



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



Tema: Determinación de actividad antiinflamatoria y antimicrobiana en concentrados e hidrolizados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad tunkahuan y fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Autor: Angel Leonel Morales Manzano

Tutor: Lcdo. Paulo Santiago Baquero Icaza M. Sc

Ambato – Ecuador

Diciembre 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lcdo. Paulo Santiago Baquero Icaza M. Sc

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, 30 de octubre de 2018



Lcdo. Paulo Santiago Baquero Icaza M. Sc.

C.I.: 1803233541

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Angel Leonel Morales Manzano, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas.



Angel Leonel Morales Manzano

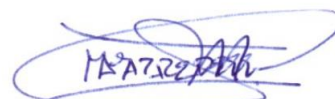
CI: 1804972212

AUTOR

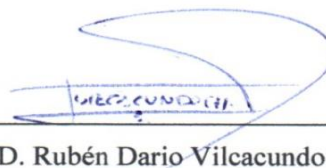
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman,



Presidente del Tribunal



Ph.D. Rubén Dario Vilcacundo Chamorro
C.I. 1802738102



Lcda. M. Sc. Danae Fernández Rivero
C.I. 1757181209

Ambato, 05 de diciembre de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él, como 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 Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo su reproducción parcial o total 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.



Angel Leonel Morales Manzano

CI: 1804972212

AUTOR

DEDICATORIA

A DIOS, por regalarme la vida, la fuerza para luchar día a día en cada una de mis metas y la gran familia que me acompaña siempre.

A mis padres Ángel Morales y Ana Manzano quienes son mi ejemplo de lucha, perseverancia, coraje, valentía, quienes confiaron en mí siempre y nunca me dejaron solo en este largo camino.

A mi hermana Keyla Morales, quien implantó felicidad en mi vida a pesar de los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, que con sus bendiciones iluminó mi vida, nunca me desamparó y siempre me dio una razón para seguir luchando.

A mis padres Ángel y Anita quienes, con sus palabras de aliento, sus consejos y su apoyo no dejaron que desista de esta gran meta, ellos son la principal motivación.

A mi hermana Keyla, quien se convirtió en mi apoyo y me regaló felicidad a pesar de los momentos difíciles.

A mis abuelitos Aníbal Manzano y Fanny Cruz que con sus consejos me motivaron a seguir adelante luchando por un futuro mejor.

A mis tías, tíos, primos y primas que me ayudaron a confiar en mí con sus consejos y apoyo incondicional.

A mi novia quien me apoyó y siempre confió en mí a pesar de los problemas y adversidades que se presentaron en este difícil, pero gratificante camino.

A mis amigos gracias por sus consejos, enseñanzas, palabras de aliento, paciencia y por todos los momentos compartidos.

Al Ing. Paulo Baquero por la confianza depositada en mí, por su tiempo y la dedicación prestada en el presente trabajo.

A la Universidad Técnica de Ambato que por medio de la Facultad de Ciencia en Ingeniería en Alimentos me brindaron excelentes conocimientos a través de la enseñanza con docentes de calidad.

Agradezco a todos y cada uno de ustedes por su tiempo que es lo más valioso que me pueden haber regalado.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.2 Hipótesis.....	4
1.2.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol o quinua.....	4
1.2.2 Cuantificación de proteína de fréjol o quinua.	4
1.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante de quinua.	4
1.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de fréjol o quinua.....	4
1.2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fréjol o quinua.	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo Principal	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO II	6
MATERIALES Y MÉTODO	6
2.1 Materiales.....	6
2.1.1 Materia prima.....	6
2.1.2 Materiales e insumos.....	6
2.1.3 Equipos.....	7
2.1.4 Reactivos	7
2.2 Método	8
2.2.1 Obtención, rendimiento y cuantificación de concentrados e hidrolizados proteicos.	8
2.2.1.1 Elaboración de la harina.....	8
2.2.1.2 Desengrasado de la harina.....	8
2.2.1.3 Obtención de concentrados proteicos.....	8
2.2.1.4 Rendimiento de los concentrados proteicos.....	9
2.2.1.5 Cuantificación proteica.	9
2.2.1.6 Obtención de hidrolizados proteicos	11
2.2.2 Electroforesis SDS-PAGE y Native- PAGE:.....	12
2.2.3 Actividades biológicas	13
2.2.3.2 Actividad antiinflamatoria	15

2.2.3.3 Actividad antimicrobiana	17
2.2.4 Diseño experimental y Análisis estadístico:	18
CAPÍTULO III	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1 Análisis y discusión de resultados.....	20
3.1.2 Cuantificación de los concentrados proteicos	22
3.1.4 Caracterización por electroforesis Native- PAGE y SDS-PAGE.	26
3.1.4.1 Caracterización electroforética de fréjol rojo moteado	26
3.1.4.2 Caracterización electroforética de quinua Tunkahuan.....	28
3.1.4.3 Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE.....	32
3.1.5 Actividades biológicas	33
3.1.5.1 Actividad antioxidante	33
3.1.5.1.1 Quinua Tunkahuan mediante el método TBARS.....	33
3.1.5.2 Actividad antiinflamatoria	34
3.1.5.2.1 Fréjol rojo moteado	34
3.1.5.2.2 Quinua Tunkahuan.....	36
3.1.5.3 Actividad antimicrobiana	38
3.1.5.3.1 Fréjol rojo moteado	38
3.1.5.3.2 Quinua Tunkahuan.....	40
3.1.6 Verificación de las hipótesis	42
3.1.6.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol y quinua.....	42
3.1.6.2 Cuantificación de proteína de fréjol y quinua.	42
3.1.6.3 Evaluación de la actividad antioxidante de quinua.	42
3.1.6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de fréjol y quinua.....	42
3.1.6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fréjol y quinua.	43
CAPÍTULO IV	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
4.1 Conclusiones	44
4.2 Recomendaciones.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento para determinar la actividad antioxidante.	14
Figura 2. Procedimiento para determinar la actividad antiinflamatoria.....	16
Figura 3. Pocillos para la actividad antimicrobiana.....	18
Figura 4. Electroforesis Native-PAGE, de concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes Ph.	26
Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de los concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes Ph.	27
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de los concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.....	28
Figura 7. Electroforesis Native-PAGE, de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.....	29
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.	30
Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.	31
Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de concentrados e hidrolizados de proteínas de fréjol y quinua.	32
Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de concentrados proteicos de proteína mediante el método Biuret.	59
Figura 12. Concentrado de quinua contra <i>E. coli</i> ,.....	79
Figura 13. Concentrado de quinua contra <i>P. aeruginosas</i>	79
Figura 14. Concentrado de quinua contra <i>B. cereus</i>	79
Figura 15. Concentrado de quinua contra <i>L. Monocytogenes</i>	79
Figura 16. Concentrado de quinua contra <i>S. aureus</i>	79
Figura 17. Concentrado puro.	79
Figura 18. Hidrolizado de fréjol contra <i>E. coli</i>	80
Figura 19. Hidrolizado de fréjol contra <i>P. aeruginosas</i>	80
Figura 20. Hidrolizado de fréjol contra <i>B. cereus</i>	80
Figura 21. Hidrolizado de fréjol contra <i>L. Monocytogenes</i>	80

Figura 22. Hidrolizado de fréjol contra <i>S. aureus</i>	80
Figura 23. Hidrolizado puro de fréjol.	80
Figura 24. Hidrolizado de quinua contra <i>E. coli</i>	81
Figura 25. Hidrolizado de quinua contra <i>P. aeruginosas</i>	81
Figura 26. Hidrolizado de quinua contra <i>B. cereus</i>	81
Figura 27. Hidrolizado de quinua contra <i>L. Monocytogenes</i>	81
Figura 28. Hidrolizado de quinua contra <i>S. aureus</i>	81
Figura 29. Hidrolizado puro de quinua.	81
Figura 30. Molido del grano de fréjol rojo moteado.....	88
Figura 31. Tamizado de la harina <i>Mesh</i> N° 100.	88
Figura 32. Desengrasado de harina de quinua con n-hexano.....	88
Figura 33. Secado de la harina.	88
Figura 34. Pesado de harina para precipitación isoelectrica.	88
Figura 35. Precipitación isoelectrica de la proteína.	88
Figura 36. Liofilizado de muestras.	88
Figura 37. Técnica de electroforesis.	88
Figura 38. Método de cuantificación de proteína (Biuret).....	89
Figura 39. Actividad antioxidante.....	89
Figura 40. Actividad antiinflamatoria.	89
Figura 41. Actividad antimicrobiana.	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de diclofenaco diluido en agua destilada.....	16
Tabla 2. Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol a diferentes pH.	20
Tabla 3. Rendimiento de los concentrados proteicos de quinua a diferentes pH.....	21
Tabla 4. Porcentaje de pureza de concentrados proteicos de fréjol por el método Biuret (Mejor tratamiento).	22
Tabla 5. Porcentaje de proteína de fréjol obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método instrumental.	23
Tabla 6. Porcentaje de proteína y desviación estándar de quinua obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método Biuret (Mejor tratamiento).....	24
Tabla 7. Porcentaje de proteína de quinua obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método instrumental.	25
Tabla 8. Porcentaje de actividad antioxidante del concentrado a pH 4,0 e hidrolizado de quinua frente a BHT.	33
Tabla 9. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de concentrado a pH 6,0 e hidrolizado de fréjol frente a diclofenaco.	35
Tabla 10. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de concentrado a pH 4,0 e hidrolizado de quinua frente a diclofenaco.	37
Tabla 11. Datos obtenidos para la actividad antimicrobiana de hidrolizados a diferentes concentraciones de proteínas de fréjol frente a microorganismos patógenos, con un estándar de gentamicina.	39
Tabla 12. Datos obtenidos para la actividad antimicrobiana de hidrolizados a diferentes concentraciones de proteínas de quinua frente a microorganismos patógenos, con un estándar de gentamicina a una concentración de (500 ug/mL).	41
Tabla 13. Porcentaje de proteína de acuerdo con la cuantificación por Biuret.	54
Tabla 14. Pesos de proteína pura en concentrados de fréjol utilizados en la actividad antioxidante y antiinflamatoria.	54
Tabla 15. Pesos de proteína pura en concentrados de quinua utilizados en la actividad antioxidante y antiinflamatoria.	54

Tabla 16. Pesos y porcentaje de rendimientos de los concentrados proteicos de fréjol obtenidos a diferentes pH de precipitación.	56
Tabla 17. Anova del rendimiento de concentrados proteicos de fréjol por pH.....	56
Tabla 18. Pruebas de múltiples rangos para el rendimiento de concentrados proteicos de fréjol por pH.	56
Tabla 19. Pesos y porcentaje de rendimientos de los concentrados proteicos de quinua obtenidos a diferentes pH de precipitación.	57
Tabla 20. Anova del rendimiento de concentrados proteicos de quinua por pH.	57
Tabla 21. Pruebas de múltiples rangos para el rendimiento de concentrados proteicos de quinua por pH.	57
Tabla 22. Valores de la curva estándar de pepsina cuantificación de proteínas mediante el método Biuret.	59
Tabla 23. Absorbancia de los concentrados proteicos de fréjol medidos a 540 nm.	59
Tabla 24. Anova para porcentaje de proteína de fréjol por pH método Biuret.	60
Tabla 25. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de fréjol por pH método Biuret.....	60
Tabla 26. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los concentrados proteicos de fréjol.	60
Tabla 27. Anova para el porcentaje de proteína de fréjol por pH.	60
Tabla 28. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de fréjol por pH.	61
Tabla 29. Absorbancia de los concentrados proteicos de quinua medidos a 540 nm.	61
Tabla 30. Anova para el porcentaje de proteína de quinua por pH, método Biuret..	61
Tabla 31. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de proteína de quinua por pH método Biuret.....	62
Tabla 32. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los concentrados proteicos de quinua.	62
Tabla 33. Anova para el porcentaje de proteína de quinua por pH.	62
Tabla 34. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de quinua por pH.	62

Tabla 35. Datos obtenidos de absorbancia para actividad antioxidante de quinua Tunkahuan.....	64
Tabla 36. Actividad antioxidante obtenida de concentrados de quinua mediante el método TBARS.....	65
Tabla 37. Anova para Actividad Antioxidante por pH de quinua.....	65
Tabla 38. Actividad antioxidante obtenida control positivo BHT de quinua mediante el método TBARS.....	66
Tabla 39. Análisis de varianza para actividad antioxidante de quinua entre patrón y concentrado pH 4,0 - Suma de Cuadrados Tipo III.	66
Tabla 40. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por factores.....	66
Tabla 41. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por concentración.	67
Tabla 42. Actividad antioxidante obtenida de hidrolizado de quinua mediante el método TBARS.....	67
Tabla 43. Análisis de varianza para actividad antioxidante de quinua entre patrón e hidrolizado - Suma de Cuadrados Tipo III.....	67
Tabla 44. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria por factores.	68
Tabla 45. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por concentración.	68
Tabla 46. Datos de absorbancia medidos a 660 nm de concentrados de proteína de fréjol precipitados a diferentes pH e hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína.....	70
Tabla 47. Actividad antiinflamatoria (%) de concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.....	71
Tabla 48. Anova para actividad antiinflamatoria por pH de fréjol.	71
Tabla 49. Actividad antiinflamatoria (%) de control positivo diclofenaco a diferentes concentraciones utilizado para fréjol y quinua.....	71
Tabla 50. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria de fréjol entre patrón y concentrado pH 4,0 - Suma de Cuadrados Tipo III.	72

Tabla 51. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por factores.....	72
Tabla 52. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por concentración.....	72
Tabla 53. Actividad antiinflamatoria (%) de hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína (pH:6) de fréjol.....	73
Tabla 54. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria entre patrón e hidrolizado de fréjol - Suma de Cuadrados Tipo III.....	73
Tabla 55. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por factores.....	73
Tabla 56. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por concentración.....	74
Tabla 57. Datos de absorbancia medidos a 660 nm de concentrados de proteína de quinua precipitados a diferentes pH e hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína.....	74
Tabla 58. Actividad antiinflamatoria (%) de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.....	75
Tabla 59. ANOVA para actividad antiinflamatoria por pH de quinua.....	75
Tabla 60. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria entre patrón y concentrado pH 4,0 de quinua - Suma de Cuadrados Tipo III.....	75
Tabla 61. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por factores.....	76
Tabla 62. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por concentración.....	76
Tabla 63. Actividad antiinflamatoria (%) de hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína (pH:4) de quinua.....	76
Tabla 64. Análisis de Varianza para actividad antiinflamatoria entre patrón e hidrolizado de quinua - Suma de Cuadrados Tipo III.....	76
Tabla 65. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por factores.....	77
Tabla 66. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por concentración.....	77

