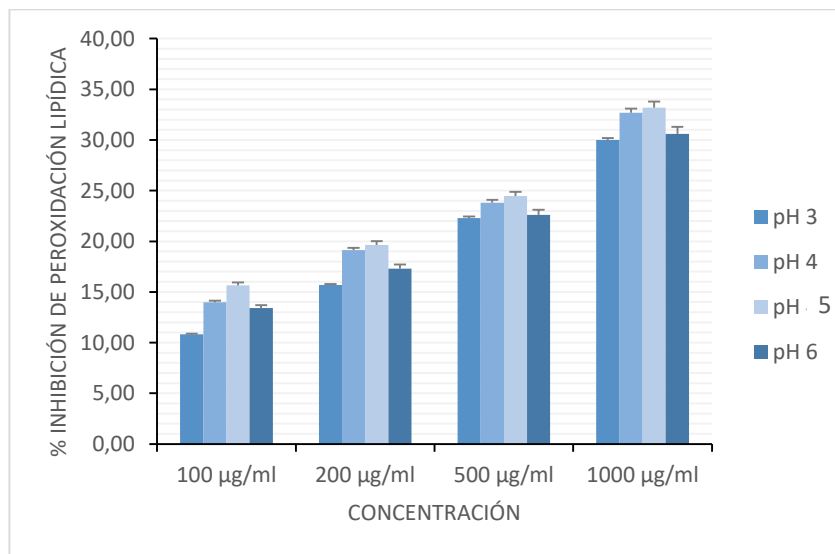


Figura. 7 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de los aislados proteicos de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.

Como control positivo se utilizó un antioxidante sintético (BHT), el cual es ampliamente utilizado en la industria alimentaria (**Laboratorios Vitafor, 2011**); sin embargo en los últimos años se ha restringido el uso de estos porque provocan riesgos a la salud e incluso a largo plazo podrían inducir cáncer en humanos (**Bueno, 2012; Gaviria Montoya et al., 2009**). La actividad antioxidante de las proteínas se debe a los aminoácidos constituyentes que posee, por ejemplo los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptófano) deben su capacidad de donar protones a radicales libres (**Hu, McClements, & Decker, 2003**); aunque no solo se debe a la presencia de estos, sino también al correcto posicionamiento de los aminoácidos en la proteína.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del aislado a pH 5, de acuerdo a la concentración de proteína pura y los valores del control (BHT); observando que todos los valores de la actividad del aislado están muy por debajo del BHT. Estos datos fueron analizados, para ver si el aislado a pH 5 tiene influencia sobre las concentraciones y el control; para ello se realizó un diseño A*B, introduciendo como factor A (pH 5 y Control) y factor B las concentraciones (100; 200; 500; 1000 µg/ml), midiendo la interacción entre ellas. Los resultados demuestran que existen grandes diferencias significativas entre el aislado proteico pH 5 y el control, además presenta diferencias entre las concentraciones y no presenta una interacción entre los factores (Tabla 34); por lo tanto se planteó realizar un hidrolizado proteico, con la finalidad de revertir estos resultados.

Tabla 5. Actividad antioxidante del aislado obtenido a pH 5 y Control (BHT)

	Concentración	Promedio
pH 5 (Mejor Tratamiento)	100 µg/ml	20,91 ^a ± 0,020
	200 µg/ml	26,71 ^b ± 0,025
	500 µg/ml	29,37 ^c ± 0,022
	1000 µg/ml	35,84 ^d ± 0,032
Control (BHT)	100 µg/ml	70,82 ^e ± 0,042
	200 µg/ml	77,00 ^f ± 0,050
	500 µg/ml	84,13 ^g ± 0,048
	1000 µg/ml	91,73 ^h ± 0,050

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican, para cada ensayo, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antioxidante de diferentes concentraciones del aislado proteico mejor tratamiento pH 5.

En la figura 8 se muestra la comparación de la capacidad antioxidante del aislado a pH 5 con el BHT a diferentes concentraciones 200, 400, 500 y 1000 ($\mu\text{g/ml}$); evidenciándose claramente que el control BHT presenta una mejor actividad. La mayor actividad del aislado a pH 5 fue de 35,84 % valor que se encuentra muy semejante al reportado en firiguero (*Vigna unguiculata L.*) con 35,80 % de actividad (**Quinga Paucar, 2017**); sin embargo en frejol montado (*Phaseolus vulgaris*) al mismo pH alcanzó un 93,16 % de actividad (**Moran, 2017**); esto puede deberse a que los fréjoles de cáscara de color muy intenso exhiben una mejor actividad antioxidante como ha sido demostrado por **Madhujith et al., (2004)**.

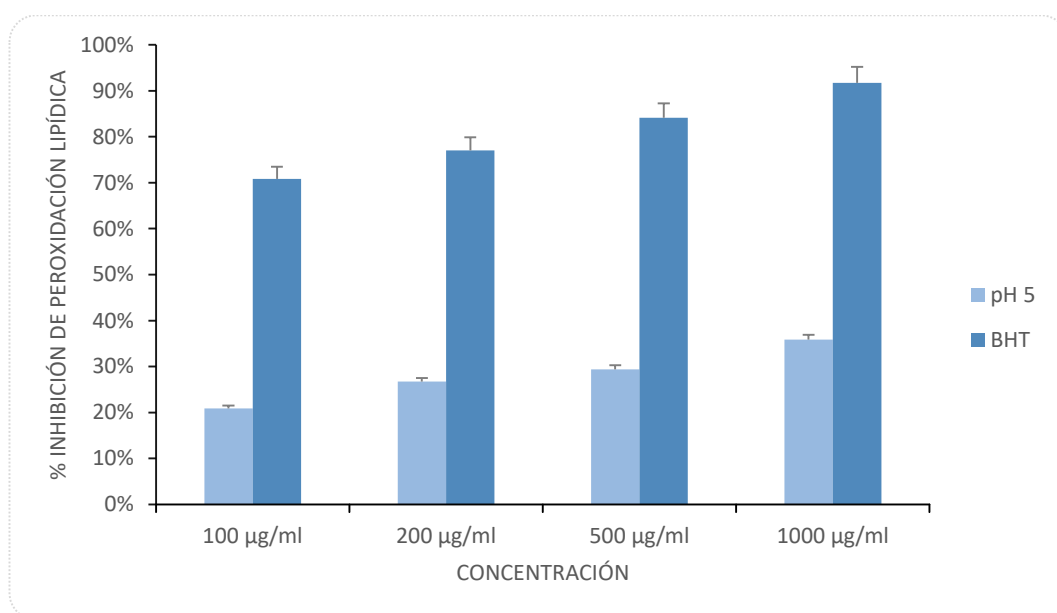


Figura. 8 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) del aislado proteico de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$.

4.1.5.2 Hidrolizados proteicos de habichuela

Los péptidos pueden derivarse de una hidrólisis química o enzimática, tienen un peso molecular cerca de 10 kDa (**Farrokhi et al., 2008**); se encuentra una extensa gama de informes reportados en literatura sobre la bioactividad de péptidos *in vitro* con propiedades antimicrobianas, antitrombótica y antioxidantes (**Malaguti et al., 2014**).

En la tabla 6 se observan los resultados obtenidos del hidrolizado proteico y los valores del control (BHT); claramente se evidencia que los valores de actividad aumentaron con respecto al aislado; sin embargo, estos resultados se encuentran por debajo del control BHT. Al igual que en el aislado los datos fueron analizados, por medio de un diseño A*B, identificando si el hidrolizado proteico tiene influencia sobre las concentraciones y el control.

Tabla 6. Actividad antioxidante del hidrolizado proteico y Control (BHT)

	Concentración	Promedio
Hidrolizado	100 µg/ml	44,03 ^a ± 0,035
	200 µg/ml	54,87 ^b ± 0,028
	500 µg/ml	63,43 ^c ± 0,043
	1000 µg/ml	77,17 ^d ± 0,029
Control (BHT)	100 µg/ml	70,82 ^e ± 0,042
	200 µg/ml	77,00 ^d ± 0,050
	500 µg/ml	84,13 ^e ± 0,048
	1000 µg/ml	91,73 ^f ± 0,050

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican, para cada ensayo, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antioxidante de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de habichuela

Los resultados demuestran que existen diferencias significativas entre el hidrolizado y el control, al igual presenta diferencias entre las concentraciones y en la interacción se descarta la hipótesis nula (Tabla 38).

En la figura 9 se muestra la comparación de la capacidad antioxidante del hidrolizado proteico y el BHT a diferentes concentraciones 200, 400, 500 y 1000 (µg/ml); la mayor inhibición se evidenció en la concentración de 1000 µg/ml con un valor de 77,17 %.

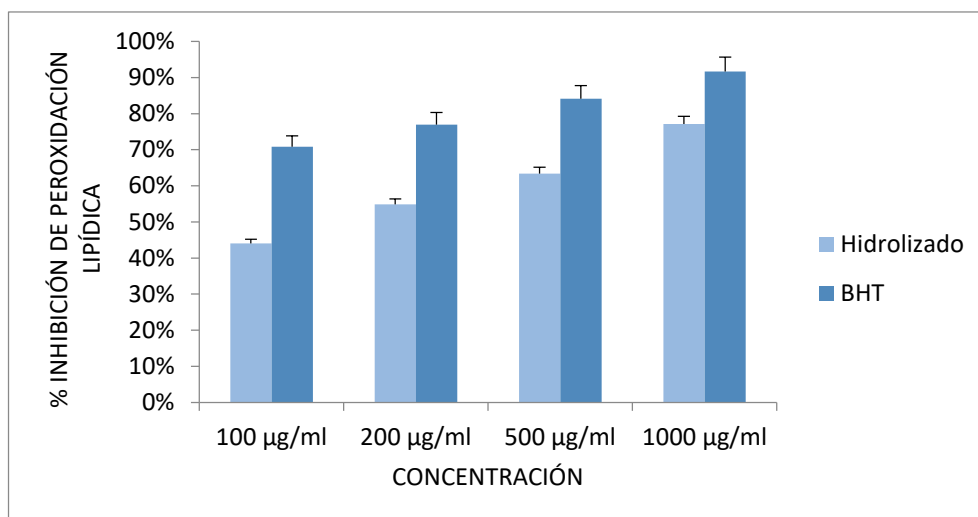


Figura. 9 Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) del hidrolizado proteico de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.

En el estudio realizado por **Valdez-Ortiz et al., (2012)** evaluaron la actividad antioxidante en hidrolizados de proteínas tratado con pepsina de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris L.*), mediante el ensayo de cationes radicales ABTS; encontrando una inhibición del 44 % de DPPH y del 73 % de inhibición de ABTS⁺⁺, resultados que son similares (77,17 %) a los obtenidos en el presente estudio, al utilizar el ensayo TBARS.

Un estudio muy reciente, los hidrolizados del frijol negro (*Phaseolus vulgaris L.*) que fueron obtenidos a partir de la digestión con pepsina exhibieron una mayor actividad depuradora de DPPH ($p < 0.05$) en relación al concentrado y el hidrolizado obtenidos de la digestión con alcalasa (**Evangelho et al., 2017**)

4.1.6. Actividad Antiinflamatoria

4.1.6.1 Aislados proteicos de habichuela

En la tabla 7, se presentan los porcentajes de la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos obtenidos a pH 3, 4, 5 y 6. Se observa que el pH 5 tiene un mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria con un valor de 21,53 % a una concentración de 1000 µg/ml, le siguen los pH 4,0 y 6,0 con 17,52 % y 15,80 %, respectivamente.

En cambio el pH 3 presentó una menor actividad con un valor de 10,40 %. Estos datos fueron interpretados por medio de un análisis de varianza simple para los diferentes pH ensayados (Tabla 21), con la finalidad de analizar si existe o no diferencias significativas entre los pH e identificar que pH es el mejor tratamiento.

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos obtenidos a diferentes pH de precipitación.

		Concentración	Promedio
pH	3	100 µg/ml	2,54 ^a ± 0,018
		200 µg/ml	4,00 ^a ± 0,038
		500 µg/ml	8,14 ^a ± 0,046
		1000 µg/ml	10,14 ^a ± 0,038
	4	100 µg/ml	4,24 ^a ± 0,030
		200 µg/ml	7,36 ^a ± 0,032
		500 µg/ml	12,55 ^a ± 0,039
		1000 µg/ml	17,52 ^a ± 0,056
	5	100 µg/ml	5,82 ^a ± 0,048
		200 µg/ml	11,09 ^a ± 0,054
		500 µg/ml	16,29 ^a ± 0,037
		1000 µg/ml	21,53 ^a ± 0,039
	6	100 µg/ml	2,34 ^a ± 0,039
		200 µg/ml	5,42 ^a ± 0,033
		500 µg/ml	10,72 ^a ± 0,040
		1000 µg/ml	15,80 ^a ± 0,057

Esta tabla muestra la media ± la desviación estándar de Actividad antiinflamatoria para cada pH. Las letras diferentes indican si existe diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la actividad antiinflamatorio y los diferentes pH de los aislados proteicos de habichuela.

Los resultados arrojaron que se acepta la hipótesis nula, por lo que se concluye que no existe diferencias significativas entre los pH; por tal razón se propuso realizar un gráfico de comparación de medias (Fig. 10); donde se aprecia claramente que el pH 5 es quien sobresale respecto a los otros pH, ya que estos tienden a una estabilidad en cuanto a sus medias. Por lo tanto se consideró trabajar con el aislado a pH 5 con una concentración proteica del 100 % y ser comprado con el control positivo diclofenaco sódico (antiinflamatorio no esteroideo), el cual tiene como finalidad inhibir la síntesis de prostaglandinas que son responsables de la inflamación (Malgor, 2010).

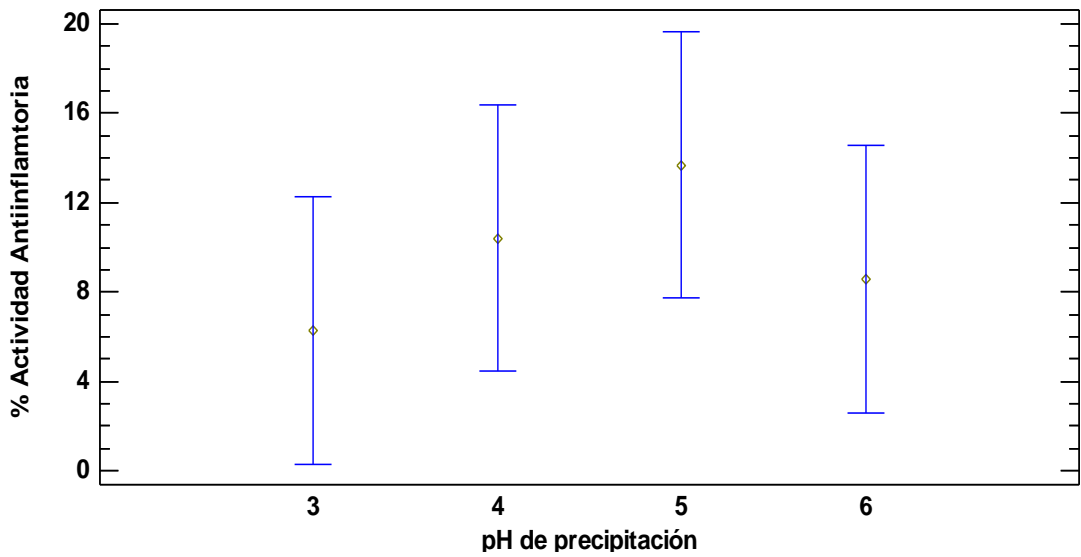


Figura. 10 Gráfica de medias de los 4 pH ensayados

En la figura 11 se observa que el aislado obtenido a pH 5 presenta mayor actividad en todas las concentraciones probadas (100; 200; 500; 1000 $\mu\text{g/ml}$), con relación a los aislados obtenidos a pH: 3, 4 y 6.