Tabla 67. Absorbancias medias a 600 nm de los microorganismos patógenos para las 3 réplicas realizadas de actividad antimicrobiana en fréjol y quinua.....	83
Tabla 68. Valores de proteína y cantidad de agua utilizada en utilizadas para las diferentes concentraciones de proteína.	83
Tabla 69. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>E. coli</i> por concentración	83
Tabla 70. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>E. coli</i> por concentración.....	84
Tabla 71. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>P. aeruginosas</i> por concentración.	84
Tabla 72. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>P. aeruginosas</i> por concentración	84
Tabla 73. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>B. cereus</i> por concentración	84
Tabla 74. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra <i>B. cereus</i> por concentración.....	85
Tabla 75. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra <i>E. coli</i> por concentración	85
Tabla 76. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra <i>E. coli</i> por concentración.....	85
Tabla 77. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra <i>P. aeruginosas</i> por concentración.	85
Tabla 78. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra <i>P. aeruginosas</i> por concentración.....	86
Tabla 79. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra <i>B. cereus</i> por concentración.	86
Tabla 80. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra <i>B. cereus</i> por concentración.....	86

RESUMEN

Esta investigación está enfocada en dar a conocer y fomentar la gestión, innovación, desarrollo y sostenibilidad de productos alimenticios de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad tunkahuan y fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris* L.), mediante la determinación de actividades biológicas en concentrados e hidrolizados proteicos de los mismos. Las proteínas presentes en las matrices se concentraron mediante precipitación isoeléctrica, una porción de estas fue hidrolizada a través de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. La cantidad de proteínas fue estimada mediante los métodos Biuret y Elemental. Se caracterizaron por electroforesis SDS-PAGE con y sin 2-mercaptoetanol. La actividad antiinflamatoria fue evaluada en ambos casos mediante el método de desnaturalización de proteína (albumina de huevo), reportando resultados positivos tanto para concentrados como para hidrolizados. De igual manera la actividad antimicrobiana se determinó desafiando las dos fracciones contra patógenos comunes transmitidos por alimentos mediante el método de difusión en agar, no se obtuvo actividad en los concentrados, sin embargo, los hidrolizados de las dos matrices inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosas* y *B. cereus*, mientras que las cepas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* no fueron inhibidas. Finalmente, se avaluó la actividad antioxidante en quinua a través del método de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico TBARS y se obtuvo resultados positivos únicamente en hidrolizados. Debido a las actividades biológicas obtenidas se abre una nueva línea de investigación basada en la incorporación de concentrado o hidrolizado de fréjol/quinua en un alimento procesado con el fin de mejorar su valor nutricional y funcional.

Palabras claves: Actividad antiinflamatoria, actividad antimicrobiana, concentrados proteicos, hidrolizados proteicos, quinua tunkahuan, fréjol rojo moteado.

ABSTRACT

This research is focused on promoting the management, innovation, development and sustainability of quinoa food products (*Chenopodium quinoa* Willd.) variety Tunkahuan and red mottled beans (*Phaseolus vulgaris* L.), through determination of biological activities in protein concentrates and hydrolysates. The proteins present in the matrices were concentrated by isoelectric precipitation, a portion of these were hydrolyzed through a process of gastrointestinal digestion in vitro. The amount of protein was estimated using the Biuret and elementary methods. They were characterized by SDS-PAGE electrophoresis with and without 2-mercaptoethanol. The anti-inflammatory activity was evaluated in both cases using the protein denaturation method (egg albumin), reporting positive results for both concentrates and hydrolysates. In the same way, the antimicrobial activity was determined challenging both fractions against common pathogens transmitted by food through the method of well diffusion in agar, no activity was obtained in the concentrates, however, the hydrolysates of the two matrices inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosas* and *B. cereus*, while strains of *S. aureus* and *L. monocytogenes* were not inhibited. Finally, the antioxidant activity in quinoa was determined through the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), obtaining positive results only in the hydrolyzed fraction. Due to the biological activities obtained, a new line of research is opened based on the incorporation of concentrate or hydrolysate of beans/quinoa in a processed food in order to improve its nutritional and functional value.

Key words: Anti-inflammatory activity, antimicrobial activity, protein concentrates, protein hydrolysates, tunkahuan quinoa, mottled red beans.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

Un estudio realizado por la OMS afirma que los países desarrollados consumen el doble de los requerimientos diarios de proteína, mientras que los países del Tercer Mundo sufren una carencia elevada de estas. Además recomienda una porción de 25% de proteína animal y 75% de proteína vegetal (OAC, 2016). Se conoce también que las proteínas de origen vegetal poseen sustancias protectoras como: antioxidantes, fibras y fitoquímicos que promueven la salud (NIH, 2017).

Debido a que las proteínas constituyen una gran fuente de energía y aminoácidos esenciales, estas son consideradas como macronutrientes necesarios para el sustento de las estructuras corporales y el crecimiento (Martínez et al., 2006). Investigaciones destacadas mencionan que al hidrolizar una proteína se obtienen como producto los péptidos los cuales también desempeñan roles biológicos en el organismos, una de las más destacadas es la actividad antioxidante, que ocurre por la inhibición de la peroxidación lipídica, por la eliminación de radicales y la quelación de iones metálicos (Sarmadi et al., 2010).

La búsqueda de alimentos con mayor contenido nutricional y bajo costo ha llevado a incursionar en el estudio de proteínas vegetales, ya que cumplen diversas funciones en el cuerpo, tales como; catálisis, movilidad corporal, almacenamiento, transporte y protección , además poseen un bajo costo y una gran disponibilidad (Morán, 2017). Ejemplo de esto son la quinua y el fréjol por su balance de aminoácidos esenciales (Mederos, 2006; Salom, 2006).

Por tales razones, se ha incrementado el interés de obtener proteínas purificadas y de buena calidad, tal es el caso del método de precipitación isoeléctrica que es uno de los más comunes ya que permite mantener las propiedades nutricionales propias de la proteína y elimina en mayor proporción los compuestos anti nutricionales y sustancias no proteicas (Vioque et al., 2001).

En investigaciones recientes obtuvieron aislados proteicos de quinua, ajonjolí y fréjol (**Toapanta, 2016; Poveda, 2016; Morán, 2017**), mediante precipitación isoeléctrica, las cuales destacan la efectividad y facilidad de extracción y en la mayoría de los casos un mejor rendimiento de proteína y mayor digestibilidad.

Un parámetro importante en el estudio de las actividades biológicas de proteínas vegetales es la cuantificación de las mismas, por tal motivo se han desarrollado diferentes métodos de determinación, de los cuales se destacan: Biuret, Kjeldahl y Bradford (**Fernández et al., 2006; Cerna et al., 2010**). Además, los métodos instrumentales basados en el análisis del contenido total de nitrógeno, carbono e hidrogeno se han constituido en alternativas viables para sustituir a los métodos químicos por su precisión y factibilidad (**UNE-EN 15104, 2011**).

Otro parámetro que puede ser utilizado en matrices vegetales para caracterizar e identificar sus proteínas es la electroforesis SDS – PAGE (*sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*) (**Schägger et al., 1987**). **García (2000)**, menciona que esta técnica es un método de separación de proteínas que tiene una alta versatilidad, poder de resolución y sensibilidad. **Toapanta, (2016)** caracterizó proteínas de quinua mediante electroforesis SDS-PAGE y reportó que para todos los pH existen fracciones similares comprendidas entre 14 – 70 kDa, que representan en mayor proporción a albúminas y globulinas como proteínas de almacenamiento, además menciona que las proteínas fueron hidrolizadas en su totalidad a pH 1,2; 2,0 y 3,2 después de la hidrólisis gástrica también presentaron resistencia a la hidrólisis con pepsina a pH 4,5 y 5,5. Después de la hidrólisis duodenal las proteínas fueron totalmente hidrolizadas, reportó también que no existió actividad antioxidante en hidrolizados a pH 1,2 mediante el método ORAC. **Morán, (2017)** aplicó la misma técnica en proteínas de fréjol a diferentes pH y menciona que las fracciones más visibles se encuentran en peso molecular entre 35 y 48 kDa, también realizó un ensayo de digestión gastrointestinal *in vitro* y reportó que las faseolinas son altamente resistentes a la hidrólisis y señaló que mediante RP-UHPLC en concentrados digerido a pH 1,2 existió una mayor hidrólisis.

Actividades biológicas tales como: antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana han sido estudiadas en extractos aislados de fuentes naturales, debido a que su potencial

uso propicia la conservación de alimentos y representa beneficios para la salud (Franco et al., 2013). Los vegetales presentan en su estructura química proteínas de almacenamiento como albúminas, prolaminas, glutelinas y globulinas siendo las albúminas las de mayor proporción (Cavazos & Gonzalez, 2013). Los concentrados e hidrolizados proteicos pueden presentar actividades biológicas que cumplen diferentes funciones en los procesos fisiológicos del organismo (Gallegos et al., 2013) de gran interés científico, proporcionando nuevos ingredientes funcionales en alimentos procesados (Poveda et al., 2016).

Estudios recientes indican la existencia de actividades antioxidante y antiinflamatoria en diferentes matrices vegetales: sachá inchi, quinua, ajonjolí, chía (**Quinteros, 2016; Toapanta, 2016; Poveda, 2016; Cárdenas, 2016**). Otras actividades biológicas de compuestos bioactivos procedentes de cereales y leguminosas descritas previamente son: antioxidante, antimicrobiana, antitumoral y antiinflamatoria (**Hidalgo et al., 2018**).

Tomando en cuenta este potencial **García et al., (2015)**, realizaron una investigación basada en la evaluación de péptidos y fracciones fenólicas de los hidrolizados más activos de fréjol pinto encontrando que la mayor parte de péptidos abundantes en hidrolizados contienen secuencias de aminoácidos con propiedades antiinflamatorias (16-28% de inhibición).

También se reportan estudios de péptidos que presentan efectos antibacterianos, anticancerígenos o antivirales (**Oseguera et al., 2011**). **Bojórquez et al., (2013)**, menciona que a partir de una hidrólisis *in vitro* en proteínas alimentarias se puede obtener péptidos con actividad antimicrobiana es así que se ha realizado una hidrólisis con grado menor al 10% de proteínas vegetales como maíz y soja obteniendo resultados positivos. **Park et al. (2017)**, realizaron un estudio de la actividad antimicrobiana por método OD y difusión de discos de quinua cultivada en Corea, Estados Unidos y Perú, reportando que no tienen una fuerte actividad antimicrobiana contra las bacterias transmitidas por alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Campylobacter jejuni*, el grado de inhibición más significativo fue contra *E. coli* y *S. aureus*.

1.2 Hipótesis

1.2.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol o quinua.

Hipótesis Nula (H_0): Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en el rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol o quinua.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los pH de precipitación evaluados influyen significativamente en el rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol o quinua.

1.2.2 Cuantificación de proteína de fréjol o quinua.

Hipótesis Nula (H_0): Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en el porcentaje de proteína de los concentrados de fréjol o quinua.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los pH de precipitación evaluados influyen significativamente en el porcentaje de proteína de los concentrados de fréjol o quinua.

1.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante de quinua.

Hipótesis Nula (H_0): Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en la actividad antioxidante de los concentrados de quinua.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los pH de precipitación evaluados influyen significativamente en la actividad antioxidante de los concentrados de quinua.

1.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de fréjol o quinua.

Hipótesis Nula (H_0): Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en la actividad antiinflamatoria de los concentrados de fréjol o quinua.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los pH de precipitación evaluados influyen significativamente en la actividad antiinflamatoria de los concentrados de fréjol o quinua.

1.2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fréjol o quinua.

Hipótesis Nula (H_0): Los hidrolizados de fréjol o quinua no poseen actividad antimicrobiana.

Hipótesis Alternativa (H₁): Los hidrolizados de fréjol o quinua poseen actividad antimicrobiana.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Principal

Determinar la actividad antiinflamatoria y antimicrobiana en concentrados e hidrolizados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad Tunkahuan y fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.3.2 Objetivos Específicos

- Obtener concentrados proteicos de quinua y fréjol mediante precipitación isoeléctrica.
- Hidrolizar las proteínas de quinua y fréjol simulando condiciones fisiológicas humanas (digestibilidad *in vitro*).
- Valorar la actividad antiinflamatoria en concentrados e hidrolizados de proteína de quinua y fréjol.
- Evaluar la actividad antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos de quinua.
- Determinar la actividad antimicrobiana en concentrados e hidrolizados proteicos de quinua y fréjol contra microorganismos patógenos.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODO

2.1 Materiales

2.1.1 Materia prima

La materia prima utilizada fue: fréjol rojo moteado procedente del INIAP 473 y quinua Tunkahuan procedente de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.2 Materiales e insumos

- Balones de aforo
- Botellas de tapa azul
- Cajas Petri
- Envases con cierre hermético
- Espátulas
- Goteros
- Gradillas
- Guantes de látex
- Hisopos
- Magnetos de agitación
- Marcadores
- Micropipetas
- Mortero
- Papel filtro Whatman N° 1
- Papel parafilm
- Papel plástico
- Peras de succión
- Probetas (100, 250, 500 y 1000 mL)
- Puntas de micropipeta
- Rotuladores
- Soporte universal
- Tamices
- Toallas absorbentes
- Tubos cónicos para centrífuga Falcon de 15 mL
- Tubos de centrífuga (50 mL)
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo tapa rosca
- Tubos Eppendorf (1,5 y 2,0 mL)
- Varillas de agitación
- Vasos de precipitación (50, 100, 250, 500, 1000 mL)

2.1.3 Equipos

- Secador con reflujo de aire (GanderMTN)
- Molino (Micropulv modelo MG 1511)
- Rotoevaporador (SELECTA modelo RS 3000-V)
- Plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific)
- Liofilizador de marca Labconco, (Condiciones del liofilizador: - 57 °C y 0,2 Pa)
- Espectrofotómetro (marca Genesys, modelo 4001/4)
- Agitador vórtex VWR
- Microincubador (marca Labnet modelo I4001HCS)
- Balanza analítica Mettler Toledo
- Equipo de electroforesis Bio-Rad Mini –PROTEAN®
- Cámara de flujo
- Centrífuga Eppendorf 5702
- Estufa
- Micro centrífuga
- Refrigerador
- Ultra congelador, Panasonic MDF-U33V -86°

2.1.4 Reactivos

- 2-mercaptoetanol
- Aceite de oliva virgen
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Agar mueller hinton
- Agua destilada
- Alcohol antiséptico
- Azul de bromofenol
- Bicarbonato de sodio
- Cloruro de sodio
- DMSO
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Etanol
- Pepsina gástrica porcina
- Temed (N, N, N', N' tetrametiletilendiamina) Bio-Rad
- Azul de Coomassie
- Acrilamida, Invitrogen Bio-Rad
- Azul de bromofenol, Bio-Rad
- Butil hidroxil tolueno (BHT)
- Pancreatina de páncreas porcino
- 2-mercaptoetanol, Bio-Rad
- Glicerol

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Kit para electroforesis bidimensional de Bio-Rad
- Metanol
- Persulfato de amonio (PSA)
- Reactivo de Biuret
- Sulfato de cobre
- Tartrato de potasio
- TBA
- Tris-HCl, Bio-Rad

2.2 Método

2.2.1 Obtención, rendimiento y cuantificación de concentrados e hidrolizados proteicos.

2.2.1.1 Elaboración de la harina

Los granos de quinua tunkahuan se lavaron en agua corriente durante 30 minutos para eliminar las saponinas. Posteriormente se secaron por 48 h a 37 °C en un secador con reflujo de aire (GanderMTN). Los granos desaponificados de quinua y los granos de fréjol rojo se molieron individualmente en un molino (Micropulv modelo MG 1511). Finalmente, la harina de cada grano fue tamizada en una malla *Mesh* N° 100.

2.2.1.2 Desengrasado de la harina

Para el desengrasado de la harina de quinua se utilizó n-hexano como solvente en una relación 1:10, 50 g de harina en 500 mL de n-hexano. La suspensión se agitó durante 12 h y luego se dejó sedimentar por 6 h. El sobrenadante fue filtrado a través de un papel de filtro Whatman N° 1 en el que se separó la harina del n-hexano y otros componentes como la grasa. El n-hexano fue recuperado en un rotoevaporador (SELECTA modelo RS 3000-V), por un tiempo de 1 h a 60 °C y -0,5 psi. La harina de fréjol no fue desengrasada ya que según **Guzmán et al., (2002)**, esta tiene un contenido muy bajo de grasa (no interfirió en los análisis que se realizaron).

2.2.1.3 Obtención de concentrados proteicos

La proteína de las harinas de quinua (desengrasada) y fréjol (sin desengrasar), se obtuvo mediante precipitación isoelectrica siguiendo el protocolo utilizado por **Martinez & Añón, (1996)**, con modificaciones. Se disolvieron 5 g de harina en 50 mL de agua destilada. Para solubilización el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 1 M, en una

plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific) a 400 rpm y se mantuvo por 1 h, esta solución fue centrifugada por 30 min a 4400 rpm, el sobrenadante se llevó a pH 3,0 por 5 min a 200 rpm, mismo que se ajustó a cada uno de los pH de precipitación. El precipitado obtenido fue refrigerado por 24 h, tiempo en el cual ocurrió la precipitación del concentrado proteico, el cual fue colocado en un frasco estéril y congelado a – 80 °C para su posterior liofilización en un liofilizador de marca Labconco, (Condiciones del liofilizador: - 57 °C y 0,2 Pa). Este procedimiento se realizó por triplicado.

2.2.1.4 Rendimiento de los concentrados proteicos

El rendimiento obtenido en concentrados proteicos de fréjol y quinua fue calculado en base al peso del concentrado mediante la siguiente ecuación:

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

Donde:

R: Rendimiento de la concentración proteica de fréjol o quinua.

W_f: Peso en gramos del concentrado liofilizado de fréjol o quinua.

W_o: Peso inicial de la harina de fréjol o quinua.

Con el fin de determinar si las diferencias de los promedios de los rendimientos obtenidos en los pH de precipitación son estadísticamente significativos, dichos promedios fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor.

2.2.1.5 Cuantificación proteica.

2.2.1.5.1 Método Biuret

Para cuantificar la proteína presente en los concentrados proteicos de fréjol y quinua, se empleó el método colorimétrico de Biuret descrito por **Gornall et al., (1949)**, con modificaciones. Esta determinación se realizó por duplicado, se preparó el reactivo de Biuret y la muestra de la siguiente manera:

Preparación del reactivo Biuret: Se pesaron 9 g de tartrato de sodio y potasio, 3 g de sulfato de cobre y 5 g de yoduro de potasio. En 400 mL de NaOH 0,2 M se añadió cada reactivo en el orden mencionado, se aforó a 1 litro con agua destilada.

Preparación de la muestra: Se pesó $10 \pm 0,2$ mg del concentrado proteico en tubos eppendorf en la balanza analítica, se enceró, posteriormente se añadió 1 mL de agua destilada y 75 μ l de NaOH 0,2 M. Esta solución se llevó a agitación durante 10 min, se tomó dos alícuotas de 250 μ l y se colocó a cada un 1,25 mL del reactivo de Biuret. Las alícuotas fueron enfriadas por 10 min en el congelador, posteriormente fueron centrifugadas por 30 min a 13000 rpm. Se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro (marca Genesys, modelo 4001/4) a 540 nm. Este proceso se realizó por duplicado, con dos réplicas para cada muestra de proteína aislada con lo cual se obtuvo 4 lecturas para cada pH (3,0; 4,0; 5,0 y 6,0). Para el blanco se realizó el mismo procedimiento sin muestra.

2.2.1.5.2 Método instrumental: Determinación del contenido total de nitrógeno (Análisis elemental)

El método instrumental se llevó a cabo con un analizador automático de carbono, nitrógeno e hidrogeno (CNH), que consiste en la combustión de la muestra en presencia de oxígeno, o a su vez en una mezcla de oxígeno/gas portador, en condiciones tales que se convierte en productos gaseosos y cenizas. Los productos gaseosos generalmente son nitrógeno elemental, vapor de agua, dióxido de carbono, haluros y óxidos de nitrógeno, oxácidos y ácidos de azufre, los compuestos de la combustión son tratados para asegurar que cualquier nitrógeno asociado con los productos de combustión de haluros o azufre se liberan como vapor de agua, además los óxidos de nitrógeno se reducen a nitrógeno elemental (UNE-EN 15104, 2011).

La determinación del contenido de nitrógeno total presente en las muestras se realizó en base a la norma española (UNE-EN 15104, 2011). El cálculo de la cantidad de nitrógeno se realizó a partir de la siguiente expresión:

$$N_d = N_{ad} * \frac{100}{100 - M_{ad}}$$

Donde:

d= en base seca

N_{ad}= según se ha determinado (% de nitrógeno en la muestra)

M_{ad}= Contenido de humedad de la muestra para análisis general cuando se analiza

Na se multiplicó por un factor de conversión de 6,25.

2.2.1.6 Obtención de hidrolizados proteicos

Preparación de las enzimas

Pepsina: Para obtener una concentración de 2000 U/mg, se pesó 25 mg de la enzima pepsina y se diluyó en 50 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0,35 M a pH 2,0.

Pancreatina: Se pesó 5 mg de pancreatina y se diluyó en 1 mL de agua destilada, se toma 1 mL de la dilución y se mezcló en 200 mL de agua para llegar a una concentración de 109 U/mg, se ajustó a pH 7,0. La pancreatina posee una mezcla de enzimas proteolíticas (Proteasas, amilasas, lipasas).

Fluido intestinal simulado

El fluido intestinal simulado fue preparado de la siguiente manera: se pesó 61,6 mg de hidróxido de sodio (NaOH) y 680 mg de fosfato de potasio monobásico (KHPO₄) los que se diluyeron en un volumen de 100 mL y se ajustaron a pH 7,0.

Preparación del sustrato

Se pesó 10 mg del concentrado proteico con mayor contenido de proteína en base al mejor tratamiento de cuantificación por Biuret y se diluyó en 1 mL de agua destilada, esta solución se homogeniza con la ayuda de un vórtex VWR.

Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Se utilizó el protocolo descrito por **Minekus et al. (2014)**, con modificaciones. Para la digestión gástrica se utilizó una mezcla E:S en relación 1:1, solución de pepsina (2000 U/mL): solución de proteína (10 mg/mL). La pepsina fue diluida en un FSG (Fluido Gástrico Simulado) que contiene una solución de NaCl 0,35 M a pH 2,0, la solución proteica se preparó con 10 mg del aislado y se diluyó en 1 mL de FSG. Esta mezcla fue sometida al microincubador (marca Labnet modelo I4001HCS) por 2 h, 37 °C y 500 rpm. Una vez transcurrido el tiempo se llevó a cabo la digestión duodenal por acción de la pancreatina (109 U/mL), que consistió en mezclar 1 mL del digerido gástrico y 1 mL de solución de pancreatina, de esta mezcla se tomó 1 mL y se colocó

en un tubo eppendorf al cual se añadió 1 mL de FIS (Fluido intestinal simulado), luego se realizó la digestión bajo las mismas condiciones que la digestión gástrica.

Una vez culminada la hidrólisis se detuvo la reacción de las enzimas con adición de 200 µl de bicarbonato de sodio 1 M y calentamiento a 80 °C por 10 min y 500 rpm. Se congeló a -80 °C y se liofilizó (Condiciones del liofilizador: - 57 °C y 0,2 Pa). Este procedimiento se realizó por triplicado.

2.2.2 Electroforesis SDS-PAGE y Native- PAGE:

Para la caracterización de los concentrados e hidrolizados de fréjol y quinua se utilizó la técnica analítica en Gel de Poliacrilamida con Dodecil-sulfato de Sodio (SDS PAGE), siguiendo el protocolo descrito por **Laemmli, (1970)**, con modificaciones, en un equipo BioRad Mini – PROTEAN® Tetra System. Se aplicó un estándar molecular (15-250 kDa) de marca Bio-Rad®, y las muestras se prepararon en el tampón para electroforesis con y sin agente reductor (2-mercaptoetanol).

Preparación de la muestra con agente reductor: Se pesó 10 mg de concentrado o hidrolizado de fréjol o quinua en un tubo eppendorf y se diluyó en 1 mL de agua destilada. Se tomó 200 µL de concentrado o hidrolizado se mezcló con 200 µL de buffer de muestra, para la preparación de este buffer se utilizó: 4,8 mL de agua destilada, 1,2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1,0 mL de glicerol puro, 2,0 mL SDS al 10%, 0,6 mL de β-mercaptoetanol (0,6 mL) y azul de bromofenol. Esta fue llevada al microincubador a las siguientes condiciones: 80 °C, por 10 min a 450 rpm. Este procedimiento fue realizado para cada concentrado obtenido a diferentes pH de precipitación y para cada hidrolizado.

Preparación de la muestra sin agente reductor: Se realizó el mismo procedimiento anterior con excepción de 2-mercaptoetanol a las mismas condiciones.

Preparación de los geles de acrilamida: Para la preparación del gel superior (concentrador), utilizó los siguientes reactivos: 2,2 mL de agua destilada, 0,42 mL de Tris-HCl 1.5M a pH 6,8, 0,7 mL acrilamida al 30%, 3,3 µL SDS al 10%, 0,6 µL de tetrametiletilenediamina (TEMED) (6 µL) y 20 µL de persulfato de amonio al 10% (PSA). Por otro parte, el gel inferior (separador) se preparó con los siguientes reactivos: 1,425 mL de agua destilada, 3 mL de Tris-HCl 1M a pH 8,8, 3 mL de

acrilamida al 30%, 75 μ L de SDS al 10%, 9 μ L de tetrametiletilenediamina (TEMED), 30 μ L PSA al 10%. El gel concentrador y el gel separador fueron preparados a una concentración de 4 y 12% respectivamente. Ambas soluciones se gelificaron en las placas de vidrio del equipo de electroforesis vertical BioRad Mini – PROTEAN® Tetra System, primero se colocó el gel separador y se dejó por 1 h para su completa gelificación, posteriormente se colocó el gel concentrador y se gelificó durante 1 h, de esta manera se formó un solo gel.

Seguido de ello se armó el equipo de electroforesis, se añadió una solución de *buffer running* (3 g/L de Tris-HCl, 15 g/L de Glicina y 1 g/L de SDS) entre las placas de vidrio con el gel y fuera de las mismas, en la placa de vidrio se colocó 20 μ L de muestra a cada pH (4 muestras) y 8 μ L de estándar, la corrida de los geles se llevó a cabo a 160 V por 15 min, posteriormente se subió el voltaje a 200 hasta que el gel corrió completamente. Los geles se retiraron del equipo y fueron teñidos en una solución de Coomassie brilliant blue R-250 por 12 horas, luego se colocó una solución de desteñido que estuvo constituida por 45% Agua destilada, 50% Metanol y 5% Ácido acético, por 2 horas, finalmente se realizó un lavado con agua destilada y se tomaron fotografías de cada uno de los geles.

Por otra parte, para la electroforesis Native- PAGE, la preparación de la muestra consistió en pesar 10 mg de concentrado y mezclar con 600 μ L de buffer de muestra, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Buffer running: 1,5 g Tris; 7,2 g glicina; 500 mL H₂O destilada.

Buffer de muestra: 3,1 mL 1M Tris-HCl pH 6,8; 0,5 mL de azul de bromofenol; 1,4 mL H₂O destilada; 5 mL glicerol.

2.2.3 Actividades biológicas

2.2.3.1. Método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico TBARS

La actividad antioxidante para los concentrados e hidrolizado de quinua, se realizó mediante el método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), descrito por **Rojano et al., (2008)**, con modificaciones.

Oxidación del aceite de oliva: Se colocó 200 mL de aceite en una botella de vidrio sin tapa, se oxidó durante dos semanas, la primera semana a 40 °C y la siguiente semana a 70 °C en una estufa.

Preparación de la solución proteica: Para cada pH se pesó las cantidades de proteína que se muestran en la tabla 34 y 35 para fréjol y quinua respectivamente, se diluyó en 2 mL de agua destilada.

Las concentraciones de proteína utilizadas fueron 100, 200, 500 y 1000 µg/mL. Se realizó una relación 1:1 (v/v) que contuvo 500 µL de aceite de oliva extra virgen oxidado de marca “ARBOLITO” y 500 µL de solución proteica, estos volúmenes se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, para el control se colocó 2 mL de agua destilada en lugar de la solución proteica.

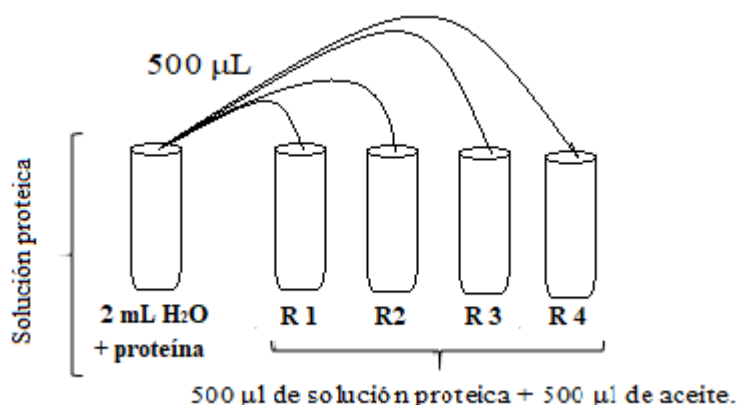


Figura 1. Procedimiento para determinar la actividad antioxidante.

Las réplicas se incubaron en un micro incubador (Labnet modelo I4001HCS), por 13 h a 28 °C y en agitación constante de 400 rpm. Posteriormente se colocó 1 mL de solución de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) al 1% (0,5 g ácido tiobarbitúrico, 40 mL ácido acético, 10 mL agua destilada) y se volvió a incubar a las siguientes condiciones; 95 °C y 400 rpm durante 1 h. Las muestras fueron enfriadas durante 5 min y se midió las absorbancias en un espectrofotómetro (Genesys, modelo 4001/4) a 532 nm.