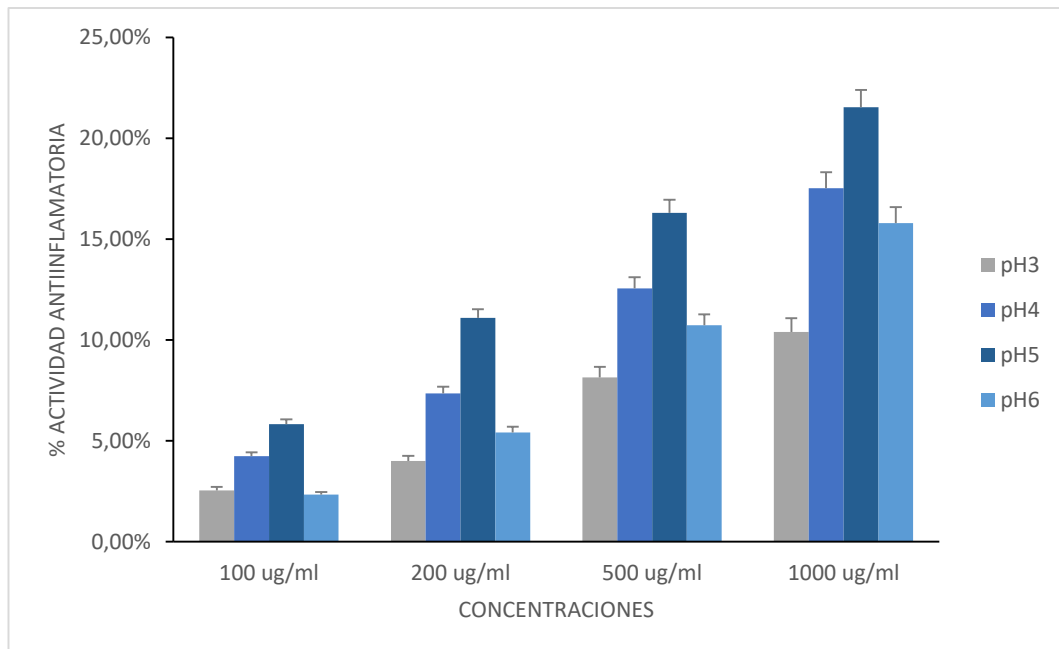


Figura. 11 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de habichuela a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del aislado a pH 5, de acuerdo a la concentración de proteína pura y los valores del control (Diclofenaco). El diclofenaco presentó una actividad antiinflamatoria de 100,00 % (1000 µg/ml); mientras que el efecto antinflamatorio más alto del aislado a pH 5 fue de 25,49 %. Estos datos fueron analizados por medio de diseño A*B e identificar si el aislado a pH 5 tiene influencia sobre las concentraciones y el control; se introdujo como factor A (pH 5 y Diclofenaco) y factor B las concentraciones (100; 200; 500; 1000 µg/ml), midiendo la interacción entre ellas.

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria del aislado obtenido a pH 5 y el control (Diclofenaco)

	Concentración	Promedio
pH 5 (Mejor Tratamiento)	100 µg/ml	13,38 ^a ± 0,052
	200 µg/ml	16,65 ^b ± 0,049
	500 µg/ml	18,82 ^c ± 0,054
	1000 µg/ml	25,49 ^d ± 0,054
Control (Diclofenaco)	100 µg/ml	32,14 ^e ± 0,027
	200 µg/ml	61,23 ^f ± 0,096
	500 µg/ml	75,85 ^g ± 0,084
	1000 µg/ml	100,00 ^h ± 0,078

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican, para cada ensayo, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antiinflamatorio de diferentes concentraciones del aislado proteico de habichuela mejor tratamiento.

Los resultados demuestran que existen grandes diferencias significativas entre el aislado proteico pH 5 y el control (Tabla 24), además presenta diferencias entre las concentraciones y no presenta una interacción entre los factores (Figura 18); por lo tanto se planteó realizar un hidrolizado proteico, con la finalidad de revertir estos resultados; ya que estas fuentes poseen propiedades nutracéuticas de vital importancia que permiten desarrollar diferentes modelos farmacológicos tanto in vivo como *in vitro* (Newman, Cragg, & Snader, 2003; Setty & Sigal, 2005).

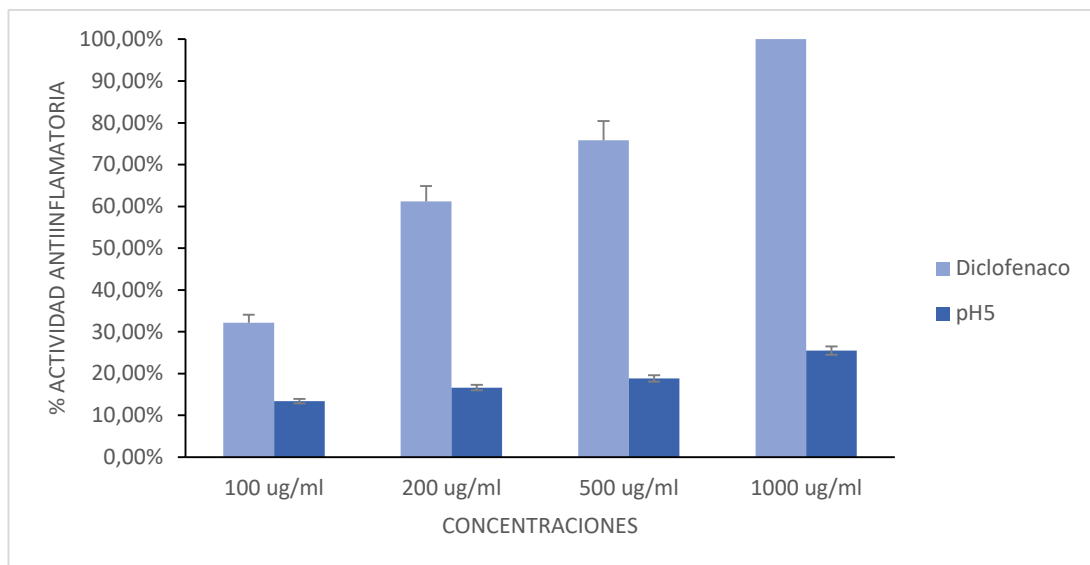


Figura. 12 Actividad antiinflamatoria del aislado proteico obtenido a pH 5 y el control a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.

4.1.6.2 Hidrolizados proteicos de habichuela

Las investigaciones de péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas vegetales, han centrado su atención en los efectos antiproliferativos y antihipertensivos, aunque algunos ensayos sugieren que pueden modular los procesos inflamatorios (**Malaguti et al., 2014**); el péptido más estudiado es la lunasiana encontrado en soya (**Jae, Hyung, & De Lumen, 2005**); el cual reportó inhibición de biomarcadores proinflamatorios (**Dia, et al., 2009**).

El hidrolizado y el control diclofenaco fueron analizados a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml), siguiendo la metodología de **Padmanabhan, (2012)** con algunas modificaciones. En la tabla 9 se presentan los resultados de la actividad antiinflamatoria, se observa que a una concentración de 1000 µg/ml el hidrolizado proteico presenta un porcentaje de actividad del 30,62 %. Los datos fueron analizados, por medio de un diseño A*B, para identificar si el hidrolizado proteico tiene influencia sobre las concentraciones y el control.

Tabla 9. Actividad antiinflamatoria del Hidrolizado proteico y el control (Diclofenaco)

	Concentración	Promedio
Hidrolizado	100 µg/ml	7,01 ^a ± 0,053
	200 µg/ml	13,66 ^b ± 0,074
	500 µg/ml	20,50 ^c ± 0,010
	1000 µg/ml	30,62 ^d ± 0,011
Control (Diclofenaco)	100 µg/ml	32,14 ^e ± 0,027
	200 µg/ml	61,23 ^f ± 0,096
	500 µg/ml	75,85 ^g ± 0,084
	1000 µg/ml	100,00 ^h ± 0,072

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican, para cada ensayo, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antiinflamatoria de diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de habichuela

De acuerdo al análisis estadístico los resultados demuestran que existen grandes diferencias significativas entre el hidrolizado proteico y el control (Tabla 28), además presenta diferencias entre las concentraciones y no presenta una interacción entre los factores (Figura 20).

En la figura 13 se observa el porcentaje de actividad antiinflamatoria que presenta el hidrolizado proteico al probarlo con cuatro concentraciones de: 100, 200, 500 y 1000 (µg /ml); se ve claramente que aumenta la actividad antinflamatoria a mayor concentración. En la concentración de 1000 µg/ml el hidrolizado proteico presenta la mayor actividad en comparación al aislado proteico con un valor de 30,62 %; sin embargo a la misma concentración el control posee una actividad del 100,00 %.

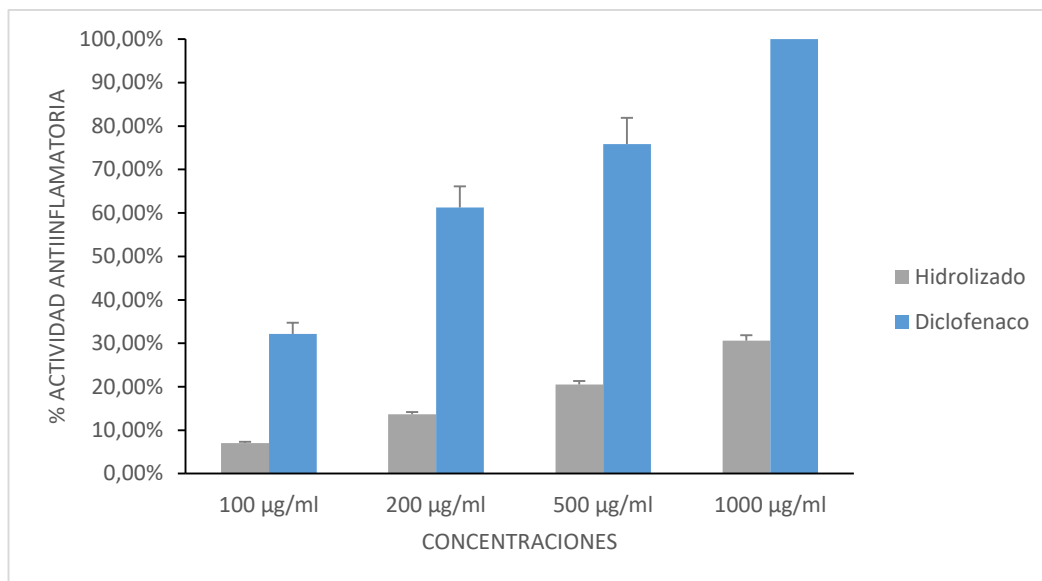


Figura. 13. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico y del diclofenaco a concentraciones de 100; 200; 500 y 1000 µg/ml.

4.1.7 Actividad Antimicrobiana

4.1.7.1 Aislados proteicos de habichuela

En la figura 14 se observa la actividad antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5 frente a cinco bacterias patógenas, se ensayaron concentraciones de 150; 200; 250; 375 y 500 mg/ml, reportando resultados negativos. No se encuentran resultados reportados en aislados proteicos con actividad antimicrobiana; la mayor parte de investigaciones se centran en hidrolizados proteicos de varias fuentes vegetales (**De Souza Candido et al., 2011; Shahidi & Zhong, 2008**). Los efectos dependen de la interrelación de proteína o péptidos con los elementos estructurales (pared y membrana celular) de la bacteria (**Mantyla et al., 2005**); alterando los procesos biológicos de ADN o ARN de los microorganismos patógenos (**Sitohy & Osman, 2010**).

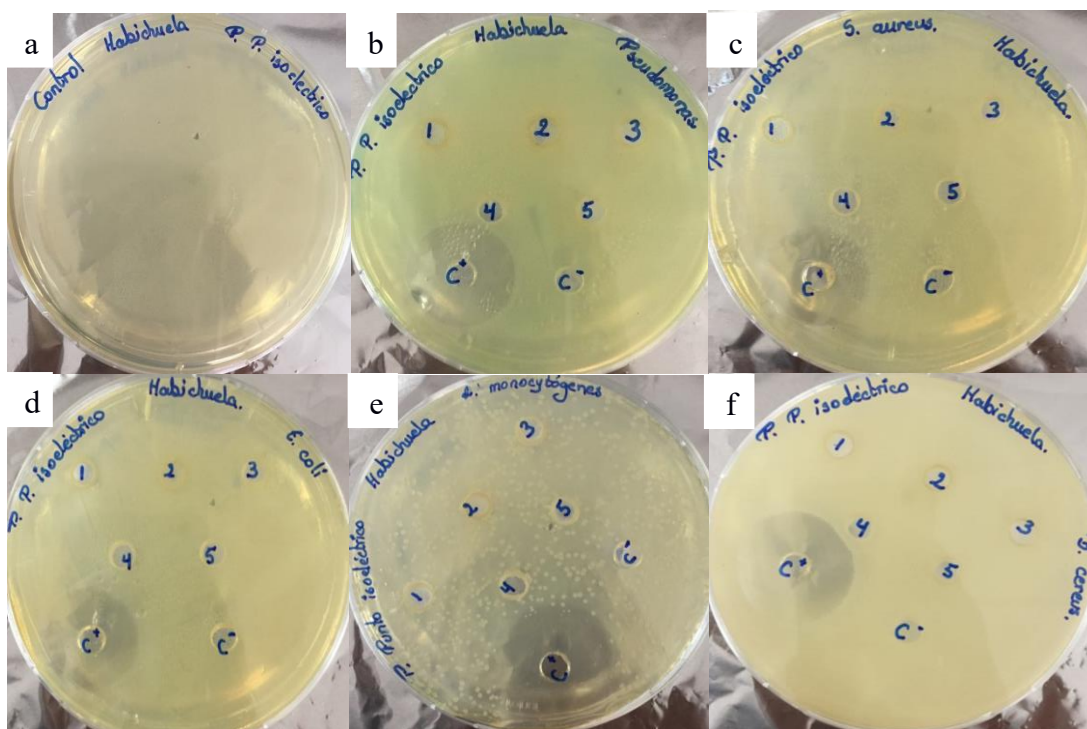


Figura. 14 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.

En el literal a se encuentra en control que no existe contaminación en el aislado; el literal b muestra el asilado contra *P. aeruginosa*; en el literal c muestra el asilado contra *S. aureus*; en el literal d muestra el asilado contra *E. coli*; en el literal e muestra el asilado contra *L. monocytogenes*; en el literal f muestra el asilado contra *B. cereus*.

4.1.7.2 Hidrolizados proteicos de habichuela

En la figura 15 se muestra los resultados obtenidos del hidrolizado proteico de habichuela, en cuatro de las cinco bacterias patógenas que se probaron presentaron actividad antimicrobiana, en las bacterias que se generó mayor inhibición fueron *L. monocytogenes* y *E. coli* (Tabla 10). La eficacia en los péptidos antimicrobianos (AMP) viene dada por la estructura y secuencia de los aminoácidos que le brindan su poder antimicrobiano (Pina-Pérez & Ferrús Pérez, 2018). El péptido de soja de cadena larga (IKAFKEATKVDKVVVLWTA) con una concentración 37.2 μM fue efectivo contra *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes* (Dhayakaran, 2014); por lo que se sugiere estudiar más a fondo los péptidos del hidrolizado de habichuela, ya que cuenta con un gran potencial antimicrobiano y son considerados ideales candidatos para el uso de compuestos antimicrobianos en alimentos (Pina-Pérez & Ferrús Pérez, 2018).

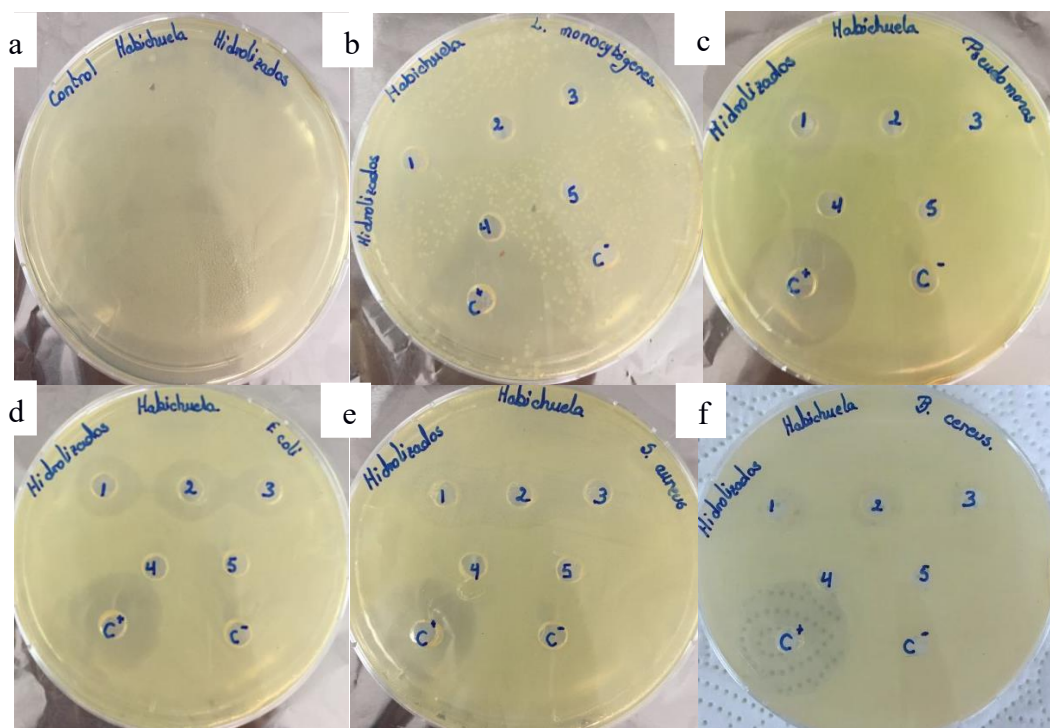


Figura. 15 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela.

En el literal a se encuentra en control que no existe contaminación en el hidrolizado; el literal b muestra el hidrolizado contra *L. monocytogenes*; en el literal c muestra el hidrolizado contra *P. aeruginosa*; en el literal d muestra el hidrolizado contra *E. coli*; en el literal e muestra el hidrolizado contra *S. aureus*; en el literal f muestra el hidrolizado contra *B. cereus*.

En la tabla 10 se muestra las distancias que presentó el hidrolizado frente a las bacterias patógenas, el mayor halo de inhibición fue frente a *E. coli* con una distancia promedio de 18,67 mm; en cambio para *B. cereus* la inhibición del crecimiento bacteriano fue menor con apenas 9,33 mm en la mayor concentración (500 mg/ ml). Generalmente estos péptidos antimicrobianos presentan una alta capacidad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; sin embargo en *S. aureus* no presentó inhibición bacteriana, esto puede ser a que la membrana celular es de densidad superior al resto de bacterias evaluadas (Barari et al., 2015; Salas et al., 2015).

A concentraciones menores de 250 mg/ml el hidrolizado no presenta inhibición bacteriana; por lo que se considera esta concentración como mínima. En un estudio realizado con proteínas de frijol ancho, soja y garbanzo aisladas, esterificadas con metanol reportaron una zona de inhibición mínima a 220 mg/ml contra Gram-positivos (*B. subtilis* y *S. aureus*) como Gram-negativos (*P. aeruginosa* y *E. coli*), utilizando el método de difusión en agar (Sitohy & Osman, 2010).

Tabla 10. Distancias (mm) de los halos de inhibición a diferentes concentraciones

Microorganismos	Concentración	Promedio	Inhibición (%)	Gentamicina (500 µg/ml)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™)	500 mg/ml	18,67 ^a ± 0,58	71,70	23,67 ± 0,58
	375 mg/ml	15,67 ^b ± 0,58	54,72	
	250 mg/ml	12,33 ^c ± 0,58	35,82	
	200 mg/ml	< 6	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 10145)	500 mg/ml	12,33 ^a ± 0,58	33,31	25 ± 1,00
	375 mg/ml	10,33 ^b ± 0,58	22,78	
	250 mg/ml	8,33 ^c ± 0,58	12,26	
	200 mg/ml	< 6	0	
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19115™)	500 mg/ml	18,33 ^a ± 0,58	51,37	30 ± 1,00
	375 mg/ml	16,33 ^b ± 0,58	43,04	
	250 mg/ml	13,67 ^c ± 0,58	31,96	
	200 mg/ml	< 6	0	
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC® 10876)	500 mg/ml	9,33 ^a ± 0,58	15,37	27,67 ± 0,58
	375 mg/ml	7,33 ^b ± 0,58	6,14	
	250 mg/ml	< 6	0	
	200 mg/ml	< 6	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	500 mg/ml	< 6	0	35 ± 1,00
	375 mg/ml	< 6	0	
	250 mg/ml	< 6	0	
	200 mg/ml	< 6	0	

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Las letras diferentes indican para cada ensayo, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distancias de las diferentes concentraciones del hidrolizado proteico de habichuela. Las distancias están expresadas en milímetros (mm); el control positivo fue gentamicina y como control negativo se utilizó agua estéril.

De acuerdo al análisis de varianza ANOVA simple, se corrobora que existen diferencias estadísticas significativas entre las medias de las concentraciones analizadas, con un nivel de confianza del 95 %. El mejor porcentaje de inhibición se consiguió con el hidrolizado proteico frente a *E. coli* con un valor del 71,70 % de inhibición; no obstante el menor porcentaje de inhibición fue en *B. cereus* como se puede apreciar en la tabla número 10. Según **Ramirez & Diaz, (2007)**, un efecto antibacteriano es considerado alto cuando el porcentaje de inhibición es superior al 70 %; por lo tanto el hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean frente a *E. coli* exhibe un porcentaje de inhibición alto: mientras que el porcentaje de inhibición del hidrolizado es bajo frente a *B. cereus*.

4.2 Verificación de la hipótesis

4.2.1 Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

De acuerdo al análisis de varianza de un solo factor, mostraron diferencias significativas, influyendo significativamente en el rendimiento de los aislados de habichuela baby lima bean.

4.2.2 Cuantificación de la proteína de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Al realizar el análisis de varianza de un factor, el contenido de proteína de los aislados de habichuela, es diferente en todos los pH de precipitación ensayados; es decir el pH de precipitación influye significativamente en el contenido de proteína de los aislados, rechazándose la hipótesis nula.

4.2.3 Digestibilidad de las proteínas de habichuela baby lima bean.

De acuerdo a la comparación visual, se muestra claramente que la digestión gástrica y duodenal de proteínas en comparación con el gel de electroforesis del mejor tratamiento (pH 5) (Figura 5) no presentan marcadas diferencias; por lo tanto la hipótesis nula es rechazada.

4.2.4 Actividad Antiinflamatoria de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

De acuerdo al diseño experimental las concentraciones y el pH de los aislados proteicos influyen significativamente en la actividad antiinflamatoria.

4.2.5 Actividad Antioxidante de los aislados proteicos de habichuela baby lima bean.

Conforme al diseño experimental las concentraciones y el pH de los aislados proteicos influyen significativamente en la actividad antioxidante.

4.2.6 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela baby lima bean (mejor tratamiento)

El aislado proteico no exhibe actividad antimicrobiana, es decir se rechaza la hipótesis nula.

4.2.7 Actividad Antiinflamatoria del hidrolizado proteico (mejor tratamiento).

De acuerdo al diseño experimental las concentraciones y el pH del hidrolizado influyen significativamente en la actividad antiinflamatoria, aceptándose la hipótesis nula.

4.2.8 Actividad Antioxidante del hidrolizado proteico (mejor tratamiento).

Acorde al diseño experimental las concentraciones y el pH del hidrolizado influyen significativamente en la actividad antioxidante, aceptándose la hipótesis nula.

4.2.9 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico de habichuela (mejor tratamiento).

A realizar el análisis de varianza de un factor, las distancias de los halos inhibición, son diferentes en las concentraciones ensayadas; es decir la concentración influye significativamente en el halo de inhibición del aislado frente a las bacterias analizadas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se aislaron las proteínas presentes en la habichuela baby lima bean por el método de precipitación por punto isoeléctrico, evidenciándose que a pH 6 presentan mayor porcentaje de rendimiento (27.59 %); sin embargo no se observó de manera clara la formación de un precipitado, efecto que fue muy evidente en el resto de pH; por lo cual esta muestra presentó mayor peso después de ser liofilizada; mientras que los pH 5 y 3 presentaron rendimientos muy similares.
- Se hidrolizaron las proteínas de habichuela baby lima bean obtenidas a pH 5 por ser el mejor tratamiento de acuerdo a su cuantificación, simulando las condiciones fisiológicas de la digestión humana; donde se evidencia que este tipo de proteínas exhiben resistencia a la actividad de la pepsina y pancreatina.
- Se cuantificó el contenido proteico de habichuela baby lima bean obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método Biuret, obteniendo el mayor contenido proteico en el aislado a pH 5 con un valor de 62,53 %; mientras que los pH 4 y 6 presentaron valores muy similares entre sí con un 57,85 % y 56,74 %, respectivamente.
- Se caracterizó por peso molecular las proteínas de habichuela (*P. lunatus L.*) obtenidas a diferentes pH de precipitación mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, observando perfiles muy análogos para los 4 pH con bandas proteicas comprendidas entre 15 a 60 kDa, representando las bandas de 60 kDa a globulinas 7S; mientras que las bandas que oscilan entre un peso

molecular de 15 kDa representan a albúminas 2S, siendo estas más evidentes en los pH 4, pH 5 y pH 6.

- Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos; siendo el aislado a pH 5, el cual exhibió mayor actividad con 21,53 %; mientras que en el hidrolizado proteico del mejor tratamiento tuvo un aumento considerable en relación al aislado obteniendo un valor de 30,62 % de actividad antiinflamatoria.
- Se determinó la actividad antioxidante de los aislados proteicos utilizando el método de TBARS; concurrendo el aislado a pH 5 el cual presenta mayor actividad con un valor 33,19 %; sin embargo el valor de la inhibición lipídica aumentó significativamente en el hidrolizado proteico, obteniendo un valor de 77,17 % de actividad antioxidante.
- Se determinó la actividad antibacteriana de los aislados proteicos, siendo estos negativos en todas las concentraciones ensayadas; en cambio en el hidrolizado proteico contra las bacterias patógenas: *L. monocytogenes*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, presentó halos de inhibición en las concentraciones de 500, 375 y 250 mg/ml; mientras que para *B. cereus* solo presentó inhibición en concentraciones de 500 y 375 mg/ml.
- A nivel general, se evaluaron las actividades antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana de los aislados y del hidrolizado proteico de Habichuela (*P. lunatus* L.), y su digestibilidad *in vitro*, presentando poca actividad antiinflamatoria, antioxidante por parte de los aislados proteicos; sin embargo el hidrolizado proteico exhibió mayor actividad biológica en comparación con el aislado proteico.

5.2 Recomendaciones

- Aislar proteínas con un pH de solubilización entre 8,5 y 9,0; ya que en estudios de leguminosas son muy recomendados.
- Para estudios de actividad antimicrobiana se recomienda realizar una hidrólisis con diferentes enzimas (Alcalasa, Papaína, Bromelina, entre otras.) y así comparar con este estudio.
- Utilizar otros métodos de cuantificación de proteínas como el método de kjeldahl muy utilizado para cuantificar aislados proteicos.
- Se recomienda en las actividades antiinflamatoria y antioxidantes concentraciones más cercanas de 100, 200, 500, 750, y 1000 $\mu\text{g/ml}$.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, T. (2013). Modified Kirby-Bauer disc diffusion method for Antimicrobial Susceptibility Testing - microbeonline.
- Adebiyi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>
- Agudelo, O., & Montes de Oca, G. (1988). *El cultivo de la habichuela*. Colombia.
- Aguilera-Gutiérrez, Y. (2009). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización Nutricional y Valoración de sus Propiedades Tecno-Funcionales, 245.
- Alvarado Quiroz, K. (2014). *Obtención, caracterización fisicoquímica, caracterización electroforética y digestibilidad del aislado proteico del residuo agroindustrial de Plukenetia volubilis (Sacha Inchi)*". Universidad Católica de Santa María. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/54221012.pdf>
- Amarowicz, R., Troszyńska, A., Baryłko, N., & Shahidi, F. (2004). Polyphenolics extracts from legume seeds: Correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11(4), 278–286. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2004.01143.x>
- Amir, M., Javed, S. A., & Kumar, H. (2010). Design and synthesis of 3-[3-(substituted phenyl)-4-piperidin-1-ylmethyl]-4-morpholin-4-ylmethyl-4,5-dihydro-isoxazol-5-yl]-1H-indoles as potent anti-inflammatory agents. *Medicinal Chemistry Research*, 19(3), 299–310. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9194-8>
- Antrobus, R., & Borner, G. H. H. Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation., *PLoS One* 6 (2011).
- Ariza, T. de J., Zenón, Y., Castrejón, J. L., Yáñez, J., Gómez, Y. de las M., & Oliver, M. del C. (2014). Angiotensin - I - converting enzyme inhibitory , antimicrobial , and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L .) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive, 785–794.
- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., & Bachmann, M. (2012). Protein Electrophoresis, 869, 49–53. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4>
- Avalos, E. (2001). *Utilización del frijol Phaseolus vulgaris como fuente proteica en dietas para el camarón Litopenaeus vannamei*. Universidad Autónoma de Nueva León.

- Aykroyd, V. & Doughty, J. (1982). *Las Leguminosas en la Nutrición Humana*. Roma: Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Balogun, A. M., & Fetuga, B. L. (1986). Chemical composition of some underexploited leguminous crop seed in Nigeria. *Agriculture Food Chemistry* 34, 189–192.
- Barari, L., Mosavi, N., Asgharpour, F., Asadi, A., Moulana, Z., & Elmi, M. M. (2015). Antibacterial and antifungal effect of chickpea (*Cicer arietinum*) aqueous seed extract. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(10), 336–346.
- Baudi, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta Edi). México: Pearson.
- Bauer, A. W., Perry, D. M., & Kirby, W. M. M. (2015). Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing Staphylococci.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004a). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193–1201. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004b). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193–1201. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431.
- Bueno, M. (2012). Aditivos Antioxidantes. *Instituto de Medicina Biologica y Antienvejecimiento*. Retrieved from <http://biosalud.org/archivos/divisiones/4aditivosantioxidantes.pdf> file:///C:/Users/JAVIER/Downloads/Documents/4aditivosantioxidantes.pdf
- Caicedo, A. L., Gaita'n, E., Duque, M. C., Chica, O. T., Debouck, D. G., & Tohme, J. (1999). AFLP Fingerprinting of L. and Related Wild Species from South America. *Crop Science*, 39(5), 1497. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3951497x>
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2000). Estacion experimental santa catalina programa nacional de leguminosas. Retrieved from <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/510/1/iniapsci159.pdf>

- Callisaya, C., & Alvarado, A. (2009). Aislados Proteínicos De Granos Altoandinos Chenopodiaceas ; Quinoa “ Chenopodium Quinoa ” – Cañahua “ Chenopodium Pallidicaule ” Por Precipitación Isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26(1), 12–20. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602009000100002
- Cambell, P., Smith, A., & Peters, T. (2006). *Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. España: Masson.
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M., & Carnovale, E. (1997). Solubility - Digestibility Relationship of Legume Proteins, 3387–3394.
- Carbonaro, M., Grant, G., & Cappelloni, M. (2005). Heat-induced denaturation impairs digestibility of legume (Phaseolus vulgaris L and Vicia faba L) 7S and 11S globulins in the small intestine of rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 65–72. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1940>
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19–30. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.11.007>
- Carmona, L. (2015). Métodos de Purificación y Análisis de Proteínas. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DiplomadoLunes1Oct_21564.pdf
- Casseres, E. (1981). *Producción de hortalizas* (Tercera ed). San José, Costa Rica.
- CEPAL, PMA, & MCDS. (2017). Impacto Social y Económico de la Malnutrición: Resultados del Estudio Realizado en Ecuador, 68.
- Chel-Guerrero, L. a., Corzo-Rios, L., & Betancur-Ancona, D. a. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de La Universidad Autónoma de Yucatán*, 18(October), 34–43. Retrieved from <http://www.cirsociales.uady.mx/revUADY/pdf/227/ru2275.pdf>
- Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., & Dávila-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. <https://doi.org/10.1021/jf010778j>
- Chen, F., Wu, a, Shieh, P., Kuo, D., & Hsieh, C. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of. *Food Chemistry*, 94(May), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.046>
- Chen, S., & Paredes, O. (1997). Globulin From Amaranth Seeds. *Food Biochemistry*, 21, 53–65.
- Curwen, D. y Schulte, E. E. (1982). *Commercial Snap Bean production*. University of Wisconsin: Green and Wax.