El patrón utilizado fue un antioxidante comercial, Butil hidroxi tolueno (BHT), a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL), está constituido por 500 µL de aceite de oliva oxidado, 500 µL de agua destilada con BHT (2 mg/mL) y 1 mL de TBA al 1%. Mediante la siguiente ecuación se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de los concentrados e hidrolizado de quinua:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{A - B}{B} * 100$$

Donde:

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

B: Absorbancia del aceite oxidado

Este procedimiento se realizó por triplicado tanto en concentrados como hidrolizado de fréjol y quinua.

2.2.3.2 Actividad antiinflamatoria

Para la actividad antiinflamatoria de los concentrados e hidrolizados proteicos de quinua y fréjol mediante el método de la desnaturalización de proteína (albumina de huevo), se utilizaron concentraciones de proteína de 100, 200, 500 y 1000 µg/mL. Para ello se siguió el protocolo detallado por **Padmanabhan et al., (2012)**, con modificaciones. Se realizó las siguientes soluciones.

Solución buffer fosfato 6,4: Primero se preparó dos soluciones a una concentración 1 M, una de NaH₂PO₄ (fosfato monobásico) y otra de Na₂HPO₄ (fosfato dibásico). Para ello se pesó 1,19 g de NaH₂PO₄ y se aforó en 10 mL, posteriormente se pesó 1,42 g de Na₂HPO₄ y se aforó en el mismo volumen. De las soluciones preparadas se tomó 8,1 mL y 6,94 mL respectivamente, se aforó a 150 mL. El pH 6,4 se ajustó utilizando una solución de HCl 2 M.

Solución buffer + albúmina: En esta solución para cada tubo se necesitó 2,8 mL de buffer fosfato 6,4 y 0,2 mL de albumina, se utilizó 20 tubos en cada pH (4 réplicas para cada concentración y 4 para el control), la solución fue realizada para 25 tubos con el fin de obtener una mejor homogenización, se colocó 70 mL de solución buffer y 5 mL de albúmina de huevo fresco, se agitó lentamente con el fin de evitar la formación de espuma hasta su correcta homogenización.

Solución proteica: Los concentrados fueron pesados de acuerdo con la cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret con el fin de obtener las concentraciones de proteína pura, (ANEXO A) y se diluyeron en 10 mL de agua destilada. Para los hidrolizados se pesó (1, 2, 5 y 10 mg) diluidos en el mismo volumen.

El fármaco diclofenaco de sodio líquido de la marca genérica McK (concentración 25 mg/mL) se utilizó como patrón en las mismas concentraciones de la proteína para comparar la actividad antiinflamatoria presente en concentrados e hidrolizados proteicos.

$$\frac{75 \text{ mg}}{3 \text{ mL}} = 25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 25000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 5 \text{ mL}}{25000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}$$

$$V_1 = 0,020 \text{ mL} = 20 \mu\text{L}$$

Tabla 1. Concentraciones de diclofenaco diluido en agua destilada.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Vol. Diclofenaco (μL)	Aforo H_2O (μL)
100	20	1980
200	40	1960
500	100	1900
1000	200	1800

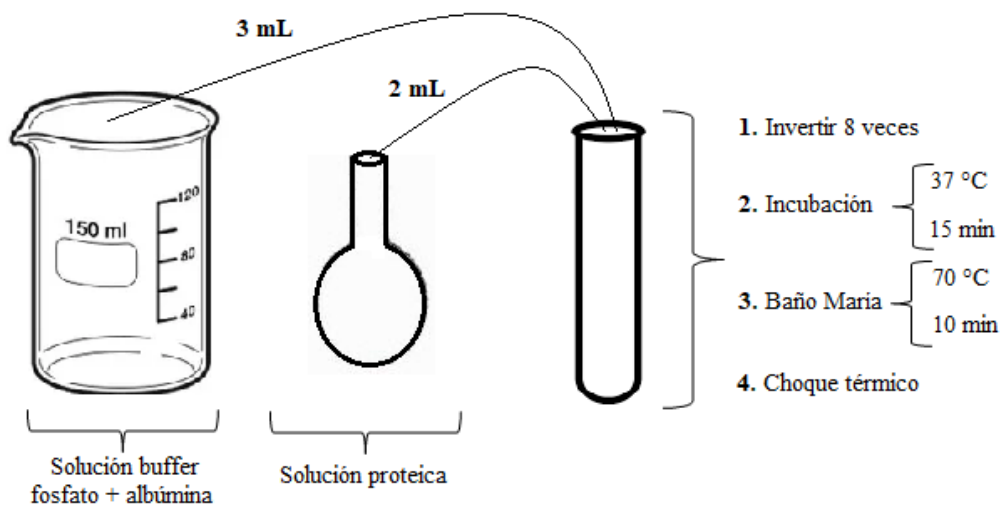


Figura 2. Procedimiento para determinar la actividad antiinflamatoria.

Se utilizó 20 tubos de ensayo de 10 mL para cada pH de concentrado (4 réplicas para cada concentración y 4 para el control). Como se aprecia en la figura 2 se colocó 3 mL

(solución buffer + albúmina) en cada tubo y se añadió 2 mL de solución proteica, para el control positivo se colocó 2 mL de agua destilada y para el patrón en lugar de la solución proteica se colocó 2 mL de solución de diclofenaco preparada como señala la tabla 1.

Los tubos fueron tapados con un corcho y se invirtieron 8 veces para la correcta homogenización de la solución la cual fue colocada a las siguientes condiciones: 37 °C por 15 min en una estufa, posteriormente en un baño maría se indujo la desnaturalización de la albúmina a las siguientes condiciones: 70 °C por 10 min, se realizó el mismo procedimiento para los hidrolizados y patrón. Finalmente, las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 660 nm, en el espectrofotómetro (Genesys, modelo 4001/4).

El cálculo del porcentaje de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antiinflamatoria (\%)} = \frac{A - B}{B} * 100$$

Donde:

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

B: Absorbancia de la albúmina desnaturalizada.

2.2.3.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los concentrados e hidrolizados proteicos de quinua y fréjol se evaluó frente a las siguientes bacterias patógenas: *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* y *Pseudomona aeruginosa*, fueron inoculadas en 5 mL de caldo soja tripticasa (TBS) e incubadas toda la noche a 37 °C con agitación. Se determinó la concentración de dichas bacterias mediante el método descrito por **Mine et al., (2004)** con modificaciones. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron estimadas mediante evaluación de turbidez a través del espectrofotómetro a 600 nm. La concentración final a la que llegaron los microorganismos fue de 0,1 para ello se diluyó la muestra en solución salina 0.9%. La siembra de los patógenos fue en cajas Petri con

un volumen de 25 mL de agar Mueller Hinton, el inóculo se difundió por toda la superficie del medio usando hisopos previamente esterilizados.

Se tomó el concentrado con mayor contenido de proteína en base al mejor tratamiento obtenido en la cuantificación por Biuret o el hidrolizado, la siembra se realizó según el protocolo descrito por **Ríos et al., (2005)**, con modificaciones.

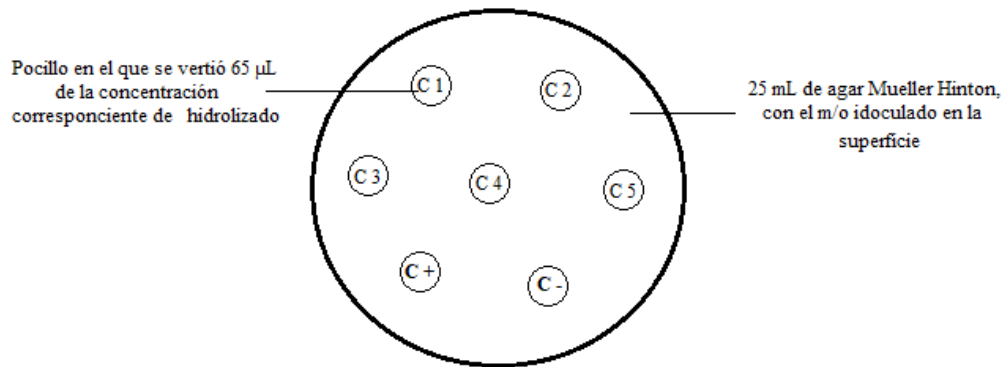


Figura 3. Pocillos para la actividad antimicrobiana.

Se formaron 7 pocillos sobre la superficie del agar que contiene el microorganismo con la ayuda de puntas estériles de 200 µL, se vertió 65 µL de las siguientes concentraciones: 500, 375, 250, 125, y 50 mg/mL, en cada uno de los pocillos. Para control positivo se utilizó Gentamicina con una concentración de 500 µg/mL y un control negativo (agua). Se incubó las cajas a 37 °C por 24 h. La actividad antimicrobiana se estimó en base de la zona de inhibición generada al contorno de los orificios.

2.2.4 Diseño experimental y Análisis estadístico:

Para el rendimiento, cuantificación y actividad antimicrobiana se aplicó un diseño de un solo factor, por otra parte, para las actividades antioxidante y antimicrobiana se aplicó un diseño experimental A*B.

Para el rendimiento y la cuantificación proteica de fréjol y quinua se evaluó el siguiente factor.

Factor: pH de precipitación.

Niveles: a₀: 3,0; a₁: 4,0; a₂: 5,0; a₃: 6,0

Para la actividad antioxidante y antiinflamatoria se trabajó con los siguientes factores:

Factor A: Tipo de proteína.

Niveles: **a₁**: Patrón utilizado (BHT o diclofenaco) según corresponda; **a₂**: Concentrado o hidrolizado.

Factor B: Concentración proteica

Niveles b₁: 100 (µg/mL); **b₂**: 200 (µg/mL); **b₃**: 500 (µg/mL); **b₄**: 1000 (µg/mL).

Actividad antimicrobiana

Factor: Concentración

Niveles: **a₀**: 500 (mg/mL); **a₁**: 375 (mg/mL); **a₂**: 250 (mg/mL).

El análisis de varianza ANOVA y la prueba de comparación Tuckey se aplicaron a un nivel de confianza del 95% en el programa SPSS y Statgraphics por medio de lo cual se identificó las diferencias significativas en los análisis realizados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados.

3.1.1 Rendimiento de los concentrados

3.1.1.1 Fréjol rojo moteado

En la tabla 2 se aprecia el promedio del rendimiento de fréjol solubilizado a pH 8,0 y precipitado a diferentes pH, los datos obtenidos de pesos y rendimientos se aprecian en el ANEXO B.

Tabla 2. Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol a diferentes pH.

	X	S²	S	C v
pH 3,0	31,12^a	1,04	1,02	3 %
pH 4,0	28,94 ^a	3,24	1,80	6 %
pH 5,0	28,70 ^a	8,07	2,84	10 %
pH 6,0	30,50 ^a	0,34	0,59	2 %

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales (BIO-PROPEPTI), FCIAL –UTA.

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los rendimientos de los concentrados proteicos de fréjol, obtenidos a diferentes pH de precipitación ($p < 0,05$ Tukey Test).

Luego de obtener los concentrados proteicos, se determinó el porcentaje de rendimiento. Se aprecia que los rendimientos obtenidos por pH son casi similares, entonces se aplicó un análisis estadístico, de donde se concluye que el pH de precipitación utilizado no influye significativamente en el rendimiento de los concentrados. Adicionalmente se realizó una prueba de rangos múltiples y se corroboró que no existe diferencias significativas estos análisis se encuentran detallados en el ANEXO B. **Morán (2017)**, obtuvo un rendimiento entre 8,66 % hasta 14,43 % a pH precipitación de entre de 3,0 7,0.

Por otro lado **Teniente et al., (2016)**, obtuvieron aislados de fréjol morado y negro con rendimientos de 93.14 y 94.53 % respectivamente, ellos señalan que la variación del rendimiento de especies vegetales podría estar ligada directamente a que la

extracción de proteína por precipitación isoeléctrica depende de la pureza y variedad de los reactivos utilizados para el ajuste de pH correspondiente.

3.1.1.2 Quinoa Tunkahuan

En la tabla 3 se aprecia el promedio de los rendimientos de concentrados proteicos de quinoa solubilizados a pH 8,0 y precipitados a diferentes pH. Los datos obtenidos de se presentan en el ANEXO B.

Tabla 3. Rendimiento de los concentrados proteicos de quinoa a diferentes pH.

	X	S²	S	C v
pH 3,00	6,53 ^a	0,07	0,27	4 %
pH 4,00	6,86^a	0,19	0,44	6 %
pH 5,00	6,48 ^a	0,13	0,36	6 %
pH 6,00	6,49 ^a	0,07	0,27	4 %

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales (BIO-PROPEPTI), FCIAL –UTA.

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras iguales indican que no existe diferencias significativas entre los rendimientos de los concentrados proteicos de quinoa, obtenidos a diferentes pH de precipitación ($p < 0,05$ Tukey Test).

De la misma manera en el caso de la quinoa se obtuvo valores similares de rendimiento para los diferentes pH se aplicó un análisis estadístico (ANEXO B) que mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa en el rendimiento respecto a los pH de precipitación. El mejor rendimiento fue obtenido a pH 4,0 con un valor de 6,86 %, estos resultados son similares a los reportados por **Toapanta (2016)**, que trabajo a las mismas condiciones que el presente estudio en quinoa y obtuvo mayor rendimiento a pH 4,0 con un porcentaje de 6,29. **Callisaya et al., (2009)**, también reportaron un mayor rendimiento de proteína de quinoa a pH entre 3,02 y 4,50.

3.1.2 Cuantificación de los concentrados proteicos

3.1.2.1 Fréjol rojo moteado

3.1.2.1.1 Método Biuret

Tabla 4. Porcentaje de pureza de concentrados proteicos de fréjol por el método Biuret (Mejor tratamiento).

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
R1	72,64	73,84	71,94	81,57
R2	70,62	72,80	71,94	79,85
R3	73,67	73,37	71,41	80,22
R4	72,31	73,40	72,10	80,22
X	72,31 ^a	73,10 ^a	71,85 ^a	80,46^b
S	1,27	0,65	0,3	0,8
C v	1,8%	0,9%	0,4%	1%

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

En la tabla 4 se aprecia los porcentajes de pureza de proteína en las matrices a través del método de Biuret, (con una curva estándar de pepsina ANEXO C). Una concentración alta de proteína se debe a la presencia de sustancias que contienen dos o más uniones peptídicas consecutivas en sus moléculas, detectado por el método utilizado (Iribarren et al., 2017). El mejor tratamiento se obtuvo a pH 6,0 con un valor de 80,46%, mientras que para los demás pH se obtuvo valores menores. Se aplicó un ANOVA de un solo factor donde se aprecia una diferencia significativa entre los pH de precipitación. Con el fin de identificar los pH que son estadísticamente significativos se aplicó una prueba de comparación de rangos múltiples y se apreció que no existen diferencias entre los pH 3,4 y 5,0 mientras que en el pH 6,0 existió diferencia significativa ya que el valor obtenido es mayor al de los demás pH.

3.1.2.1.2 Método instrumental: Determinación del contenido total de nitrógeno en fréjol (Análisis elemental)

Tabla 5. Porcentaje de proteína de fréjol obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método instrumental.