- Dávalos-Valle, H. N., Herrera-Villegas, G., & Astudillo-Vázquez, A. (2008). V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular OBTENCION DE ALMIDON RESISTENTE DE AMARANTO (*Amaranthus*, (5), 1.
- De Souza Candido, E., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., ... Franco, O. L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*, 25, 3290 – 3305. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184291>
- Deshpande, S. S., & Damodaran, S. (1989). Structure-Digestibility Relationship of Legume 7S Proteins. *Journal of Food Science*, 54(1), 108–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb08579.x>
- Dhayakaran, A. (2014). *Investigation of the Antimicrobial Activity of Soy based Isoflavones and Peptides against Pathogenic Biofilms*. The University of Guelph.
- Dia, V. P., Wang, W., Oh, V. L., de Lumen, B. O., & de Meja, E. G. (2009). Isolation, purification and characterization of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its antiinflammatory activity. *Food Chemistry*, 114, 108–115.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>
- Duranti, M., & Gius, C. (1997). Field Crops Research Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53, 31–45.
- El Productor. (2015). Ecuador: La habichuela gana terreno. Retrieved from <https://elproductor.com/noticias/ecuador-la-habichuela-gana-terreno/>
- Evangelho, J. A. do, Vanier, N. L., Pinto, V. Z., Berrios, J. J. De, Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 214, 460–467. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.046>
- Evans, A. M. (1980). Structure, variation, evolution, and classification in *Phaseolus*. *Structure, Variation, Evolution, and Classification in Phaseolus.*, 337–347. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19800704687>
- FAO. (2005). Contenido de nutrientes en alimentos seleccionados. Retrieved April 6, 2018, from <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s1x.htm>
- FAO. (2016). Consumo y producción de legumbres ha perdido fuerza en América Latina y el Caribe frente a cultivos más comerciales.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J. P., & Brusslan, J. A. (2008). Plant peptides and peptidomics, 105–134. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00315.x>
- Federación Nacional de Cafeteros. (1985). *El cultivo de Habichuela* (Vol. 1).

- Fernández-Quintela, A. Macarulla, M. T., del Barrio, A. S., & Martínez, J. A. (1997). Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4), 331–341.
- Fernández, E., & Galván, A. (2009). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7.
- Fofana, B., Baudoin, J. P., Vekemans, X., Debouck, D. G., & du Jardin, P. (1999). Molecular evidence for an Andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 98(2), 202–212. <https://doi.org/10.1007/s001220051059>
- Freixa B, Vila R, Vargas L, Lozano N, A. T., & Caniguera S. (1998). Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytotherapy Research*, 12(6), 427–430.
- Galarza, I. (2016). *Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro y actividad antioxidante en concentrados proteicos de zarandaja (Lablab purpureus L. Sweet)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Gallegos Tintoré, S., Pacheco Aguirre, J., Betancur Ancona, D., & 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. Retrieved from http://www.scielo.org/ve/scielo.php?pid=S0004-06222004000100012&script=sci_arttext
- García, H., & Vázquez, R. (1998). Cuantificación De Proteínas: Una Revisión. *BioTecnología*.
- García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 2(1), 31–41. Retrieved from http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.pdf
- Gaviria Montoya, C., Ochoa Ospina, C., Sánchez Mesa, N., Medina Cano, C., Lobo Arias, M., Galeano García, P., ... Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(6), 519–528.
- Ghanbari, R., Ebrahimpour, A., Abdul-hamid, A., & Ismail, A. (2012). Actinopyga lecanora Hydrolysates as Natural Antibacterial Agents, 16796–16811. <https://doi.org/10.3390/ijms131216796>
- Graham, V. (2003). Legumbres: la importancia y las restricciones para el uso más grande.
- Granado, F., & Hernández, E. (2016). Functional Foods and Health Effects: A Nutritional Biochemistry Perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 23(26). <https://doi.org/10.2174/0929867323666160615105746>

- Grefa, J. (2017). *Extracción mecánica de la torta de guachanzo (Caryodendron orinocense Karst) y su caracterización de proteínas y polifenoles*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Guzmán-Chozas, M., Vicario, I., & Guillén-Sans, R. (1997). Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *Agric. Food Chem*, 45(7), 2452–2457.
- Guzmán, V. (2012). *Determinación proximal de los principales componentes nutricionales de cinco variedades de fréjol: Canario, Bayo, Blanco, Rojo y Negro*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5078/T-PUCE-5302.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- György, H., József, K., Mihály, K., & Al., E. (2013). *Spectrophotometry and protein concentration measurements. Introduction to Practical Biochemistry*. <https://doi.org/TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073>
- Hamblin, J., & Evans, A. M. (1976). The estimation of cross yield using early generation and parental yields in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 25(1), 515–520. <https://doi.org/10.1007/BF00041586>
- Handley, A. J., Koster, R., Monsieurs, K., Perkins, G. D., Davies, S., & Bossaert, L. (2004). Recomendaciones de la OMS para gobiernos y consumidores acerca del uso de los tratamientos tradicionales. *Revista Panamericana de Salud P*, 16(3), 1–16. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892004000900013>
- Hidalgo, C. (2008). Evaluación del método de Biuret para la cuantificación de las proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo. *Universidad de Costa Rica: Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología*, 2(4), 29–36. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v15n3-4/art4.pdf>
- Hong, S., Park, T., & Lee, K. (2001). The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide, 22, 1669–1674.
- Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Lipid Oxidation in Corn Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Casein, Whey Protein Isolate, and Soy Protein Isolate, 1696–1700. <https://doi.org/10.1021/jf020952j>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.
- INIAP. (1992). Tabla de análisis del Laboratorio de Nutrición y calidad. Quito, Ecuador: Departamento de Nutrición y Calidad.
- Jaaska, V. (1996). Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the Phaseolus beans (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 200(3–4), 233–252. <https://doi.org/10.1007/BF00984938>
- Jae, H. P., Hyung, J. J., & De Lumen, B. O. (2005). Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7686–7690. <https://doi.org/10.1021/jf0506481>

- 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). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962. <https://doi.org/10.1021/jf9901461>
- Kanatt, S. R., Arjun, K., & Sharma, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls. *Food Research International*, 44(10), 3182–3187.
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750.
- Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102(1), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.029>
- Koenig, R., & Gepts, P. (1989). Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor Appl Genet*, 78, 809–817.
- L. Chel-Guerrero, *,†,‡, V. Pérez-Flores, †, D. Betancur-Ancona, † and, & Dávila-Ortiz‡, G. (2001). Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds.
- Laboratorios Britania. (2001). Mueller Hinton Agar, 1–3. Retrieved from http://www.britanialab.com/productos/B23137_REV_01-MUELLER_HINTON_AGAR.pdf
- Laboratorios Vitafor. (2011). Antioxidantes. *Laboratorios Vitafor S.R.L.* Retrieved from http://www.dirico.com.ec/archivos/Presentacion_Antioxidantes.pdf
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Leon, T. universidad autonoma de nuevo. (2000). Fuentes Vegetales. Mexico.
- Life Science Weekly. (2015). *Peptides and Proteins; New Peptides and Proteins Study Results Reported from University of Bologna (Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects)*.
- Lioi, L., & Galasso, I. (2002). Oligonucleotide DNA fingerprinting revealing polymorphism in *Phaseolus lunatus* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49(1), 53–58. <https://doi.org/10.1023/A:1013809915096>
- Machuka, J. (2000). Characterization of the seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria. *Food Chemistry*, 68(4), 421–427.

- Madhujith, T., Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COMMON BEANS (*PHASEOLUS VULGARIS* L.). *Journal of Food Lipids*, *11*(3), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2004.01134.x>
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. G., & Hrelia, S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 21120–21135. <https://doi.org/10.3390/ijms151121120>
- Malgor, V. (2010). ANALGÉSICOS ANTIPIRÉTICOS Y ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES (AINES) DROGAS TIPO ASPIRINA. Capítulo 7. Retrieved from https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/0000cap7_aines.pdf
- Manamperi, W. A. R., Chang, S. K. C., Ulven, C. A., & Pryor, S. W. (2010). Plastics from an improved canola protein isolate: Preparation and properties. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*(8), 909–915. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1616-8>
- Mantyla, T., Sirola, H., Kansanen, E., Korjamo, T., Lankinen, H., Lappalainen, K., ... Narvanen, A. (2005). Effect of temporin A modifications on its cytotoxicity and antimicrobial activity. *APMIS*, *113*(7–8), 497–505. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_107.x
- Marmon, S. K., & Undeland, I. (2013). Effect of alkaline pH-shift processing on in vitro gastrointestinal digestion of herring (*Clupea harengus*) fillets. *Food Chemistry*, *138*(1), 214–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.035>
- Marshall, T., & Williams, K. M. (1984). Artifacts associated with 2-mercaptoethanol upon high resolution two-dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *139*(2), 502–505. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90041-1)
- Martínez, Augustin O. Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. In *Nutrición Hospitalaria* (pp. 01-14).
- Martínez, E. N., & 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)). <https://doi.org/10.1021/jf960169p>
- McCurdy, S. M., & Knipfel, J. E. (1990). Investigation of Faba Bean Protein Recovery and Application to Pilot Scale Processing. *Journal of Food Science*, *55*(4), 1093–1094. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01606.x>
- Mine, Y., Ma, F., & Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(5), 1088–1094. <https://doi.org/10.1021/jf0345752>

- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mishra, S., Rao, C., Ojha, S., Vijayakumar, M., & Verma, A. (2010). An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *Internat J Pharmacol Sci Res*, 1(1), 29–44.
- Moran, R. (2017). *Caracterización de concentrados proteicos, determinación de la actividad antioxidante y cuantificación de fenoles solubles totales de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Moreno-Ortiz, V. C., Martínez-Núñez, J. M., Kravzov-Jinich, J., Pérez-Hernández, L. A., Moreno-Bonett, C., & Altagracia-Martínez, M. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, 44(4), 17–29. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a3.pdf>
- Moughan, P. J., Rutherford, S. M., Montoya, C. A., & Dave, L. A. (2014). Food-derived bioactive peptides - A new paradigm. *Nutrition Research Reviews*, 27(1), 16–20. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000206>
- Nadia, Z. (2010). *Método de Biuret*. Retrieved from <https://nadiazg.files.wordpress.com/2012/04/practica-2.pdf>
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022–1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>
- Nielsen, S. (2010). Food Analysis. *Springer, Cuarta Edi*(Cuarta Edición).
- Nienhuis, J., Tivang, J., Skroch, P., & Dos Santos, J. B. (1995). Genetic Relationships among Cultivars and Landraces of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) as Measured by RAPD Markers. *J Am Soc Hortic Sci*, 120(2), 300–306. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/120/2/300.full.pdf>
- Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins : State of the Art, 1–27.
- North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services. (2017). Propiedades de las Habichuelas (Green beans).
- Oliveira, C. F., Coletto, D., Correa, A. P. F., Daroit, D. J., Toniolo, R., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2014). Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. *International Food Research Journal*, 21(2), 775–781.
- Ortiz de Bertorelli, L., & Ramírez, A. (2000). Estudio electroforético de las albúminas y globulinas de cuatro genotipos de *Canavalia ensiformis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 74–80. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s0004-06222000000100010&script=sci_arttext&tlng=es

- Padilla, F. C., Guédez, T., Alfaro, M. J., Regnault, M., & Rincón C, A. M. (2010). Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.). *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 41(1), 38–42. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772010000100006&script=sci_arttext&tlng=pt
- Padmanabhan, J. S. (2012). Evaluation of in-vitro antiinflammatory activity of herbal preparation, a combination of four herbal plants. *Int J App Basic Med Sci*, 2(1), 109–116.
- Petrucelli, S., & Añón, M. C. (1995). Soy Protein Isolate Components and Their Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1762–1767.
- Pina-Pérez, M. C., & Ferrús Pérez, M. A. (2018). Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 114–124. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.12.007>
- Puertas, M. A., Mosquera-Mosquera, N., & Rojano, B. (2016). Estudio de la capacidad antioxidante in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) mediante extracción asistida por microondas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(1), 42–50. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000100005
- Qi, M., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62(6), 1110–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb12224.x>
- Quinga Paucar, M. (2017). *Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata* L.) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RPUHPLC*. Universidad Técnica de Ambato.
- Quinteros, M., Vilcacundo, R., Carpio, C., & Carrillo, W. (2016). Isolation of proteins from sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) in presence of water and salt. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 193–196.
- Ramírez, L., & Diaz, H. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*, 33, 0122-1701.
- Ramirez, L. S., & Diaz, H. E. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*, 1(33). <https://doi.org/10.22517/23447214.6151>
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Ramírez Ortiz, M. E., Rodríguez-Canto, W., Corzo-Rios, L. J., Gallegos-Tintoré, S., Betancur, D., & Chel-Guerrero, L. (2015). Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional.

- In *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos* (pp. 91–138). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.289>
- Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
- Rivera, M. (2006). *Obtención, Caracterización Estructural Y Determinación De Las Propiedades Funcionales De Un Aislado Proteico De Quinua*. Tesis Universidad de Chile. Universidad de Chile.
- 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.
- Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramírez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. Biomedical Research International. *Biomedical Research International*, 1–11.
- Sathe, S. K. (2002). Dry bean Protein Functionality. In *Biotech* (Vol. 22, pp. 175–223).
- Secretaría de Estado de Agricultura, (SEA). (2007). Cadena Agroalimentaria de Habichuelas. Retrieved from <http://legacy.iica.int/Esp/regiones/caribe/repDominicana/Documents/CadenasAgroalimentarias/CadenaAgroalimentariadeHabichuelas.pdf>
- Setty, A. R., & Sigal, L. H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34(6), 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2005.01.011>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *AOAC International*, 91(4), 914–931.
- Sigma-Aldrich. (2017). 2-Mercaptoethanol for molecular biology, for electrophoresis, suitable for cell culture, BioReagent, 99% (GC/titration) | Sigma-Aldrich. Retrieved March 26, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m3148?lang=en®ion=EC>
- Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., & Birch, A. N. E. (1989). Legume Seeds: the Defences of Wild and Cultivated Species of Phaseolus Against Attack by Bruchid Beetles. *Annals of Botany*, 63(1), 177–184. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087721>
- Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379–396. <https://doi.org/10.1007/BF02887079>
- Sitohy, M., & Osman, A. (2010). Antimicrobial activity of native and esterified legume proteins against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Food Chemistry*, 120(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.071>

- Sudhahar, V., & Fukai, T. (2014). Antioxidant Supplementation and Therapies (pp. 183–209). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0679-6_11
- Tejeda, E. (1988). Precipitación. In *Bioseparaciones. Procesos industriales de separación* (p. 54). Retrieved from http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/tejeda_cap_9.pdf
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S., & Encabo, R. R. (2010). The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103(4), 569–574. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992157>
- Universidad Nacional de Quilmes. (2008). Extracción y cuantificación de proteínas. *Manual de Prácticas: Introducción a La Biología Celular y Molecular*.
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.10.021>
- Vallejo, F., & Estrada, E. (2004). Producción de hortalizas de clima cálido. Cali, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M. del M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Información Tecnológica*, 52(2), 127–131.
- Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 411–416. <https://doi.org/10.1021/jf9806964>
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., & Marcone, M. F. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.028>
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., & Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 1027–1038. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00085-X)
- Yepes, A. (1987). Mejoramiento de habichuela en el Ecuador. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

ANEXOS

ANEXO A

**DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO DE
LOS AISLADOS PROTEICOS**

Tabla 11. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pH de precipitación.

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	5,005	5,002	5,004
	w FINAL (g)	0,894	1,046	0,995
	%R	17,862	20,911	19,881
pH 4	w INICIAL (g)	5,005	5,003	5,002
	w FINAL (g)	0,528	0,570	0,487
	%R	10,555	11,391	9,728
pH 5	w INICIAL (g)	5,002	5,001	5,003
	w FINAL (g)	0,894	1,046	0,995
	%R	17,872	20,917	19,886
pH 6	w INICIAL (g)	5,002	5,002	5,002
	w FINAL (g)	1,392	1,368	1,380
	%R	27,830	27,355	27,595

Tabla 12. Rendimiento (ANOVA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	435.659	3	145.220	104.662	.000
Dentro de grupos	11.100	8	1.388		
Total	446.759	11			

Tabla 13. Prueba de Comparación (Tukey)

HSD Tukey^a

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	10.5580		
3	3		19.5513	
5	3		19.5567	
6	3			27.5867
Sig.		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 14. Rendimiento de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación (%) (Mejor tratamiento)

	X	S²	S	DSR
pH3	19,55 ^a	2,41	1,55	8%
pH 4	10,56 ^b	0,69	0,83	8%
pH 5	19,56 ^a	2,40	1,55	8%
pH 6	27,59 ^c	0,06	0,24	1%

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de los aislados proteicos de habichuela obtenidos a diferentes pH de precipitación.

ANEXO B

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS AISLADOS PROTEICOS

Tabla 15. Datos para la construcción de la curva estándar albúmina de suero bovina (BSA)

Concentración de BSA mg/g (ml)	Absorbancia
0,00	0,000
3,59	0,110
7,72	0,243
11,84	0,372
15,63	0,494

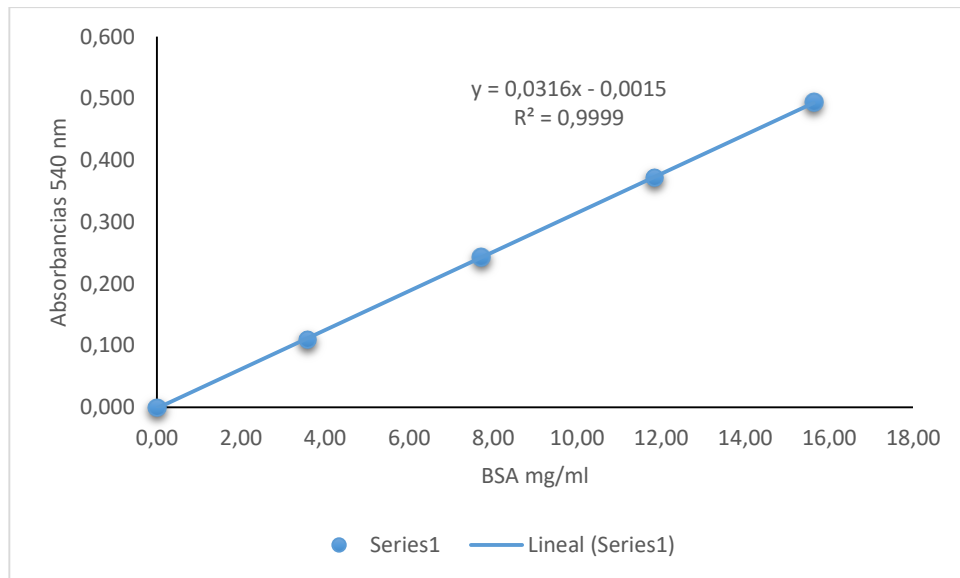


Figura. 16 Curva estándar de BSA

Ecuación obtenida de la curva de calibración:

$$A = m * C + B$$

A: Absorbancia

m: Pendiente de la ecuación de calibración

C: Concentración (mg/ml)

B: Interacción del valor de la absorbancia

Tabla 16. Valores de absorbancia de los aislados proteicos de habichuela medidos a 540 nm

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	0,173	0,169	0,190	0,173
R2	0,176	0,173	0,192	0,180
R3	0,167	0,166	0,185	0,171
R4	0,162	0,170	0,193	0,174

Tabla 17. Cálculo del contenido proteico (%) de aislados proteicos de habichuela (mejor tratamiento)

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	53,77	57,09	62,52	56,52
R2	54,69	58,43	63,18	58,79
R3	52,48	57,26	60,90	55,34
R4	50,92	58,63	63,51	56,30
X	52,96 ^a	57,85 ^b	62,53 ^c	56,74 ^b
S	1,64	0,79	1,16	1,46
cv	0,031	0,013	0,018	0,026

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el % de pureza de los aislados obtenidos a diferentes pH de precipitación

Tabla 18. Contenido Proteico (ANOVA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	186.184	3	62.061	36.586	.000
Dentro de grupos	20.356	12	1.696		
Total	206.539	15			

Tabla 19. Comparación entre pH de precipitación (Test Tukey)

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3	4	52.9650		
6	4		56.7375	
4	4		57.8525	
5	4			62.5275
Sig.		1.000	.632	1.000

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

**DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA DE LOS AISLADOS E HODROLIZADOS
PROTEICOS**

Tabla 20. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria obtenidas de los aislados proteicos de Habichuela

	Concentración	Réplicas			Promedio	Desv. Estándar	CV	
		R 1	R 2	R 3				
pH	3	100 µg/ml	2,71%	2,56%	2,36%	2,54%	0,18%	6,93%
		200 µg/ml	4,42%	3,92%	3,67%	4,00%	0,38%	9,59%
		500 µg/ml	8,64%	8,04%	7,73%	8,14%	0,46%	5,66%
		1000 µg/ml	10,80%	10,35%	10,05%	10,40%	0,38%	3,65%
	4	100 µg/ml	4,34%	4,48%	3,90%	4,24%	0,30%	7,18%
		200 µg/ml	7,65%	7,40%	7,01%	7,36%	0,32%	4,34%
		500 µg/ml	12,96%	12,52%	12,18%	12,55%	0,39%	3,11%
		1000 µg/ml	18,07%	17,54%	16,95%	17,52%	0,56%	3,20%
	5	100 µg/ml	6,31%	5,81%	5,36%	5,82%	0,48%	8,23%
		200 µg/ml	11,67%	10,99%	10,60%	11,09%	0,54%	4,89%
		500 µg/ml	16,63%	16,35%	15,90%	16,29%	0,37%	2,27%
		1000 µg/ml	21,93%	21,53%	21,14%	21,53%	0,39%	1,83%
6	100 µg/ml	2,64%	2,49%	1,89%	2,34%	0,39%	16,89%	
	200 µg/ml	5,72%	5,47%	5,07%	5,42%	0,33%	6,02%	
	500 µg/ml	11,14%	10,69%	10,34%	10,72%	0,40%	3,72%	
	1000 µg/ml	16,36%	15,81%	15,22%	15,80%	0,57%	3,62%	

Tabla 21. ANOVA para Actividad por pH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	117,648	3	39,216	1,22	0,3437
Intra grupos	384,676	12	32,0563		
Total (Corr.)	502,324	15			

La tabla ANOVA descompone la varianza del % Actividad Antiinflamatoria en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1,22335, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % Actividad Antiinflamatoria entre un nivel de pH de precipitación y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 22. Medias para Actividad por pH con intervalos de confianza del 95,0%

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i> <i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
3	4	6,27	2,83091	1,90853	10,6315
4	4	10,4175	2,83091	6,05603	14,779
5	4	13,6825	2,83091	9,32103	18,044
6	4	8,57	2,83091	4,20853	12,9315
Total	16	9,735			

Esta tabla muestra la media de % Actividad Antiinflamatoria para cada nivel de pH de precipitación. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Están contruidos de tal forma que si todas las medias son iguales, todos los intervalos se traslaparán 95,0% de las veces.

Tabla 23. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria del patrón positivo y del pH 5 de acuerdo al contenido proteico.

	Concentración	Réplicas			Promedio	Desv. Estándar	CV
		R 1	R 2	R 3			
pH 5 (Mejor Tratamiento)	100 µg/ml	13,95%	13,27%	12,93%	13,38%	0,52%	3,88%
	200 µg/ml	17,18%	16,55%	16,21%	16,65%	0,49%	2,94%
	500 µg/ml	19,33%	18,88%	18,25%	18,82%	0,54%	2,87%
	1000 µg/ml	26,08%	25,40%	25,00%	25,49%	0,54%	2,14%
Control (Diclofenaco)	100 µg/ml	35,03%	31,80%	29,60%	32,14%	2,73%	8,50%
	200 µg/ml	50,15%	67,35%	66,19%	61,23%	9,61%	15,69%
	500 µg/ml	66,18%	81,95%	79,40%	75,85%	8,46%	11,16%
	1000 µg/ml	91,00%	105,14%	103,86%	100,00%	7,82%	7,82%

Tabla 24. Análisis de Varianza para % Actividad Antiinflamatoria - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH5 y Control	14240,9	1	14240,9	487,29	0,0000
B:Concentraciones	5008,21	3	1669,4	57,12	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2472,92	3	824,306	28,21	0,0000
RESIDUOS	467,591	16	29,2244		
TOTAL (CORREGIDO)	22189,6	23			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Actividad Antiinflamatoria en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % Actividad Antiinflamatoria con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 25. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Diclofenaco y pH 5

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>pH5 y Control</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A1	12	18,5858	1,56057	X
A2	12	67,3042	1,56057	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A1 - A2	*	-48,7183	4,67859

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Concentraciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B1	6	22,7633	2,20698	X
B2	6	38,9383	2,20698	X
B3	6	47,3317	2,20698	X
B4	6	62,7467	2,20698	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
B1 - B2	*	-16,175	8,93372
B1 - B3	*	-24,5683	8,93372
B1 - B4	*	-39,9833	8,93372
B2 - B3		-8,39333	8,93372
B2 - B4	*	-23,8083	8,93372
B3 - B4	*	-15,415	8,93372

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

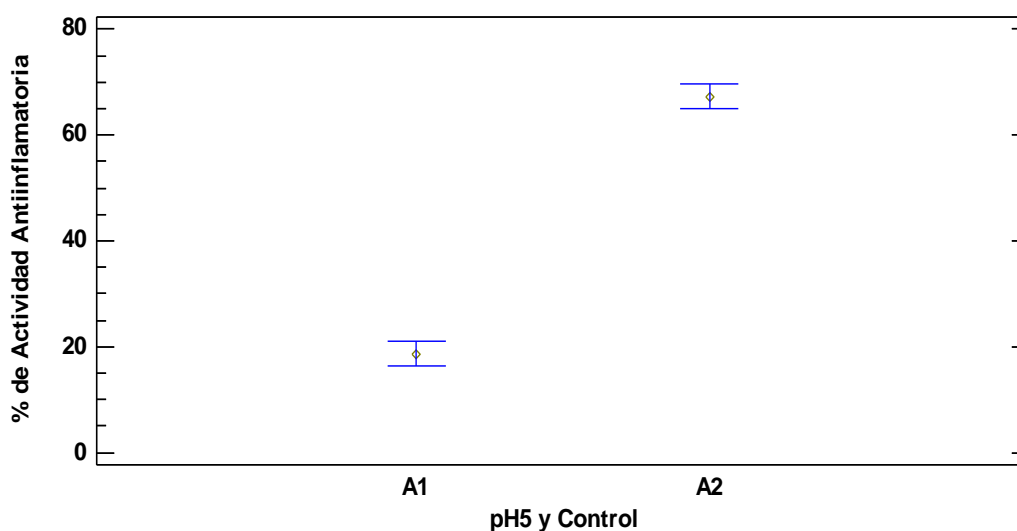


Figura. 17 Medias del Diclofenaco y pH 5

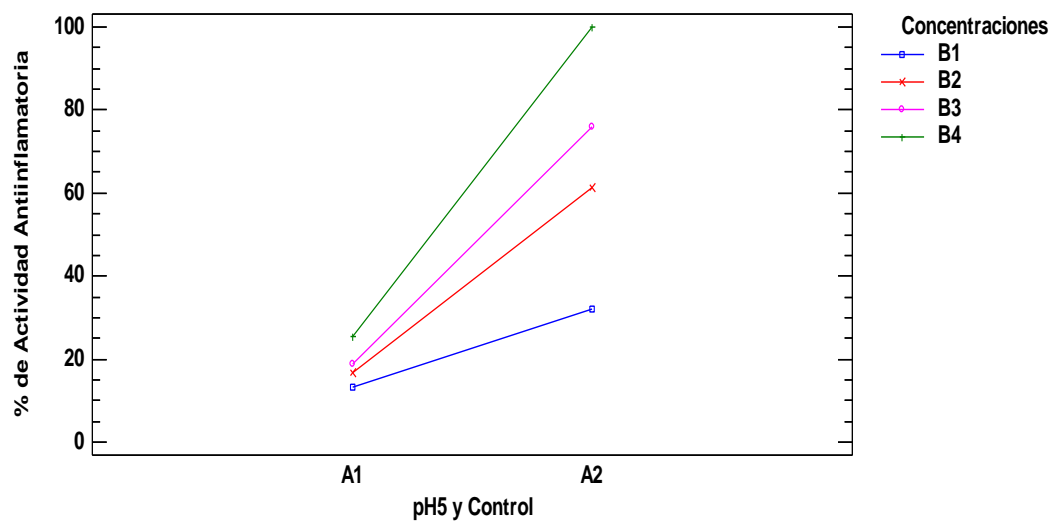


Figura. 18 Interacción del Diclofenaco y pH 5

Tabla 27. Porcentaje de la Actividad Antiinflamatoria del patrón positivo y del Hidrolizado proteico.