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
R1	45,94	47,81	44,50	50,63
R2	46,38	50,13	46,94	52,13
R3	47,44	49,44	45,81	50,75
X	46,58 ^{ab}	49,13 ^{bc}	45,75 ^a	51,17^c
S	0,77	1,19	1,22	0,83
C v	2%	2%	3%	2%

Letras diferentes indican diferencias significativas entre el % de proteína de los concentrados obtenidos a diferentes pH de precipitación. El % de proteína se obtuvo utilizando el factor de conversión: 6,25 ($p < 0,05$ Tukey Test).

En la tabla 5 se aprecia el porcentaje de proteína usando el método instrumental que donde se determinó que el mejor tratamiento es a pH 6,0 con un valor de rendimiento de 51,17 %. Se aplicó ANOVA de un solo factor y una prueba de comparación de rangos múltiples ANEXO C. A partir de estos análisis se apreció que no existen diferencias significativas entre los pH (3,0 – 4,0), (3,0 – 5,0) al igual que los pH (4,0 – 5,0) ya que los porcentajes de proteína son casi similares, mientras que los pH (3,0 – 6,0), (4,0 – 5,0) y (5,0 – 6,0) muestran diferencias significativas. **Morán (2017)**, cuantificó proteínas de fréjol por el método Dumas y obtuvo porcentajes de proteína de 69,056 %; 65,539 %; 64,475 % y 57,533 % para pH 6,0, 4,0, 3,0 y 5,0 respectivamente. Los valores obtenidos en este estudio presentan la misma tendencia para ambos métodos indicando el mejor rendimiento de proteína a pH 6,0. Debido a que las proteínas que se encuentran en mayor proporción en leguminosas son las albuminas y globulinas, el punto isoeléctrico de las misma es alrededor de pH 5,0; sin embargo, **Teniente et al., (2016)**, menciona que el punto isoeléctrico de las proteínas mencionadas varía de acuerdo a la leguminosa estudiada y a la calidad de los reactivos utilizados en la precipitación y en la cuantificación.

3.1.2.2 Quinua Tunkahuan

3.1.2.2.1 Método Biuret

La determinación Mediante el método de Biuret para quinua desengrasada se obtuvo el mejor porcentaje de proteína a pH 4,0 (tabla 6) con un valor de 70,51%, dicho porcentaje es muy similar al reportado por **Tapia et al., (2016)**, quienes realizaron un estudio en quinua tunkahuan INIAP, la cantidad de proteína fue determinada por método Biuret con una curva estándar de albúmina sérica de bovino, este estudio fue realizado únicamente a pH 4,0 con un porcentaje de 70,24% para quinua desengrasada, así mismo el valor obtenido en esta investigación es similar al reportado por **Nazate (2016)**, quien obtuvo un valor de 66,21 % a pH 4,0 mediante el método Kjeldahl.

Tabla 6. Porcentaje de proteína y desviación estándar de quinua obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método Biuret (Mejor tratamiento).

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
R1	65,99	69,53	57,87	58,87
R2	66,33	69,99	58,21	59,55
R3	67,01	72,02	57,21	59,03
X	66,44 ^a	70,51^b	57,77 ^c	59,15 ^c
S	0,52	1,32	0,51	0,35
C v	1%	2%	1%	1%

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

Los valores de las medias, desviación estándar y coeficiente de variación se reportan en la tabla 6, se aplicó un anova de un solo factor y una prueba de comparación, se identificó que no existe una influencia estadísticamente significativa entre los pH 5,0 – 6,0 ya que los valores obtenidos son similares, sin embargo, entre los demás pH existió diferencias estadísticamente significativas ANEXO C.

3.1.2.2.2 Método instrumental: Determinación del contenido total de nitrógeno (Análisis elemental)

En la cuantificación mediante el método instrumental tabla 7, se aprecia que el mejor tratamiento es a pH 4,0 con una cantidad de 55,54%, que es similar al valor obtenido

por **Toapanta (2016)**, quién, en su estudio de quinua reportó un porcentaje de proteína de 52,4 % a pH este valor fue determinado mediante el método BCA.

En la Tabla 7 se reportó los porcentajes de proteína, medias, desviación estándar y coeficiente de variación de la cantidad de proteína presente en cada pH de precipitación, también se aplicó un análisis estadístico de un solo factor y una prueba de comparación ANEXO C, entonces se apreció que no existen diferencias significativas entre los pH 3,0 – 4,0 al igual que en los pH 5,0 – 6,0 mientras que para la combinación de los demás pH existió diferencias significativas ya que existe una amplia diferencia entre los porcentajes obtenidos.

Tabla 7. Porcentaje de proteína de quinua obtenido a diferentes pH de precipitación mediante el método instrumental.

	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
R1	52,88	55,19	44,50	45,94
R2	54,31	56,69	45,88	48,19
R3	54,00	54,75	45,19	46,88
X	53,73 ^a	55,54^a	45,19 ^b	47,00 ^b
S	0,76	1,02	0,69	1,13
C v	1%	2%	2%	2%

Letras diferentes indican diferencias significativas entre el % de proteína de los concentrados obtenidos a diferentes pH de precipitación. El % de proteína se obtuvo utilizando el factor de conversión: 6,25 ($p < 0,05$ Tukey Test).

En los dos métodos aplicados para la determinación del contenido de proteína de quinua se obtuvo el mejor resultado a pH 4,0 seguido de los pH 3,0, 6,0 y 5,0.

3.1.3 Hidrolizados

En base a la cantidad de proteína cuantificada por ambos métodos, se realizó la hidrolización a partir de los concentrados de proteína a pH 6,0 y 4,0 para fréjol y quinua respectivamente, con el fin de determinar las actividades biológicas presentes en los péptidos obtenidos al hidrolizar los concentrados de proteína.

3.1.4 Caracterización por electroforesis Native- PAGE y SDS-PAGE.

Los concentrados de quinua y fréjol fueron sometidos a dos tipos de electroforesis que corresponden a nativa (Native- PAGE) y desnaturalizante (SDS-PAGE) para esta última se analizó las proteínas que forman parte de las matrices en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol que es un agente reductor.

3.1.4.1 Caracterización electroforética de fréjol rojo moteado

En la figura 4 se aprecia la electroforesis de la proteína nativa de fréjol, en la primera banda desde la izquierda se corrió el estándar de peso molecular entre 15 – 250 kDa que ayudó a identificar el peso molecular de las proteínas presentes en los concentrados. Se observa que las bandas identificadas en todos los pH de precipitación son idénticas, de lo que se infiere que se puede obtener el mismo tipo de proteínas nativas a dichos pH.

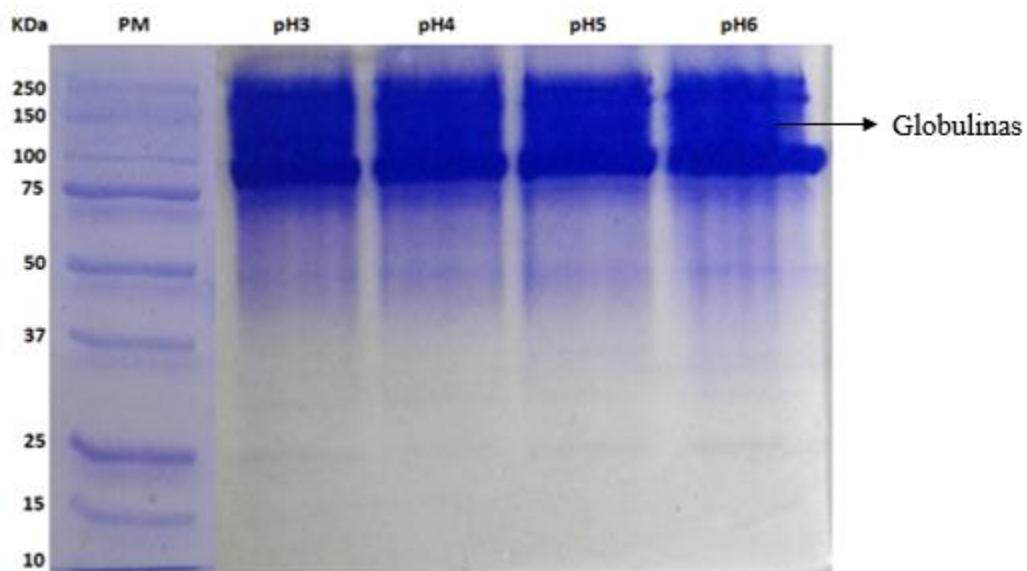


Figura 4. Electroforesis Native-PAGE, de concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.

Las bandas obtenidas fueron comparadas con un estándar molecular (15-250 kDa) de marca Bio-Rad® y nombradas de acuerdo al mismo, (columna de la izquierda en todas las figuras de electroforesis), además de acuerdo con trabajos previos.

Las bandas que se obtuvieron están entre 48 – 250 kDa, pero existen bandas con mayor intensidad entre 75 – 250 kDa, estas proteínas podrían corresponder a globulinas

debido a que **Achouri et al., (2012)**, en su investigación obtuvieron proteínas con un peso molecular entre 66 – 300 kDa y las denominaron globulinas. Además **Poveda (2016)**, obtuvo proteínas nativas de sésamo en un rango entre 48 y 198 kDa, las bandas con mayor intensidad fueron las de 140 kDa que las denomino globulinas.

En la figura 5 se observa el perfil de proteínas precipitadas a diferentes pH, esto se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE que consiste en someter a las proteínas a una migración en un campo eléctrico en presencia de un detergente aniónico en este caso SDS, lo que provoca la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas o desnaturalización (**Rivera, 2006**). La electroforesis se la realizó en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol, se observan bandas con mayor intensidad a pesos moleculares entre 39 – 48 kDa y entre 28 – 32 kDa para subunidades básicas y acidas de globulinas 11S respectivamente.

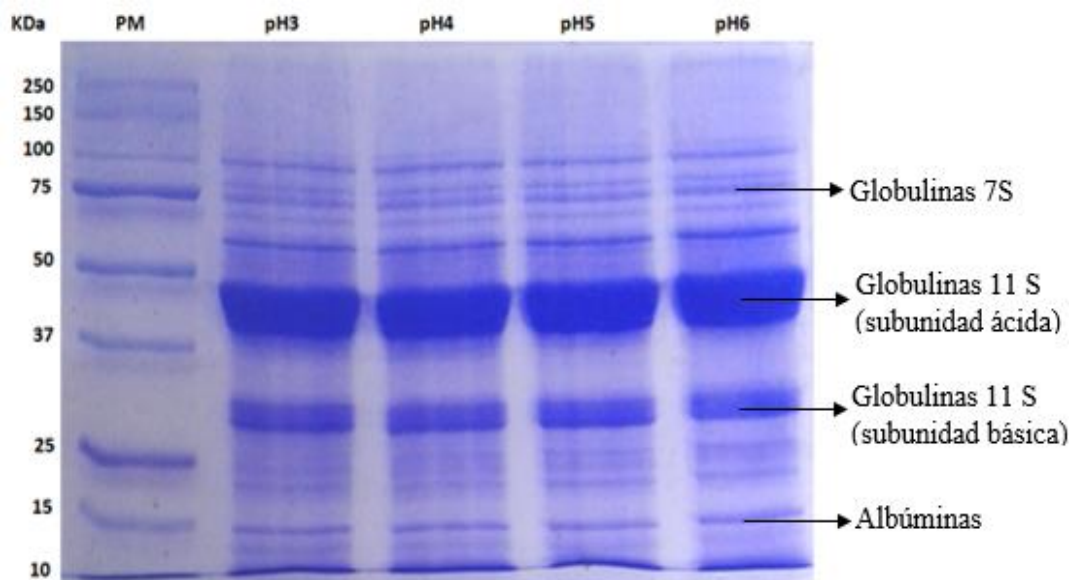


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de los concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.

Estos resultado son similares a los obtenidos por **Camacho et al., (2010)**, quienes realizaron electroforesis desnaturalizante en presencia y ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol en 3 variedades de fréjol y obtuvieron proteínas con un peso molecular de 30 y 50 kDa que corresponden a faseolinas y lectinas respectivamente. Además en la figura 5 se aprecia la presencia de proteínas con menor intensidad en rangos menores a 14 kDa que corresponden a albúminas y entre 60 – 100 kDa que

podrían ser globulinas, estos resultado difieren levemente de la investigación realizada por **Morán (2017)**, que obtuvo perfiles de proteína en fréjol rojo moteado bajo las mismas condiciones de esta investigación y reportó una banda de 30 y 50 kDa, las bandas entre 60 – 100 kDa se observan ligeramente y no obtuvo bandas menores a 14 kDa, se infiere que esta variación depende de la variedad del fréjol.

También se llevó a cabo electroforesis desnaturalizante en ausencia de agente reductor. En la figura 6 se observan bandas de proteínas comprendidas entre los mismos límites de pesos moleculares, las albúminas con un peso molecular menor a 14 kDa se observan con menor intensidad. Por otra parte, las globulinas 11S que tienen subunidades básicas y ácidas se observan claramente en los mismos rangos que en presencia de agente reductor, esto indica que las proteínas no están unidas mayoritariamente por puentes disulfuro. Estos resultados fueron corroborados con los estudios realizados por (**Camacho et al., 2010; Morán, 2017**), quienes en sus respectivos estudios mencionan que los perfiles electroforéticos de proteínas presentes en fréjol son similares tanto en presencia como en ausencia del agente reductor.

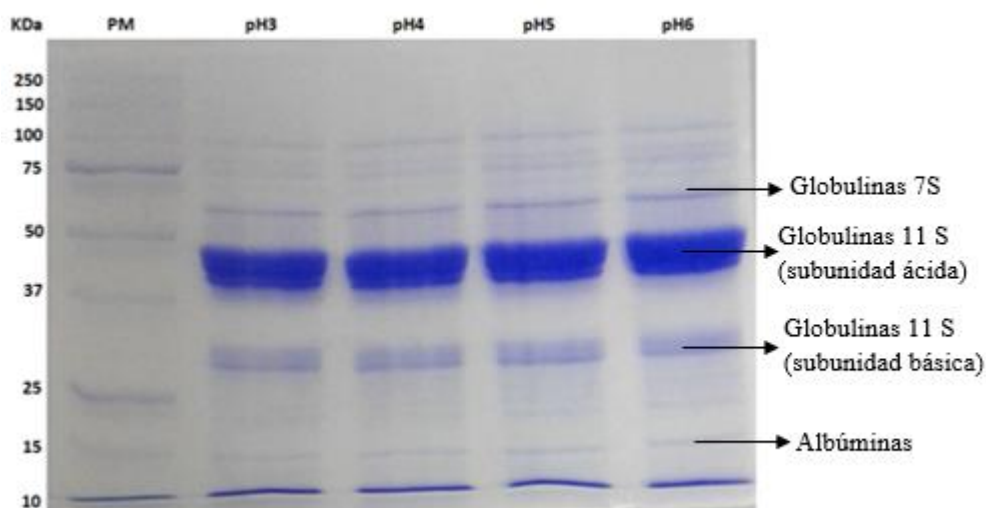


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de los concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.