	Concentración	Réplicas			Promedio	Desv. Estándar	CV
		R 1	R 2	R 3			
Hidrolizado	100 µg/ml	7,58%	6,92%	6,53%	7,01%	0,53%	7,53%
	200 µg/ml	14,50%	13,34%	13,12%	13,66%	0,74%	5,40%
	500 µg/ml	21,53%	20,59%	19,38%	20,50%	1,07%	5,24%
	1000 µg/ml	31,58%	30,97%	29,32%	30,62%	1,17%	3,81%
Control (Diclofenaco)	100 µg/ml	35,03%	31,80%	29,60%	32,14%	2,73%	8,50%
	200 µg/ml	50,15%	67,35%	66,19%	61,23%	9,61%	15,69%
	500 µg/ml	66,18%	81,95%	79,40%	75,85%	8,46%	11,16%
	1000 µg/ml	91,00%	105,14%	103,86%	100,00%	7,82%	7,82%

Tabla 28. Análisis de Varianza para % Actividad Antiinflamatoria - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hidrolizado y Control	15386,5	1	15386,5	523,83	0,0000
B:Concentraciones	5952,58	3	1984,19	67,55	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1877,57	3	625,857	21,31	0,0000
RESIDUOS	469,965	16	29,3728		
TOTAL (CORREGIDO)	23686,6	23			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Actividad Antiinflamatoria en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % Actividad Antiinflamatoria con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 29. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Diclofenaco y pH 5

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Hidrolizado y Control	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A1	12	16,6642	1,56452	X
A2	12	67,3042	1,56452	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	-50,64	4,69045

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos para % Actividad Antiinflamatoria por Concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	6	19,5767	2,21257	X
B2	6	37,4417	2,21257	X
B3	6	48,1717	2,21257	X
B4	6	62,7467	2,21257	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-17,865	8,95637
B1 - B3	*	-28,595	8,95637
B1 - B4	*	-43,17	8,95637
B2 - B3	*	-10,73	8,95637
B2 - B4	*	-25,305	8,95637
B3 - B4	*	-14,575	8,95637

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte

superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

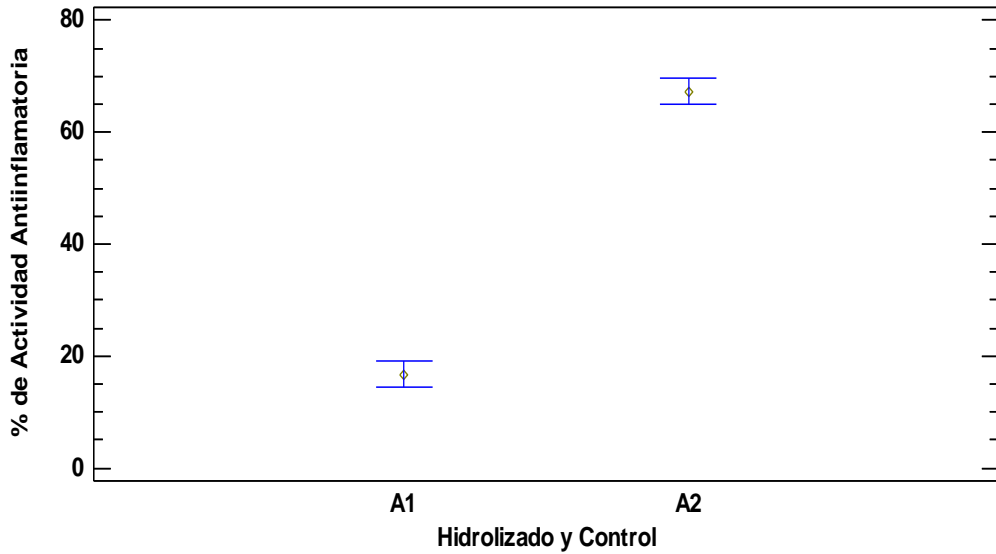


Figura. 19 Medias del Diclofenaco e Hidrolizado

Gráfico de Interacciones

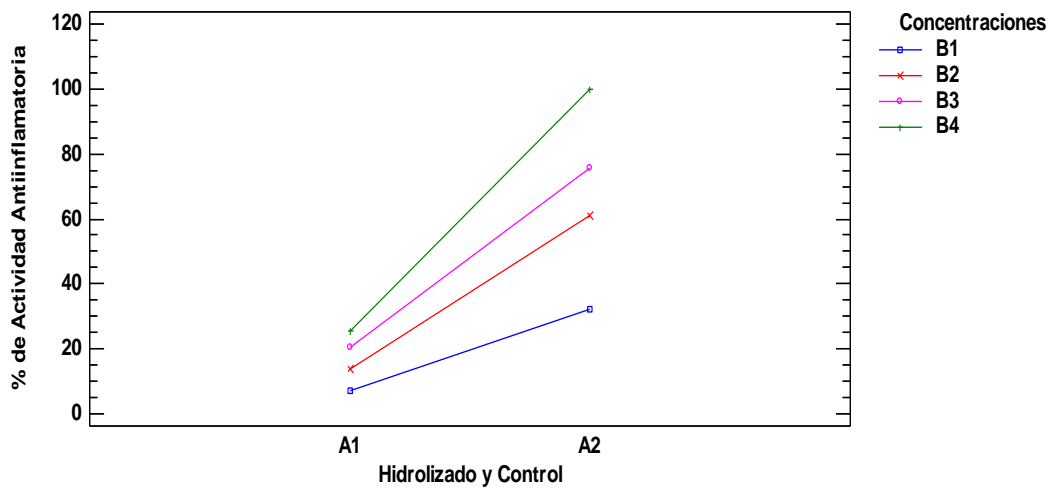


Figura. 20 Interacción del Diclofenaco e Hidrolizado

ANEXO D

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AISLADOS E HODROLIZADOS PROTEICOS

Tabla 31. Porcentaje de Actividad Antioxidante obtenidas de los aislados proteicos de Habichuela

	Concentraci ^o n	Réplicas				Promedi ^o	Desv. Estándar	CV	
		R 1	R 2	R 3	R 4				
pH	3	100 µg/ml	11,54%	11,06%	10,58%	10,10%	10,82%	0,62%	5,74%
		200 µg/ml	16,35%	16,11%	15,38%	14,90%	15,69%	0,66%	4,22%
		500 µg/ml	24,28%	23,08%	21,39%	20,43%	22,30%	1,72%	7,69%
		1000 µg/ml	31,73%	29,81%	29,57%	28,85%	29,99%	1,23%	4,11%
	4	100 µg/ml	15,61%	14,03%	13,57%	12,67%	13,97%	1,23%	8,81%
		200 µg/ml	20,36%	19,46%	19,00%	17,65%	19,12%	1,13%	5,92%
		500 µg/ml	26,70%	23,98%	23,08%	21,49%	23,81%	2,18%	9,16%
		1000 µg/ml	33,71%	33,03%	32,13%	31,90%	32,69%	0,84%	2,56%
	5	100 µg/ml	16,75%	15,53%	15,29%	15,05%	15,66%	0,75%	4,82%
		200 µg/ml	20,43%	20,19%	19,23%	18,75%	19,65%	0,79%	4,04%
		500 µg/ml	26,70%	24,51%	23,54%	23,06%	24,45%	1,61%	6,60%
		1000 µg/ml	35,92%	34,22%	32,04%	30,58%	33,19%	2,36%	7,10%
	6	100 µg/ml	13,94%	13,70%	13,46%	12,50%	13,40%	0,63%	4,72%
		200 µg/ml	18,51%	17,31%	16,83%	16,59%	17,31%	0,86%	4,94%
		500 µg/ml	23,80%	22,84%	22,12%	21,63%	22,60%	0,94%	4,17%
		1000 µg/ml	34,38%	30,53%	28,85%	28,61%	30,59%	2,67%	8,71%

Tabla 32. ANOVA para Actividad por PH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	29,2641	3	9,75468	0,16	0,9215
Intra grupos	733,987	12	61,1656		
Total (Corr.)	763,251	15			

La razón-F, que en este caso es igual a 0,15948, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad entre un nivel de PH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 33. Porcentaje de la Actividad Antioxidante del patrón positivo y del pH 5 de acuerdo al contenido proteico.

	Concentración	Réplicas				Promedio	Desv. Estándar	CV
		R 1	R 2	R 3	R 4			
pH 5 (Mejor Tratamiento)	100 µg/ml	23,57%	21,29%	19,77%	19,01%	20,91%	2,01%	9,62%
	200 µg/ml	28,90%	27,76%	27,00%	23,19%	26,71%	2,47%	9,25%
	500 µg/ml	31,56%	30,80%	28,14%	27,00%	29,37%	2,16%	7,35%
	1000 µg/ml	39,16%	37,64%	34,60%	31,94%	35,84%	3,22%	8,98%
Control (BHT)	100 µg/ml	76,05%	72,24%	68,44%	66,54%	70,82%	4,22%	5,95%
	200 µg/ml	81,75%	79,85%	76,05%	70,34%	77,00%	5,03%	6,53%
	500 µg/ml	89,35%	85,55%	83,65%	77,95%	84,13%	4,75%	5,65%
	1000 µg/ml	98,86%	91,25%	89,35%	87,45%	91,73%	5,00%	5,45%

Tabla 34. Análisis de Varianza para % Inhibición lipídica - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:BHT y pH 5	20152,8	1	20152,8	1519,75	0,0000
B:Concentración	1666,66	3	555,553	41,90	0,0000
INTERACCIONES					
AB	14,0985	3	4,69951	0,35	0,0000
RESIDUOS	318,254	24	13,2606		
TOTAL (CORREGIDO)	22151,8	31			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Inhibición lipídica en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % Inhibición lipídica con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 35. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por BHT y pH 5

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>BHT y pH 5</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A2	16	30,7263	0,91037 7	X
A1	16	80,9169	0,91037 7	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A1 - A2	*	50,1906	2,65721

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 36. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por Concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B1	8	46,4337	1,28747	X
B2	8	52,5162	1,28747	X
B3	8	58,3788	1,28747	X
B4	8	65,9575	1,28747	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
B1 - B2	*	-6,0825	5,02403
B1 - B3	*	-11,945	5,02403
B1 - B4	*	-19,5238	5,02403
B2 - B3	*	-5,8625	5,02403
B2 - B4	*	-13,4413	5,02403
B3 - B4	*	-7,57875	5,02403

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

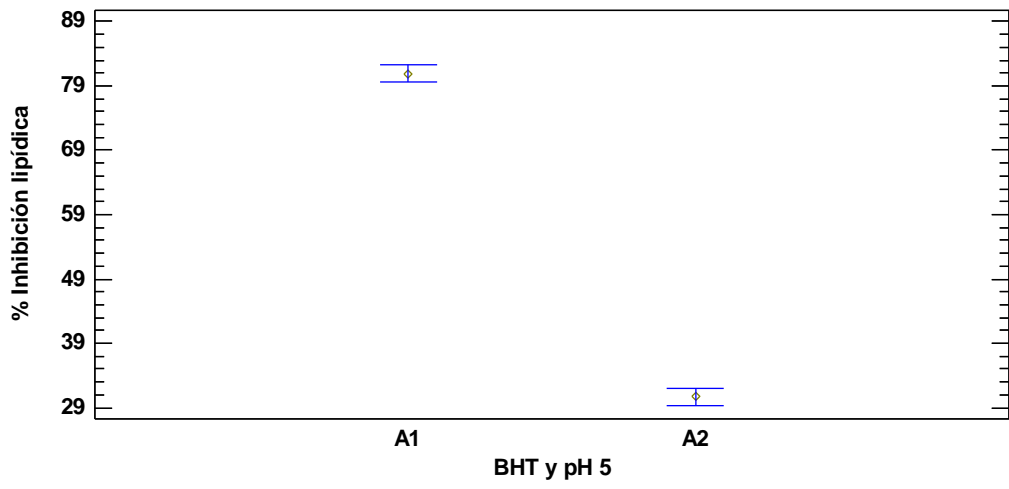


Figura. 21 Medias del BHT e pH 5

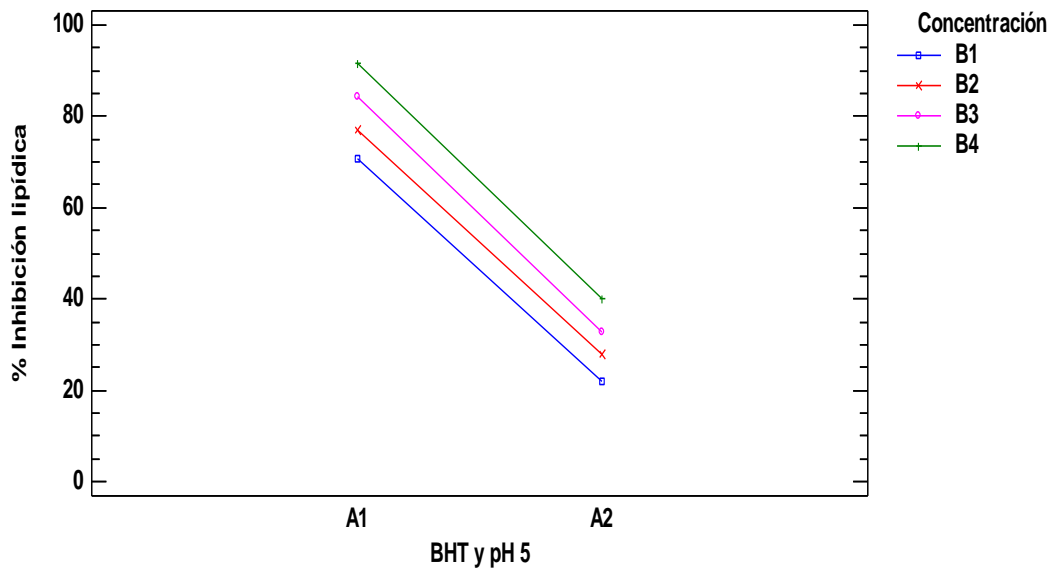


Figura. 22 Interacción del BHT y el pH 5

Tabla 37. Porcentaje de la Actividad Antioxidante del patrón positivo y el Hidrolizado proteico.

	Concentrac ión	Réplicas				Prome dio	Desv. Estándar	CV
		R 1	R 2	R 3	R 4			
Hidroliz ado	100 µg/ml	48,80%	44,31%	42,25%	40,76%	44,03%	3,50%	7,94%
	200 µg/ml	58,52%	55,34%	53,84%	51,79%	54,87%	2,83%	5,16%
	500 µg/ml	68,80%	63,94%	62,63%	58,33%	63,43%	4,31%	6,80%
	1000 µg/ml	80,77%	77,78%	76,47%	73,66%	77,17%	2,95%	3,82%
Control (BHT)	100 µg/ml	76,05%	72,24%	68,44%	66,54%	70,82%	4,22%	5,95%
	200 µg/ml	81,75%	79,85%	76,05%	70,34%	77,00%	5,03%	6,53%
	500 µg/ml	89,35%	85,55%	83,65%	77,95%	84,13%	4,75%	5,65%
	1000 µg/ml	98,86%	91,25%	89,35%	87,45%	91,73%	5,00%	5,45%

Tabla 38. Análisis de Varianza para % Inhibición lipídica - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:BHT e Hidrolizado	3542,29	1	3542,29	205,00	0,0000
B:Concentración	3176,62	3	1058,87	61,28	0,0000
INTERACCIONES					
AB	152,699	3	50,8996	2,95	0,0000
RESIDUOS	414,705	24	17,2794		
TOTAL (CORREGIDO)	7286,32	31			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de % Inhibición lipídica en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre % Inhibición lipídica con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 39. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por BHT e Hidrolizado

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>BHT e Hidrolizado</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A2	16	59,8744	1,03921	X
A1	16	80,9169	1,03921	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A1 - A2	*	21,0425	3,03325

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 40. Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición lipídica por Concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B1	8	57,4238	1,46967	X
B2	8	65,935	1,46967	X
B3	8	73,775	1,46967	X
B4	8	84,4488	1,46967	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
B1 - B2	*	-8,51125	5,73502
B1 - B3	*	-16,3512	5,73502
B1 - B4	*	-27,025	5,73502
B2 - B3	*	-7,84	5,73502
B2 - B4	*	-18,5138	5,73502
B3 - B4	*	-10,6738	5,73502

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

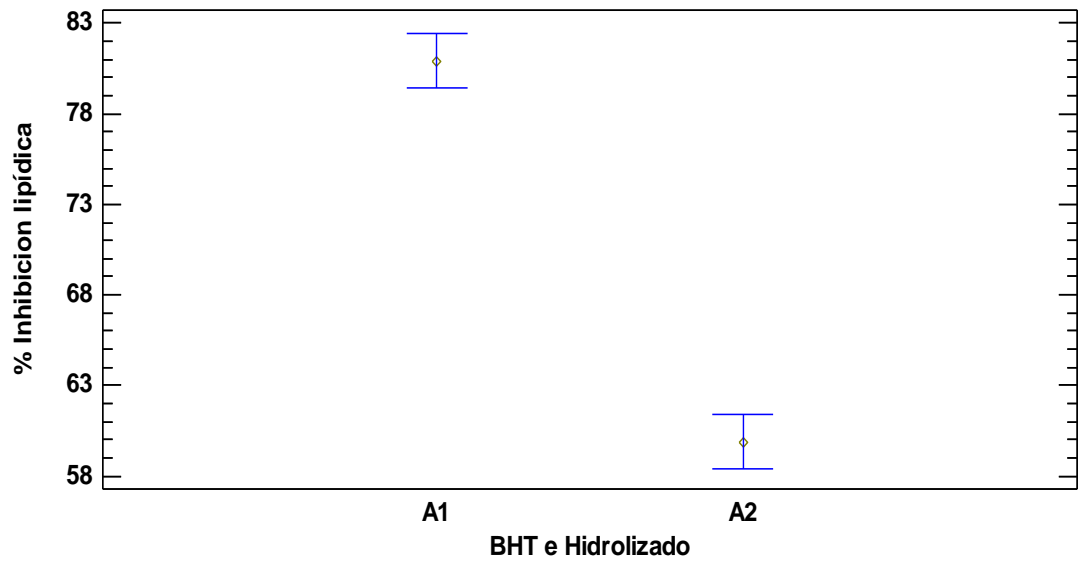


Figura. 23 Medias del BHT e pH 5

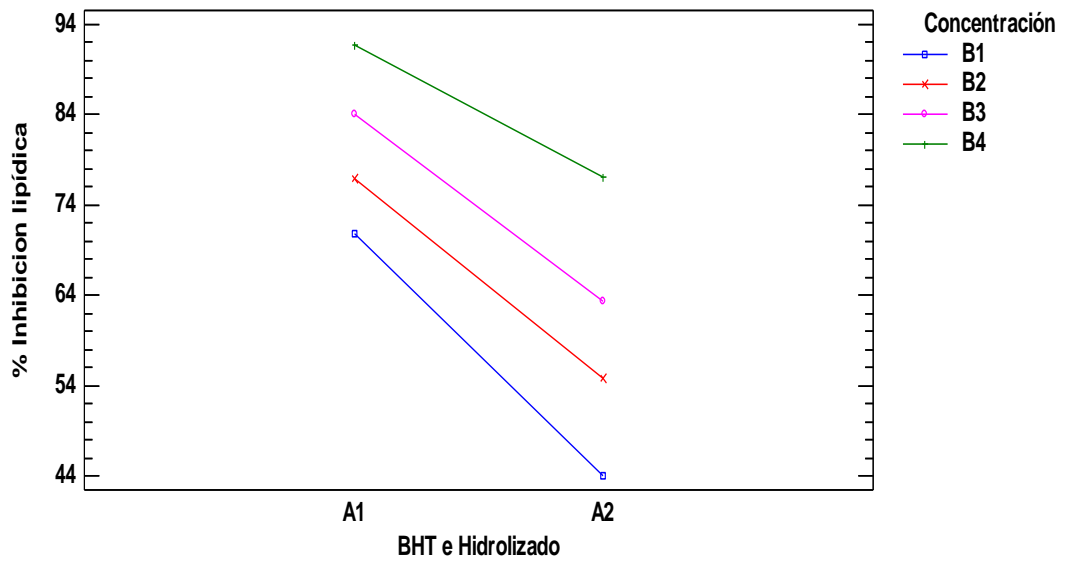


Figura. 24 Interacción del BHT y el pH 5

ANEXO E

**DATOS OBTENIDOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
AISLADOS E HODROLIZADOS PROTEICOS**

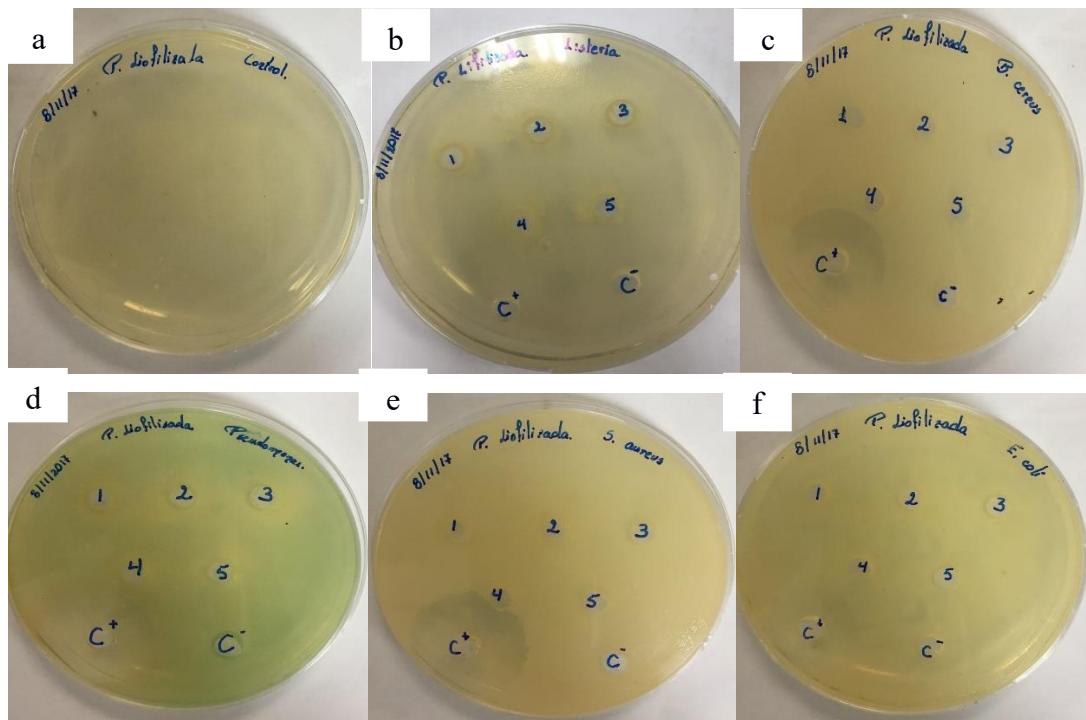


Figura. 25 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.

En el literal a se encuentra el control que no existe contaminación en el aislado; el literal b muestra el asilado contra *L. monocytogenes*; en el literal c muestra el asilado contra *B. cereus*; en el literal d muestra el asilado contra *P. aeruginosa*; en el literal e muestra el asilado contra *S. aureus*; en el literal f muestra el asilado contra *E. coli*

Tabla 41. Halos de inhibición del aislado proteico (Mejor Tratamiento).

		Réplicas	Concentración					Control	
			500 mg/ml	375 mg/ml	250 mg/ml	200 mg/ml	150 mg/ml	Positivo	Negativo
MICROORGANISMOS	<i>Escherichia coli</i>	R 1	--	--	--	--	--	24	--
		R 2	--	--	--	--	--	23	--
		R 3	--	--	--	--	--	24	--
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R 1	--	--	--	--	--	24	--
		R 2	--	--	--	--	--	26	--
		R 3	--	--	--	--	--	25	--
	<i>Listeria monocytogenes</i>	R 1	--	--	--	--	--	30	--
		R 2	--	--	--	--	--	29	--
		R 3	--	--	--	--	--	31	--
	<i>Bacillus cereus</i>	R 1	--	--	--	--	--	28	--
		R 2	--	--	--	--	--	27	--
		R 3	--	--	--	--	--	28	--

	<i>Staphylococcus aureus</i>	R 1	--	--	--	--	35	--
		R 2	--	--	--	--	36	--
		R 3	--	--	--	--	34	--

Las distancias están expresadas en milímetros (mm); el control positivo fue gentamicina (500 µg/ml) y como control negativo se utilizó agua estéril.

El diámetro de los pocillos fue de 6 mm.

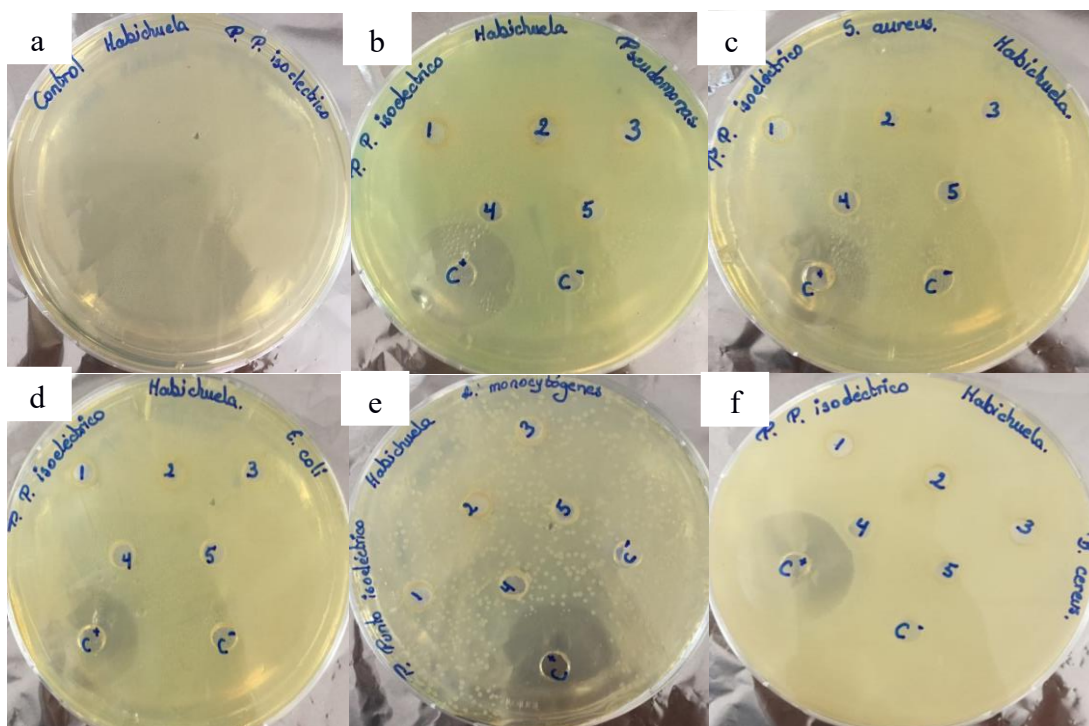


Figura. 26 Actividad Antimicrobiana del aislado proteico obtenido a pH 5.

En el literal a se encuentra el control que no existe contaminación en el aislado; el literal b muestra el asilado contra *P. aeruginosa*; en el literal c muestra el asilado contra *S. aureus*; en el literal d muestra el asilado contra *E. coli*; en el literal e muestra el asilado contra *L. monocytogenes*; en el literal f muestra el asilado contra *B. cereus*.

Tabla 42. Halos de inhibición del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento).

		Réplicas	Concentración					Control	
			500 mg/ml	375 mg/ml	250 mg/ml	200 mg/ml	150 mg/ml	Positivo	Negativo
MICROORGANISMOS	<i>Escherichia coli</i>	R 1	19	16	12	--	--	24	6
		R 2	19	16	13	--	--	23	--
		R 3	18	15	12	--	--	24	--
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R 1	12	10	8	--	--	24	--
		R 2	13	10	9	--	--	26	--
		R 3	12	11	8	--	--	25	--
	<i>Listeria monocytogenes</i>	R 1	18	16	14	--	--	30	--
		R 2	19	16	14	--	--	29	--
		R 3	18	17	13	--	--	31	--
	<i>Bacillus cereus</i>	R 1	9	7	--	--	--	28	--
		R 2	9	8	--	--	--	27	--
		R 3	8	7	--	--	--	28	--
	<i>Staphylococcus aureus</i>	R 1	--	--	--	--	--	35	--
		R 2	--	--	--	--	--	36	--
		R 3	--	--	--	--	--	34	--

Los valores presentados en la tabla representan las 3 mediciones de los diámetros de inhibición. Las distancias están expresadas en milímetros (mm); el control positivo fue gentamicina (500 µg/ml) y como control negativo se utilizó agua estéril. El diámetro de los pocillos fue de 6 mm.

Tabla 43. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente *L. monocytogenes* (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	32,8889	2	16,4444	49,33	0,0002
Intra grupos	2,0	6	0,333333		
Total (Corr.)	34,8889	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halos de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 49,3333, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halos de inhibición (mm) entre un nivel de Concentración (mg/ml) y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

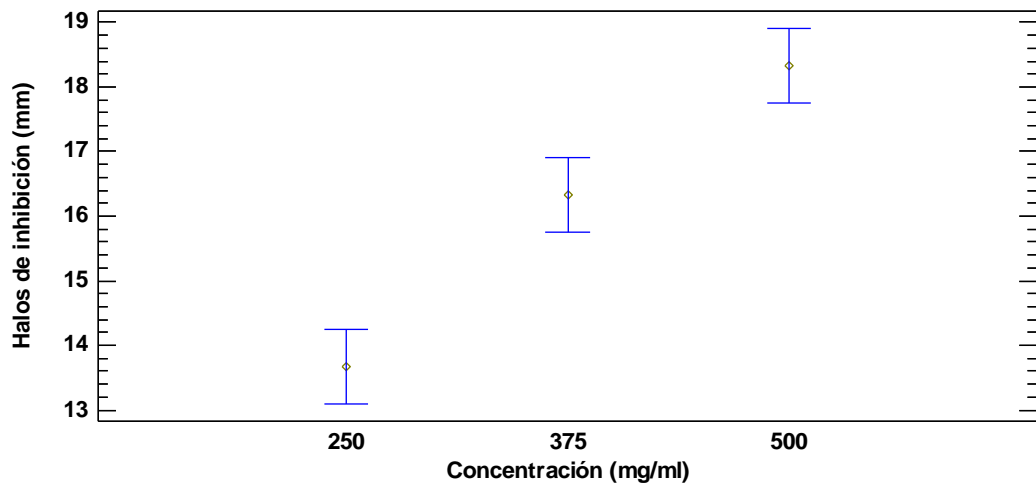


Figura. 27 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente *L. monocytogenes* a diferentes concentraciones.

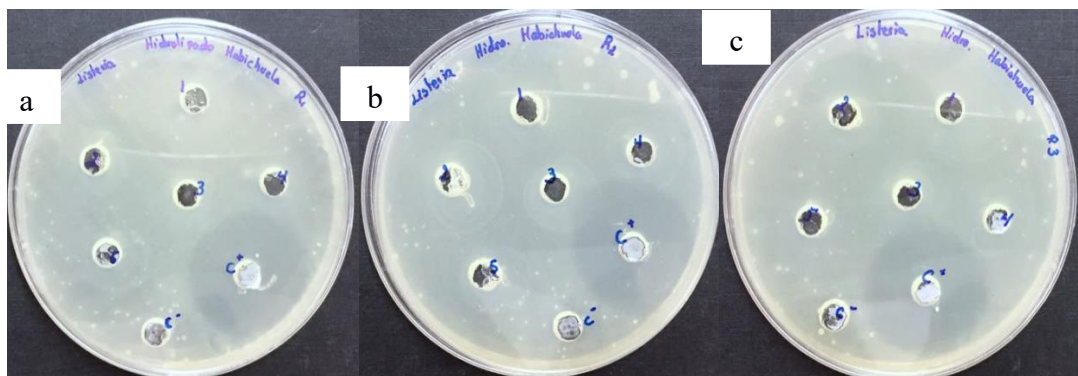


Figura. 28 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente *L. monocytogenes*.

En esta figura se muestra el hidrolizado proteico del mejor tratamiento frente a la bacteria *L. monocytogenes*; en el literal a se encuentra la réplica 1; en el literal b la réplica 2 y en el literal c se muestra la réplica 3.

Tabla 44. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente *E. coli*. (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	60,2222	2	30,1111	90,33	0,0000
Intra grupos	2,0	6	0,333333		
Total (Corr.)	62,2222	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halos de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 90,3333, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos.

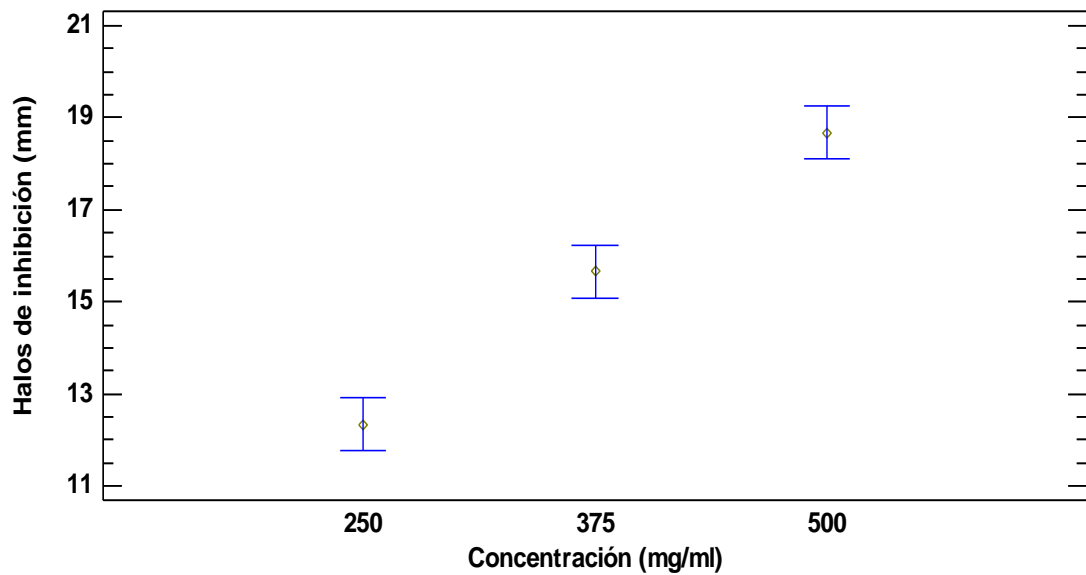


Figura. 29 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente *E. coli* a diferentes concentraciones.