3.1.4.2 Caracterización electroforética de quinua Tunkahuan

En la figura 7 se observa el perfil electroforético en ausencia del agente desnaturalizante SDS de quinua, se aprecia el mismo perfil para todos los pH, sin embargo, en el pH 3,0 la banda obtenida es más tenue, en los demás pH existe el mismo tipo de proteínas, pero se encuentran en mayor proporción. **Abugoch et al., (2008)**,

mencionan que en los granos de quinua las principales fracciones de proteína corresponden a globulinas y albuminas. Así mismo, según **Brinegar et al., (1993)**, las proteínas de quinua como las globulinas 11S poseen dos subunidades o conjuntos heterogéneos de polipéptidos de tamaños comprendidos entre 30 – 40 kDa subunidades ácidas y 20 – 25 kDa subunidades básicas, y las albuminas 2S están en un tamaño entre 8 – 9 kDa, ambos tipos de proteínas están ligadas por enlaces disulfuro en la proteína de forma nativa. En distintos cereales se ha encontrado proteínas de reserva del tipo globulinas 11S, cuyo peso molecular fluctúa entre 150 – 190 kDa (**Espitia et al., 2016**).

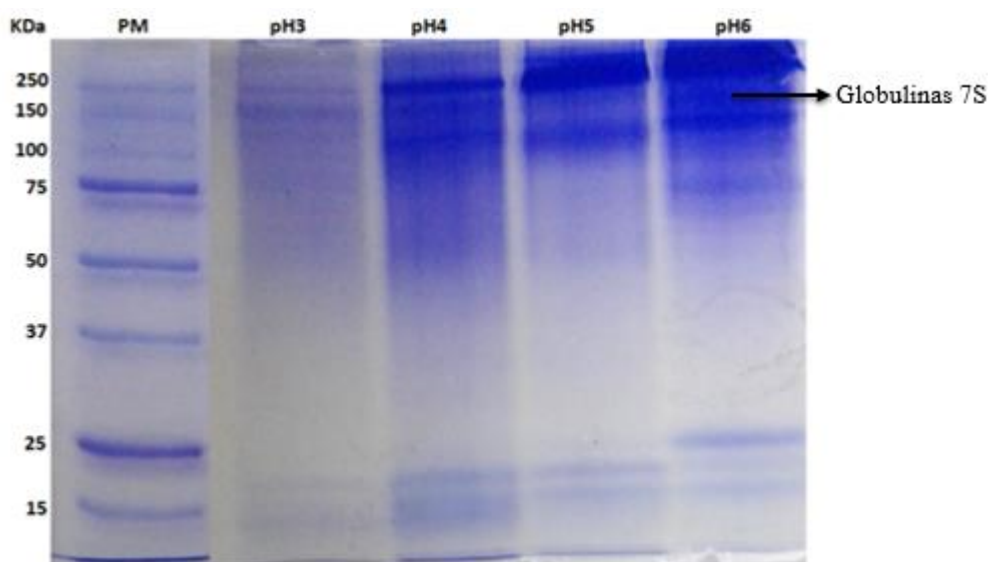


Figura 7. Electroforesis Native-PAGE, de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.

Por tal motivo, las proteínas nativas de quinua (figura 7) se denominaron globulinas ya podrían ser proteínas que tienen menor carga negativa o mayor tamaño, además se observan bandas muy tenues de globulinas 11S y albúminas.

En la figura 8 se aprecia el perfil electroforético de quinua en presencia del agente desnaturizante SDS y con 2-mercaptoetanol que actúa como agente reductor. Las bandas obtenidas van desde 13 a 70 kDa para todos los pH, las que se aprecian con mayor intensidad corresponden a albúminas con pesos moleculares entre 13 – 17 kDa y las de menor intensidad podrían ser globulinas 7S con un peso aproximado de 75 kDa. Por otra parte, se observan subunidades de globulinas 11S con pesos moleculares

entre 28 – 35 kDa para básicas y 50 kDa para ácidas. Estos resultados son similares a las reportados por **Abugoch et al., (2008)**, quienes realizaron una investigación sobre algunas propiedades fisicoquímicas y funcionales de los aislados de proteínas de quinua y reportaron que las proteínas con un peso molecular de 60 kDa corresponden a globulinas 7S, las que tienen un peso molecular entre 33 – 36 kDa y entre 20 – 22 kDa corresponden a subunidades ácidas y básicas de globulinas 11S respectivamente, mientras que las de un peso molecular bajo (< 14,4 kDa) corresponden a albúminas.

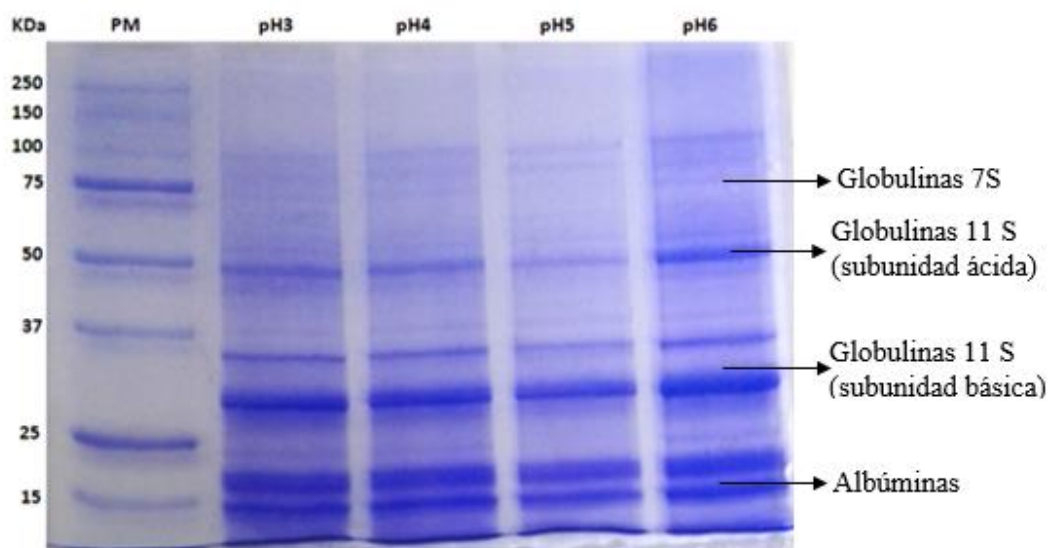


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.

Además **Toapanta (2016)**, obtuvo fracciones de proteína de quinua en presencia de agente reductor a diferentes pH y reportó bandas correspondientes a globulinas 7S con un peso molecular aproximado de 66 kDa, 11S globulinas acida con peso cercano a 36 kDa, 11S globulinas básicas con peso de 22 kDa y 2S albúminas con pesos moleculares menores a 14,4 kDa.

En la figura 9 se aprecia el perfil electroforético con SDS-PAGE de proteínas de quinua en ausencia del agente reductor, se observan bandas que podrían corresponder a globulinas 7 S con un peso molecular aproximado de 60 kDa, globulinas 11S subunidades ácidas y básicas con pesos aproximados de 50 y 30 kDa respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por **Toapanta (2016)**, que trabajo con proteínas de quinua a diferentes pH de precipitación con agente desnaturizante, en ausencia del agente reductor e identificó fracciones de alta intensidad a 45 kDa, a 28

kDa y un conjunto de bandas en un peso aproximado entre 14 y 28 kDa para todos los pH.

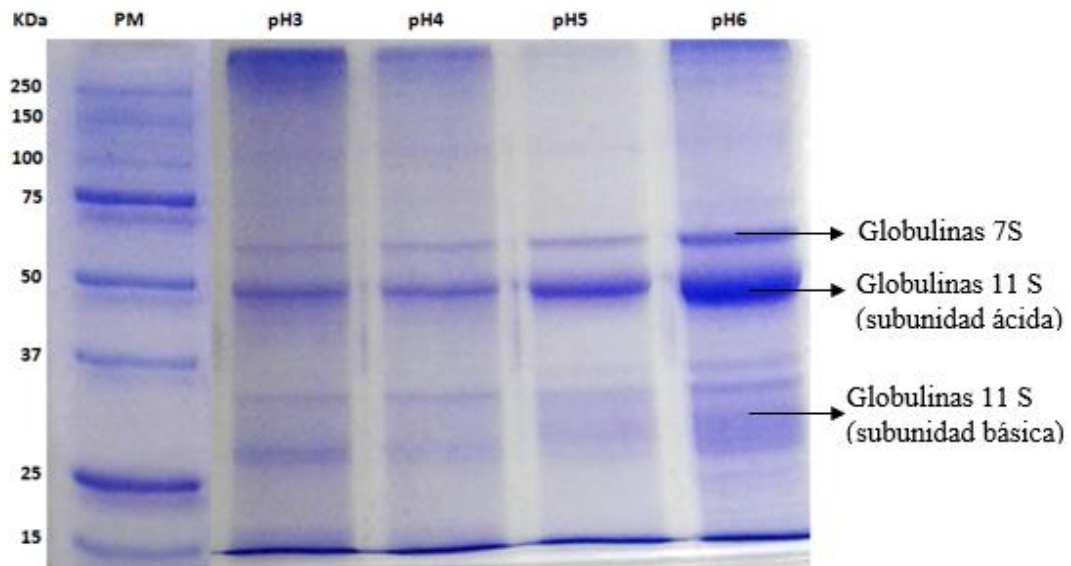


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.

Se observaron marcadas diferencias entre las fracciones de proteína de quinua en presencia o ausencia del agente reductor (figuras 8 y 9), esto se debe a la presencia de grupos disulfuro en la cadena polipeptídica que ayudan a estabilizar de manera inter e intramolecular la estructura primaria y secundaria de las proteínas, sin embargo al añadir 2-mercaptoetanol estos enlaces se rompen y se obtienen bandas con diferentes pesos moleculares (**Gajardo, 2005**). Se observa que en el gel sin agente reductor (figura 9) existe menor cantidad de bandas, mientras que en el gel se añadió el agente reductor (figura 8), aparecieron nuevas bandas debido a que los grupos disulfuro se rompen dando lugar a fracciones de proteína con menor peso molecular.

En los geles electroforéticos presentados en esta investigación las bandas observadas fueron denominadas globulinas 7S, albúminas y globulinas 11S en sus subunidades básicas y ácidas. Sin embargo; no es posible establecer que las bandas encontradas pertenecen específicamente a ese tipo de proteínas ya que para asegurar esto es necesario realizar análisis minuciosos utilizando anticuerpos.

3.1.4.3 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE.

En la figura 10 se observan las bandas de concentrados proteicos y de la simulación de la digestión duodenal a pH 2 (tanto de fréjol como de quinua), los hidrolizados fueron obtenidos de los mejores pH de cuantificación.

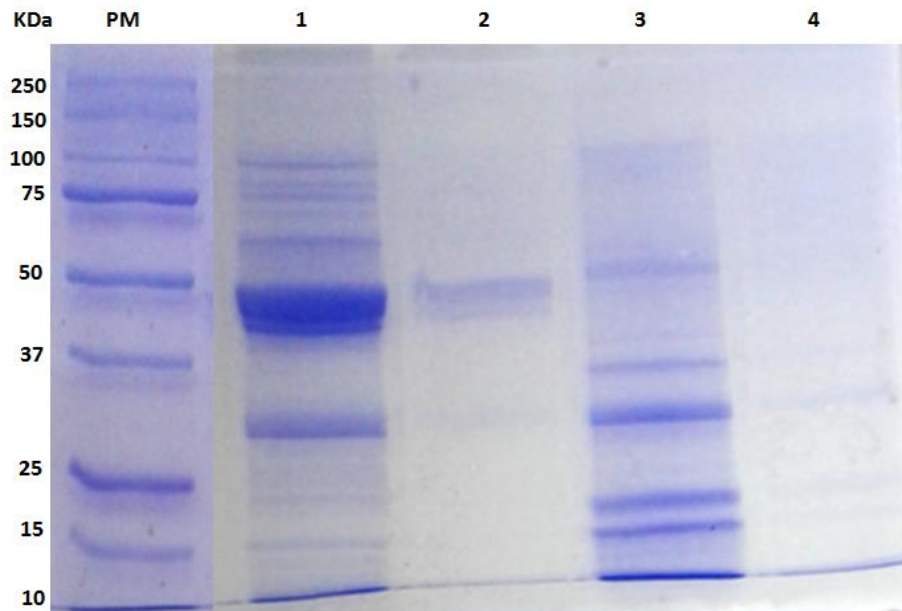


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de concentrados e hidrolizados de proteínas de fréjol y quinua.

Columna 1: proteína de fréjol aislada a pH6, columna 2: hidrolizado de fréjol, columna 3: proteína de quinua aislada a pH4, columna 4: hidrolizado de quinua

Un estudio realizado por **Carrillo, (2014)** indica que la digestión de proteínas puede ser útil para identificar si presentan o no un potencial alergénico, ya que en su investigación menciona que las proteínas alergénicas fueron estables a 60 min, por otra parte, las proteínas no alergénicas se digirieron rápidamente. Bajo este concepto se puede apreciar que la mayor cantidad de proteína son digeridas y no poseen un potencial alergénico. Existe una proteína de un peso molecular 48 kDa aproximadamente en el hidrolizado de fréjol que no se digiere en su totalidad. Además **Genovese et al., (1998)** menciona que la proteína faseolina que tiene un peso molecular de 50 kDa es muy resistente a la digestión *in vitro*. También claramente se observa que los hidrolizados de fréjol y quinua no presentan resistencia a la hidrolisis por lo tanto son digeridos casi en su totalidad.

3.1.5 Actividades biológicas

3.1.5.1 Actividad antioxidante

3.1.5.1.1 Quinoa Tunkahuan mediante el método TBARS.

La actividad antioxidante de los concentrados de quinoa e hidrolizado frente a BHT fue evaluada mediante el método TBARS, es así que en el ANEXO D se aprecia la actividad antioxidante de los concentrados, también el análisis estadístico de un solo factor que indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad antioxidante obtenida a diferentes pH de precipitación y el porcentaje de actividad antioxidante del BHT e hidrolizado respectivamente, mientras que el análisis estadístico del mejor concentrado, el hidrolizado y BHT se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de actividad antioxidante del concentrado a pH 4,0 e hidrolizado de quinoa frente a BHT.

	Concentración (µg/mL)			
	100	200	500	1000
Factores	Concentrado frente a diclofenaco			
pH 4	2,99 ^{Aa} ± 0,08	4,64 ^{Ab} ± 0,15	5,35 ^{Ac} ± 0,26	9,09 ^{Ad} ± 0,18
BHT	22,54 ^{Ba} ± 0,29	25,86 ^{Bb} ± 1,49	45,42 ^{Bc} ± 0,44	80,36 ^{Bd} ± 0,66
	Hidrolizado frente a diclofenaco			
Hidrolizado	13,41 ^{Xw} ± 0,32	29,27 ^{Xx} ± 0,28	33,33 ^{Xy} ± 0,46	42,28 ^{Xz} ± 0,30
BHT	22,54 ^{Yw} ± 0,29	25,86 ^{Yx} ± 1,49	45,42 ^{Yy} ± 0,44	80,36 ^{Yz} ± 0,66

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Letras mayúsculas diferentes ^{A, B} y ^{X, Y} indican diferencias significativas en el % de actividad antioxidante de quinoa entre el concentrado frente a BHT y el hidrolizado frente a BHT respectivamente.

Letras minúsculas diferentes ^{a, b, c, d} y ^{w, x, y, z} indican diferencias significativas en el % de actividad antioxidante de quinoa entre las concentraciones utilizadas en concentrado frente BHT y en hidrolizado frente a BHT respectivamente (p<0,05 Tukey Test).

La actividad obtenida en concentrados proteicos a los diferentes pH es relativamente baja, lo cual indica que los concentrados no son capaces de inhibir los procesos oxidativos. Los resultados obtenidos son aceptables y se corroboran con investigaciones realizadas por (Vilcacundo, 2017; Toapanta, 2016), quienes estudiaron la actividad antioxidante en aislados quinoa mediante el método ORAC y reportaron que no existió dicha actividad.

Cobo (2016), menciona que los péptidos derivados de los concentrados de proteínas vegetales con actividad antioxidante son beneficiosos para la salud ya que ayudan a prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como obesidad y cáncer. Se hidrolizó la proteína de quinua a pH 4,0 mediante la acción de las enzimas pepsina y pancreatina. En el ANEXO D también se aprecia que la actividad más alta se obtuvo a una concentración de 1000 µg/mL con un valor de 42,28 % a pH 2. a la misma concentración el BHT tiene una mayor actividad con un valor de 80,36 %, sin embargo; altas concentraciones de BHT causa alergia y efectos cancerígenos, por lo cual se ha prohibido su uso en países como Australia, Japón y Unión Europea (**Iglesias, 2009**). (**Poveda, 2016**) en su investigación determinó la actividad antioxidante de sésamo mediante el método TBARS, utilizó BHT como control positivo y obtuvo un valor de 64,29% a una concentración de 1000 µg/mL. Por otra parte (**Toapanta, 2016**) reportó que no existe actividad antioxidante en hidrolizados de quinua a pH 1,2 utilizando el método ORAC **Carrillo et al., (2015)**, mencionan que la quinua podría ser una excelente fuente de compuestos bioactivos con actividad antioxidante para proteger de la oxidación tanto a los alimentos procesados como a las células presentes en el organismo cuando son ingeridas en la dieta.

Se aplicó un diseño experimental A * B, pruebas de rangos múltiples por factores y por concentración entre el concentrado a pH 4,0 respecto al control positivo y el hidrolizado con respecto a BHT estos análisis están sustentados en el ANEXO D. Se apreció que existen diferencias significativas al comparar el concentrado o el hidrolizado con el control positivo, ya que los resultados de la matriz en sus respectivos estados son menores al BHT, por otra parte, también existió diferencias entre el concentrado a pH 4,0 con respecto al hidrolizado que arrojó una actividad antioxidante más elevada que el concentrado. Además, existen diferencias entre las concentraciones utilizadas para el concentrado o hidrolizado con respecto a la actividad antioxidante.

3.1.5.2 Actividad antiinflamatoria

3.1.5.2.1 Fréjol rojo moteado

La actividad antiinflamatoria se determinó mediante el método de desnaturalización proteica de albumina de huevo, se obtuvo dicha actividad para todos los pH de precipitación y se aplicó un análisis estadístico de un solo factor, en el cual se identificó

un mayor porcentaje de inhibición con un valor de 18,03% a pH 6,0 estos resultados fueron detallados en el ANEXO E.

(Poveda, 2016; Quinteros, 2016) determinaron actividad antiinflamatoria en sésamo y sachá inchi respectivamente, mediante el método de desnaturalización proteica de huevo, utilizaron diclofenaco como control positivo y obtuvieron una actividad de 79,24% a una concentración de 1000 ($\mu\text{g/mL}$), que es un valor similar al obtenido en esta investigación (64,11%) a la misma concentración, además reportaron una actividad 36,33% para sésamo a pH 6 y una concentración de 1000 ($\mu\text{g/mL}$) y 18,94% para sachá inchi a pH 4 y una concentración de 500 ($\mu\text{g/mL}$), tanto estas matrices como el fréjol están catalogadas como leguminosas, sin embargo la actividad obtenida varía levemente debido a que son una especie diferente.

En la tabla 9 se observa el porcentaje de inhibición presente en el concentrado con mejor actividad (pH 6,0) e hidrolizado sobre la desnaturalización de la albumina de huevo frente a diclofenaco líquido (25 mg/mL) que fue el control positivo utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro*. Se aplicó un diseño A * B con el cual se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas tanto en el concentrado como en el hidrolizado respecto al diclofenaco, lo cual indica que los valores obtenidos varían considerablemente al utilizar el hidrolizado o el concentrado, además se aplicó pruebas de rangos múltiples que indicaron que existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas respecto al mejor concentrado y al hidrolizado, resultados que están detallados en el ANEXO E.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de concentrado a pH 6,0 e hidrolizado de fréjol frente a diclofenaco.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
	100	200	500	1000
Factores	Concentrado frente a diclofenaco			
pH 6	5,10 ^{Aa} \pm 0,28	10,02 ^{Ab} \pm 0,29	13,06 ^{Ac} \pm 0,17	18,03 ^{Ad} \pm 0,20
Diclofenaco	17,77 ^{Ba} \pm 0,29	32,31 ^{Bb} \pm 1,49	45,01 ^{Bc} \pm 0,44	64,11 ^{Bd} \pm 0,66
	Hidrolizado frente a diclofenaco			
Hidrolizado	10,15 ^{Xw} \pm 0,56	16,00 ^{Xx} \pm 0,36	23,37 ^{Xy} \pm 0,32	30,90 ^{Xz} \pm 0,43
Diclofenaco	17,77 ^{Yw} \pm 0,29	32,31 ^{Yx} \pm 1,49	45,01 ^{Yy} \pm 0,44	64,11 ^{Yz} \pm 0,66

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones \pm la desviación estándar.

Letras mayúsculas diferentes ^{A, B} y ^{X, Y} indican diferencias significativas en el % de actividad antiinflamatoria de fréjol entre el concentrado frente diclofenaco y el hidrolizado frente a diclofenaco respectivamente.

Letras minúsculas diferentes ^{a, b, c, d} y ^{w, x, y, z} indican diferencias significativas en el % de actividad antiinflamatoria de fréjol entre las concentraciones utilizadas en concentrado frente diclofenaco y en hidrolizado frente a diclofenaco respectivamente ($p < 0,05$ Tukey Test).

La inflamación es causada por agentes físicos, químicos o biológicos y es una respuesta protectora del tejido vascularizado a una lesión, actúa liberando el organismo de elementos causantes de daño celular como toxinas y microbios (**Enciso et al., 2011**). **Cobo (2016)**, señala que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como el diclofenaco cumplen la función de impedir la acción de mediadores de la inflamación a nivel central y periférico. El uso prolongado de los AINES puede causar úlceras gástricas y duodenales ya que inhiben las enzimas encargadas de proteger la mucosa gástrica (**Cucurí, 2017**).

Se demostró la existencia de actividad antiinflamatoria en concentrados e hidrolizados de fréjol y quinua que podrían ser una alternativa para sustituir parcialmente los fármacos. Se aprecia que el porcentaje de actividad antiinflamatoria es directamente proporcional a la concentración utilizada, se evidenció una mayor actividad antiinflamatoria en el hidrolizado con respecto a los concentrados de fréjol (ANEXO E), sin embargo; en los dos casos se obtuvo una actividad menor al diclofenaco a las mismas concentraciones, la desnaturalización proteica de la albumina de huevo provoca un efecto inflamatorio el cual es contrarrestado con la actividad antiinflamatoria presente en fuentes vegetales (**Alhakmani et al., 2013**).

3.1.5.2.2 Quinua Tunkahuan

Se estableció también la actividad antiinflamatoria presente en quinua tunkahuan a diferentes pH de precipitación, se aplicó un análisis estadístico de un solo factor y se apreció una mayor actividad en el pH 4,0, razón por la cual se hidrolizo las proteínas de quinua a este pH y se comparó tanto el concentrado a pH 4,0 como el hidrolizado con diclofenaco de sodio. En la tabla 10 se observa la actividad antiinflamatoria presente en el concentrado con mayor actividad (pH 4,0) e hidrolizado, frente a diclofenaco líquido (25 mg/mL).

Se empleó un diseño A * B por medio del cual se apreció que tanto en el concentrado como en el hidrolizado respecto al diclofenaco los valores obtenidos son menores al control positivo diclofenaco, todos los datos y análisis estadísticos mencionados se aprecian en el ANEXO E.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria de concentrado a pH 4,0 e hidrolizado de quinua frente a diclofenaco.

	Concentración (µg/mL)			
	100	200	500	1000
Factores	Concentrado frente a diclofenaco			
pH 4	1,81 ^{Aa} ± 0,08	7,47 ^{Ab} ± 0,15	13,21 ^{Ac} ± 0,26	21,56 ^{Ad} ± 0,18
Diclofenaco	17,77 ^{Ba} ± 0,29	32,31 ^{Bb} ± 1,49	45,01 ^{Bc} ± 0,44	64,11 ^{Bd} ± 0,66
	Hidrolizado frente a diclofenaco			
Hidrolizado	4,16 ^{Xw} ± 0,32	12,15 ^{Xx} ± 0,28	18,76 ^{Xy} ± 0,46	25,35 ^{Xz} ± 0,30
Diclofenaco	17,77 ^{Yw} ± 0,29	32,31 ^{Yx} ± 1,49	45,01 ^{Yy} ± 0,44	64,11 ^{Yz} ± 0,66

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Letras mayúsculas diferentes A, B y X, Y indican diferencias significativas en el % de actividad antiinflamatoria de quinua entre el concentrado frente a diclofenaco y el hidrolizado frente a diclofenaco respectivamente.

Letras minúsculas diferentes a, b, c, d y w, x, y, z indican diferencias significativas en el % de actividad antiinflamatoria de quinua entre las concentraciones utilizadas en concentrado frente a diclofenaco y en hidrolizado frente a diclofenaco respectivamente (p<0,05 Tukey Test).

Carrillo et al., (2015) en su investigación señalan que la quinua es una excelente fuente de compuestos bioactivos y que los componentes aislados de este pseudocereal presentan múltiples actividades biológicas, tales como, antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antitumoral y antihipertensiva. Hasta la actualidad no existen datos reportados de actividades antiinflamatorias en quinua tunkahuan. Sin embargo, **Lozano (2014)**, menciona que las saponinas son compuestos anti-nutricionales presentes en la quinua y que confieren actividades biológicas, por tal motivo, en esta investigación las saponinas fueron eliminadas, además este mismo autor menciona que los componentes bioactivos que tienen actividad antioxidante, son capaces de inhibir o prevenir procesos inflamatorios.

Suarez et al., (2016) estudiaron los efectos antiinflamatorios en granos de amaranto en un modelo de ratón transgénico que reacciona inmunológicamente a la ovoalbúmina oral produciendo cantidades elevadas de inmunoglobulina, al ser un pseudocereal similar a la quinua se infiere que esta también posee dicha actividad. **Carrillo et al.,**

(2015) mencionan que el amaranto y la quinua poseen diferentes actividades biológicas tales como: antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y pueden ser una excelente fuente de compuestos bioactivos. Los valores de actividad antiinflamatoria obtenidos tanto de concentrados como de hidrolizado son menores a los obtenidos del diclofenaco, sin embargo, **Martínez et al., (2013)** señalan que el uso de los antiinflamatorios artificiales como el diclofenaco no es recomendado para el organismo ya que presentan toxicidad renal y gastrointestinal, esto se debe a que al ser ingerido vía oral se dispersan en las células gástricas y una vez cumplida su función en el organismo, se eliminan vía renal como metabolismo, por tal motivo la necesidad de encontrar fuentes vegetales con efectos antiinflamatorios.

3.1.5.3 Actividad antimicrobiana

Se estableció que no existe actividad antimicrobiana en los concentrados analizados en esta investigación como se observa en las fotografías obtenidas de los concentrados contra microorganismos patógenos lo cual se reporta en las figuras presentadas en el ANEXO F para concentrados. **Ariaza (2014)**, estudio la actividad antimicrobiana de harinas, concentrados e hidrolizados de fréjol negro plus, azufrado higuera y pinto Saltillo, pero solo obtuvo resultados positivos en los hidrolizados. Además, cuando se hidrolizó las proteínas se obtuvo péptidos bioactivos que tiene entre 3 y 30 residuos de aminoácidos, los péptidos obtenidos de proteínas vegetales presentan actividad antimicrobiana tienen entre 5 y 6 residuos de aminoácidos con carga catiónica (**Carrillo et al., 2017**).

3.1.5.3.1 Fréjol rojo moteado

Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de fréjol se presentan en la tabla 11, el control positivo utilizado fue la gentamicina en una concentración de 500 µg/mL, se realizó el análisis estadístico de un solo factor y pruebas de rangos múltiples entre concentraciones de los microorganismos que presentaron actividad (ANEXO G).

Tabla 11. Datos obtenidos para la actividad antimicrobiana de hidrolizados a diferentes concentraciones de proteínas de fréjol frente a microorganismos patógenos, con un estándar de gentamicina.

Microorganismo	Con. (mg/mL)	Halo de inhibición (cm)			Promedio	Des. Esta	C.v.
		R1	R2	R3			
<i>E. coli</i> (-)	500	1,60	1,75	1,80	1,7 ^a	0,10	6,06
	375	1,15	1,10	1,20	1,2 ^b	0,05	4,35
	250	0,80	0,75	0,80	0,8 ^c	0,03	3,69
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,40	2,50	2,50	2,5	0,06	2,34
<i>P. aeruginosas</i> (-)	500	1,60	1,50	1,50	1,5 ^a	0,06	3,77
	375	1,30	1,30	1,25	1,3 ^b	0,03	2,25
	250	0,80	0,90	0,80	0,8 ^c	0,06	6,93
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,50	2,40	2,60	2,5	0,10	4,00
<i>B. cereus</i> (+)	500	2,00	1,85	1,90	1,9 ^a	0,08	3,98
	375	1,50	1,45	1,35	1,4 ^b	0,08	5,33
	250	0,65	0,65	0,70	0,7 ^c	0,03	4,33
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,80	2,70	2,80	2,8	0,06	2,09
<i>L. monocytogenes</i> (+)	500	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	375	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	250	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	3,00	3,00	2,90	3,0	0,06	1,95
<i>S. aureus</i> (+)	500	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	375	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	250	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	3,60	3,50	3,50	3,5	0,06	1,63

Letras diferentes indican diferencias significativas entre la concentración aplicada para cada microorganismo en la actividad antimicrobiana ($p < 0,05$ Tukey Test).