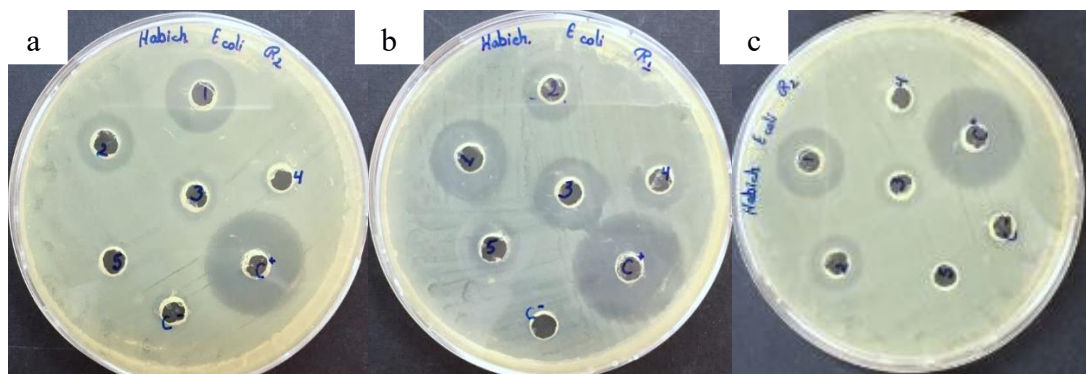


Figura. 30 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a *E. coli*.

En esta figura se muestra el hidrolizado proteico del mejor tratamiento frente a la bacteria *E. coli*; en el literal a se encuentra la réplica 1; en el literal b la réplica 2 y en el literal c se muestra la réplica 3.

Tabla 45. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente *P. aeruginosa* (ANOVA).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	24,0	2	12,0	36,00	0,0005
Intra grupos	2,0	6	0,333333		
Total (Corr.)	26,0	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halos de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 36,0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halos de inhibición (mm) entre un nivel de Concentración (mg/ml) y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

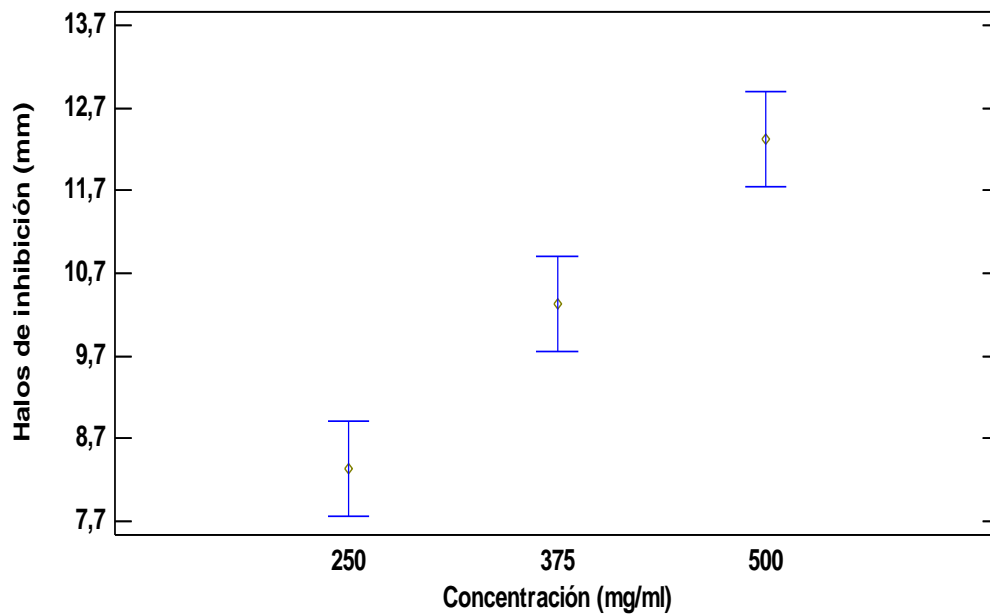


Figura. 31 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones.

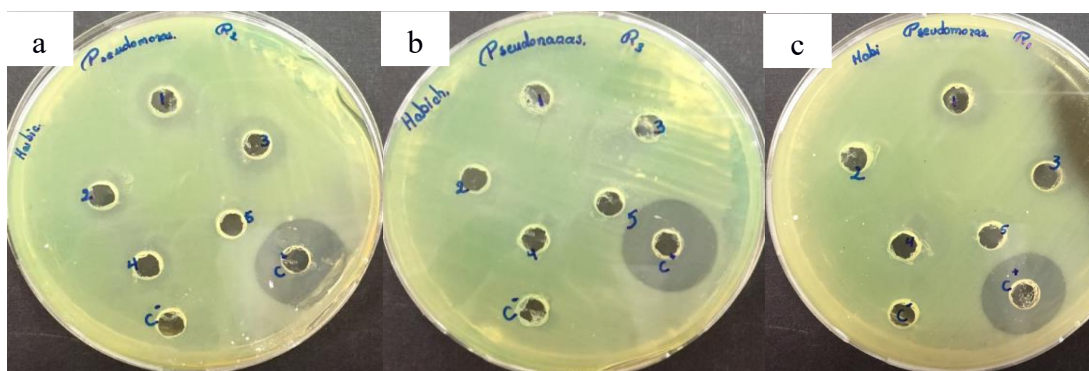


Figura. 32 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a *P. aeruginosa*.

En esta figura se muestra el hidrolizado proteico del mejor tratamiento frente a la bacteria *P. aeruginosa*; en el literal a se encuentra la réplica 1; en el literal b la réplica 2 y en el literal c se muestra la réplica 3.

Tabla 46. Actividad antimicrobiana de los halos de inhibición del hidrolizado proteico frente *B. cereus* (ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,0	1	6,0	18,00	0,0132
Intra grupos	1,33333	4	0,333333		
Total (Corr.)	7,33333	5			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Halos de inhibición (mm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 18,0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halos de inhibición (mm) entre un nivel de Concentración (mg/ml) y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

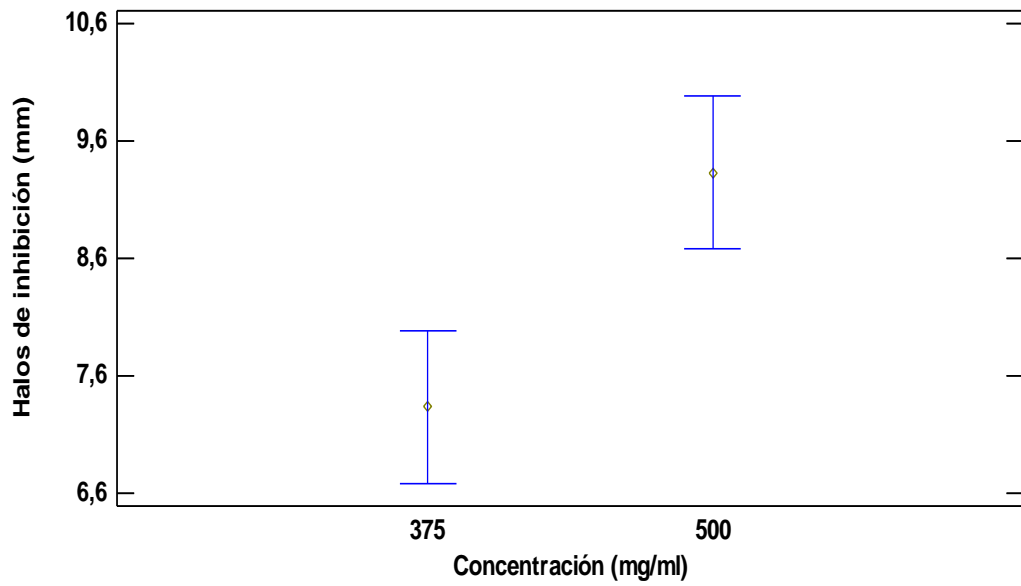


Figura. 33 Medias de la Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico frente *B. cereus* a diferentes concentraciones.

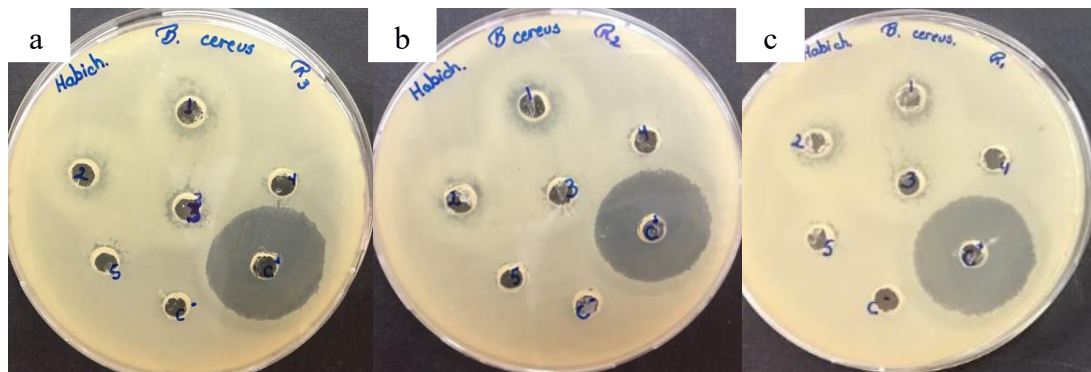


Figura. 34 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a *B. cereus*.

En esta figura se muestra el hidrolizado proteico del mejor tratamiento frente a la bacteria *B. cereus*; en el literal a se encuentra la réplica 1; en el literal b la réplica 2 y en el literal c se muestra la réplica 3.

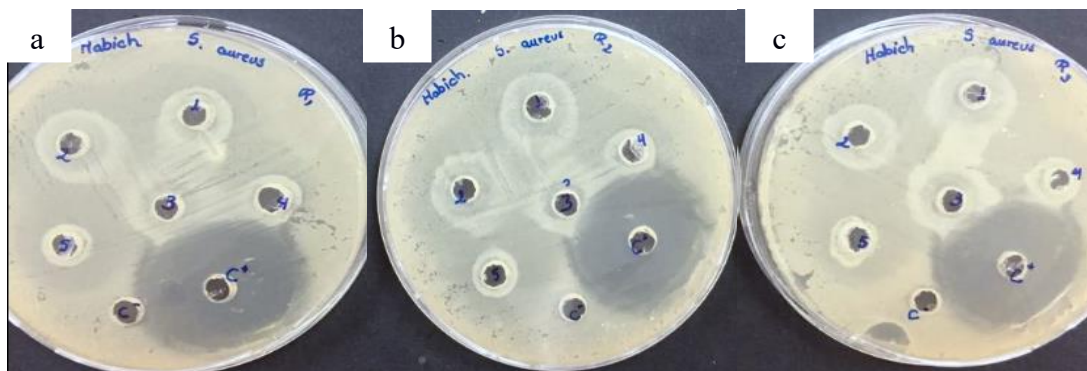


Figura. 35 Actividad Antimicrobiana del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento) frente a *S. aureus*.

En esta figura se muestra el hidrolizado proteico del mejor tratamiento frente a la bacteria *S. aureus*; en el literal a se encuentra la réplica 1; en el literal b la réplica 2 y en el literal c se muestra la réplica 3.

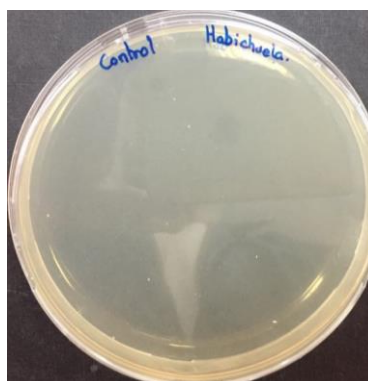


Figura. 36 Control del hidrolizado proteico (Mejor tratamiento).

En esta figura se muestra el control del hidrolizado proteico del mejor tratamiento, evidenciándose claramente que no existe contaminación.

ANEXO F
FOTOGRAFÍAS

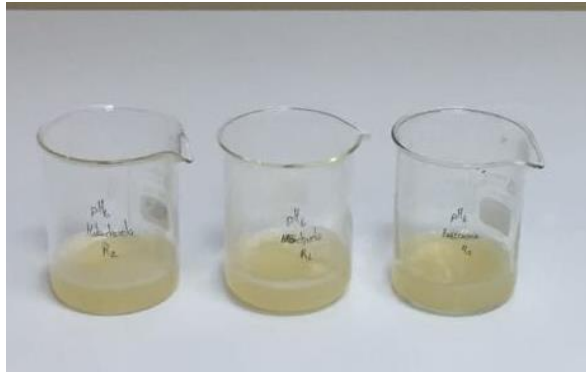


Figura. 37 Precipitación de proteínas.

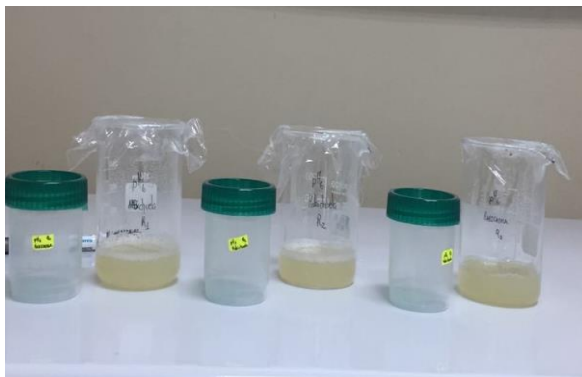


Figura. 38 Almacenamiento de las muestras.

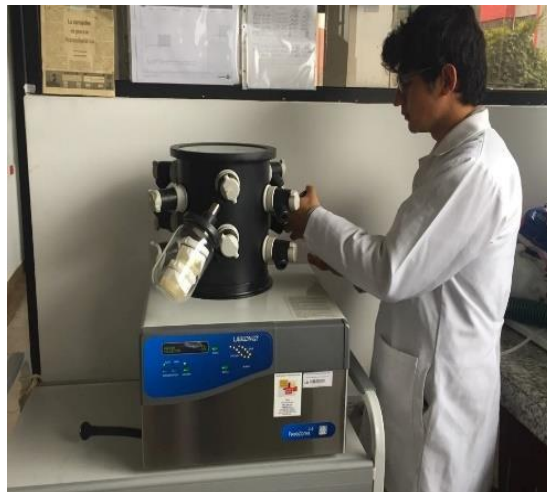


Figura. 39 Liofilización de las muestras.



Figura. 40 Pesaje de las muestras.



Figura. 41 Preparación de las muestras Digestión gástrica y duodenal.

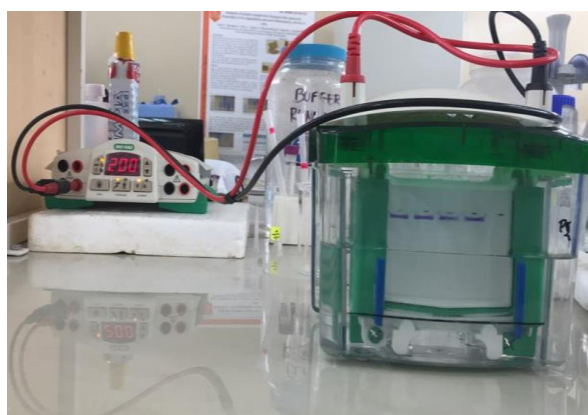


Figura. 42 Electroforesis SDS-PAGE.



Figura. 43 Oxidación del Aceite de oliva.



Figura. 44 Inoculación del hidrolizado proteico.