Se observa que los microorganismos susceptibles a la actividad antimicrobiana son *E. coli*, *P. aeruginosas* y *B. cereus* y que existe una relación directamente proporcional

entre la concentración utilizada y el halo de inhibición obtenido, los resultados indican que la concentración en la que se empieza a obtener resultados positivos es a partir de 250 mg/mL ANEXO F. Según la norma **CLSI M02-A12 (2015)**, los halos obtenidos se pueden clasificar según su diámetro es así que si éste es ≥ 20 mm se denomina sensible (S) e indica que el antimicrobiano genera inhibición sensible en las cepas, si esta entre 15-19 mm se cataloga como intermedio (I) e indica que el antibiótico puede funcionar bajo ciertas condiciones y si es ≤ 14 mm se denomina resistente (R) e indica que la cepa es resistente al agente antimicrobiano aplicado. Bajo este criterio se aprecia que los halos obtenidos de los hidrolizados de fréjol son intermedios en la mayor concentración para las cepas que presentan actividad, en cambio las cepas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* son catalogadas como resistentes ya que no se obtuvo actividad.

Investigaciones previas han demostrado que los microorganismos más susceptibles a los antibióticos son los Gram negativos, debido a que su pared celular está constituida por una delgada capa de peptidoglicano enlazada a una membrana exterior por lipoproteínas que pueden ser alteradas por proteínas de transporte y enzimas hidrolíticas, *B. cereus* es una excepción a este comportamiento ya que es un patógeno Gram positivo y teóricamente debería presentar resistencia a los antibióticos (**Ariaza, 2014**).

Bojórquez et al., (2013), estudio la actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados de fréjol y obtuvo resultados positivos contra *S. aureus*. **Ariaza (2014)**, determinó la actividad antimicrobiana de hidrolizados obtenidos de concentrados de tres variedades de fréjol, obtuvo resultados positivos contra *B. cereus* y *E. coli* con un diámetro de 10,0 y 8,4 mm para una concentración de 20 μ g, también clasifico todas las cepas estudiadas como resistentes, los resultados obtenidos en esta investigación son similares tomando en cuenta la diferencia en la concentración y la variedad de fréjol.

3.1.5.3.2 Quinoa Tunkahuan

Los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana en quinua y gentamicina se presentan en la tabla 12. Se aprecia que los hidrolizados obtenidos de quinua a partir del concentrado a pH 4,0, presentan actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosas* y *B. cereus*, estos microorganismos son catalogados como intermedios ya que en la mayor

concentración aplicada los halos se encuentran en un diámetro entre 15 - 19 mm, las fotografías que sustentan estos resultados se encuentran en ANEXO F.

Tabla 12. Datos obtenidos para la actividad antimicrobiana de hidrolizados a diferentes concentraciones de proteínas de quinua frente a microorganismos patógenos, con un estándar de gentamicina a una concentración de (500 ug/mL).

Microorganismo	Con. (mg/mL)	Halo de inhibición (cm)			Promedio	Des. Esta	C.v.
		R1	R2	R3			
<i>E. coli</i> (-)	500	1,50	1,60	1,40	1,5 ^a	0,10	6,67
	375	1,20	1,40	1,30	1,3 ^a	0,10	7,69
	250	0,80	0,90	0,80	0,8 ^b	0,06	6,93
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,30	2,50	2,50	2,4	0,12	4,75
<i>P. aeruginosas</i> (-)	500	1,50	1,50	1,60	1,5 ^a	0,06	3,77
	375	1,40	1,30	1,50	1,4 ^a	0,10	7,14
	250	0,90	1,00	0,90	0,9 ^b	0,06	6,19
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,50	2,50	2,70	2,6	0,12	4,50
<i>B. cereus</i> (+)	500	1,70	1,90	1,70	1,8 ^a	0,12	6,54
	375	1,00	0,90	1,00	1,0 ^a	0,06	5,97
	250	0,70	0,75	0,80	0,8 ^a	0,05	6,67
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,70	2,80	2,90	2,8	0,10	3,57
<i>L. monocytogenes</i> (+)	500	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	375	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	250	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	2,90	3,00	2,80	2,9	0,10	3,45
<i>S. aureus</i> (+)	500	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	375	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	250	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	125	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
	Gentamicina	3,20	3,00	3,30	3,2	0,15	4,82

Letras diferentes indican diferencias significativas entre la concentración aplicada en cada microorganismo para la actividad antimicrobiana ($p < 0,05$ Tukey Test).

Carrillo et al., (2015) mencionan que la quinua es fuente de diferentes péptidos bioactivos que muestran actividad antimicrobiana. **Chicaiza (2014)**, evaluó la actividad antimicrobiana en péptidos de 4 variedades de quinua y señala que los extractos de la variedad tunkahuan al 50 % (770 ug/uL) actuó sobre las cepas *E. coli* y *S. aureus* con un halo de inhibición de 8 y 12 mm respectivamente, los valores obtenidos en esta investigación son similares en las dos cepas a una concentración de 375 mg/mL. Otra investigación realizada por **Park et al., (2017)** señala que los hidrolizados de quinua tienen actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (8,53 - 15,03 mm) y *E. coli* (8,29 - 14,79 mm).

Las concentraciones utilizadas de hidrolizado para las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosas* mostraron diferencias entre las concentraciones de (500 – 250) y (375 – 250), mientras que en *B. cereus* no existió diferencias, esto se detalla en el análisis estadístico de quinua tunkahuan presente en el ANEXO G.

3.1.6 Verificación de las hipótesis

3.1.6.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol y quinua.

Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en el rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol o quinua.

3.1.6.2 Cuantificación de proteína de fréjol y quinua.

Los pH de precipitación evaluados influyen significativamente en el porcentaje de proteína de los concentrados de fréjol o quinua.

3.1.6.3 Evaluación de la actividad antioxidante de quinua.

Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en la actividad antioxidante de los concentrados de quinua.

3.1.6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de fréjol y quinua.

Los pH de precipitación evaluados no influyen significativamente en la actividad antiinflamatoria de los concentrados de fréjol o quinua.

3.1.6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fréjol y quinua.

Los hidrolizados de fréjol y quinua a pH 2 presentaron actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Los mejores rendimientos de proteína mediante precipitación isoelectrica a pH 8 de solubilización fueron en el caso de la quinua a pH 4,0 con un porcentaje de 6,86 mientras que en el concentrado de fréjol se obtuvo un mayor porcentaje a pH 3,0 con un valor de 31,12 estos valores fueron aceptables debido a que el rendimiento dependió del solvente utilizado y la pureza de los reactivos.
- El contenido de proteína obtenido mediante los métodos de Biuret y en el analizador instrumental arrojaron que el mayor contenido de proteína se encuentra a pH 4,0 y pH 6,0 para quinua y fréjol lo cual se debe a que el punto isoelectrico de las proteínas fluctúa alrededor de los pH mencionados de acuerdo con cada matriz.
- Se caracterizó las proteínas presentes en los concentrados mediante electroforesis Native- PAGE y SDS-PAGE, y se identificó la presencia de albúminas, globulinas 7 S y subunidades ácidas y básicas de globulinas 11 S, para quinua se apreció que las proteínas se encuentran unidas por puentes disulfuro que fueron rotos por el agente reducto β -mercaptoetanol, mientras que en el caso del fréjol se pude apreciar que sus proteínas no están unidas en gran proporción por enlaces disulfuro.
- Las proteínas de quinua y fréjol fueron sometidas a un proceso de hidrólisis gastrointestinal y se apreció que tras la acción de la pepsina y pancreatina la mayoría de las proteínas no tuvieron resistencia a la hidrolisis a excepción una proteína que podría ser la faseolina presente en el fréjol.
- Los concentrados de quinua no presentaron actividad antioxidante, sin embargo, en sus hidrolizados existió una actividad a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un valor de $42,28 \pm 0,30$, la mayor actividad podría ser producida por los aminoácidos que son capaces de reaccionar con los radicales libres que poseen alta energía, sin embargo, no se puede descartar el potencial de los demás componentes presentes en los hidrolizados.

- El porcentaje de actividad antiinflamatoria fue mayor en los hidrolizados, es así es así que se estableció que a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para quinua la mayor actividad en hidrolizado fue de $25,35 \pm 0,30$ y para fréjol a la misma concentración fue de $30,90 \pm 0,43$ en comparación con el diclofenaco estos valores fueron bajos, sin embargo se infiere que pueden ser utilizados en
- No existió actividad antimicrobiana en concentrados mientras que sus hidrolizados presentaron actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosas* y *B. cereus* es así que a una concentración de 500 mg/mL para quinua y fréjol los halos de inhibición fueron catalogados como de una acción intermedia, mientras que las cepas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* fueron resistentes ya que no fueron inhibidos por los hidrolizados estudiados.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar un fraccionamiento de las proteínas presentes en las matrices y la posterior determinación de las actividades antiinflamatoria y antioxidante de los mismos para identificar qué tipo de proteína confiere cada una de las actividades obtenidas en las matrices estudiadas.
- Se recomienda fraccionar los péptidos presentes en los hidrolizados para identificar los péptidos que confiere las actividades biológicas presentes en las matrices estudiadas.
- Se recomienda desarrollar estudios *in vivo* de las actividades biológicas presentes en los concentrados e hidrolizados de quinua y fréjol con el fin de corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.
- Se recomienda desarrollar un estudio basado en la incorporación de concentrados o hidrolizados de fréjol o quinua en un alimento procesado con el fin de mejorar su valor nutricional y funcional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., & Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(12), 4745–4750. <https://doi.org/10.1021/jf703689u>
- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, *46*(1), 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.001>
- Algara Suarez, P., Gallegos Martínez, J., & Reyes Hernández, J. (2016). El amaranto y sus efectos terapéuticos. *Tlatemoani*, *21*(April). Retrieved from <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/index.htm>
- Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *3*(8), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)
- Ariaza, T. (2014). *Obtención de fracciones peptídicas de Phaseolus vulgaris L. y evaluación de su actividad biológica*. UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA.
- Bojórquez Balam, E., Ruiz Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D., & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *Bioactividad de Péptidos Derivados de Proteínas Alimentarias*, *0*(0), 139–154. <https://doi.org/10.3926/oms.35>
- Brinegar, C., & Goundan, S. (1993). Isolation and Characterization of Chenopodin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(2), 182–185. <https://doi.org/10.1021/jf00026a006>

- Callisaya, C., & Alvarado, A. (2009). Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiaceas; quinua “ *chenopodium quinoa* ” – cañahua “ *chenopodium pallidicaule* ” por precipitación isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26(1), 12–20.
- Camacho Espinoza, M. K., Peinado Guevara, L. I., López –Valenzuela, José Ángel Valdez-Ortiz, Á., Salinas-Pérez, R. A., Medina-Godoy, C. G., & Moreno-Herrera, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en el Estado de Sinaloa. *Ra Ximhau*, 6(1), 23–36.
- Cárdenas, M. K. (2016). *Obtención de aislados proteicos de chía (Salvia hispánica L.) y evaluación in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 13(2), 109–122.
- Carrillo, W., Barrio, D., Welbaum, J., Carpio, C., Vilcacundo, R., Morales, D., & Ortiz, J. (2017). Antimicrobial and antioxidant peptides obtained from food proteins. *Bioactive Peptides: Types, Roles and Research*, (January 2017), 37–58.
- Carrillo, W., Vilcacundo, R., & Carpio, C. (2015). Compuestos bioactivos derivados de amaranto y quinua. *Actualización En Nutrición*, 16, 18–22.
- Cavazos, A., & Gonzalez, E. (2013). Identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 364–380.
- Cerna, E., Ochoa, Y., Mendoza, R., Badii, M. H., Gallegos, G., & Landeros, J. (2010). Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. *Phyton*, 79(940), 147–152.
- Chicaiza, G. (2014). *Determinación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos obtenidos de plantas de quinua (Chenopodium quinoa Willd) aplicado sobre cepas de interés clínico en el período diciembre de*

2013 – mayo de 2014”. Universidad Nacional De Chimborazo.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard— Twelfth Edition. M02-A12. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 35(12), 1–73.

Cobo, C. (2016). *Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal in vitro en proteínas de hoja de Ilex guayusa.*

Cucurí, M. (2017). *Determinación de la actividad antiinflamatoria de Kalanchoe pinnata mediante inhibición de edema plantar inducido por carragenina en ratas (Rattus norvegicus).*

Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac Med*, 72(4), 231–237.

Espitia, F. ., Negrete, A. G., Ordoñez, L. G. ., & León, M. F. . (2016). Caracterización de las proteínas de reserva de las semillas de parota (*Enterolobium cycloparmun*). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 147–152.

Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7.

Franco Ospina, L. A., Castro Guerrero, J. P., Ocampo Buendía, Y. C., Pájaro Bolívar, I. B., & Díaz Castillo, F. (2013). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 34–46.

Gajardo, P. I. (2005). *Caracterización y determinación de la estabilidad durante el almacenamiento de las proteínas de harina de quinua orgánica sin pulir y pulida proveniente de la VI región de Chile.*

Gallegos, S., Guerrero, L., Corzo, L., & Martínez, A. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas Vegetales. *Bioactividad de Péptidos Derivados de Proteínas Alimentarias*, 4, 111–122.

García, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos ,

actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1(2), 31–41.

- García, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez, J. A., Wiczowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319–332.
- Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (1998). Influence of naturally acid-soluble proteins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on in vitro digestibility determination. *Food Chemistry*, 62(3), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00224-0)
- Gornall, A., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(11), 751–766.
- Guzmán, H. S., Acosta, J. A., Álvarez, M. de los Á., García, S., & Loarca, G. (2002). Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica En México*, 28(2), 159–173.
- Hidalgo, A., Ferraretto, A., De Noni, I., Bottani, M., Cattaneo, S., Galli, S., & Brandolini, A. (2018). Bioactive compounds and antioxidant properties of pseudocereals-enriched water biscuits and their in vitro digestates. *Food Chemistry*, 240, 799–807.
- Iglesias, J. (2009). *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Iribarren, Paula, Maugeri, D. (2017). Determinación de proteínas.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680–685.
- Lozano, M. (2014). *Evaluación antiinflamatoria in vivo sapogeninas de residuos de quinua real (Chenopodium quinoa Willd)*. Universidad Mayor de San Andres.
- Martínez, A., & Martínez, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1–14.

- Martinez, E., & Añón, M. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem*, 44, 2523–2530.
- Martínez, E., & Garrido, O. (2013). Farmacocinética: antiulcerosos y antiinflamatorios. *Rev Hosp Jua Mex*, 80(1), 41–53.
- Mederos, Y. (2006). Indicadores De La Calidad En El Grano De Frijol. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 55–62.
- Mine, Y., Fupeng, M., & Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric. Food Chem.*, 52(5), 1088–1094.
- 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.
- Morán, 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, Ecuador.
- Nazate, F. K. (2016). Obtención de proteína hidrolizada de quinua *Chenopodium quinoa willd* a partir de aislado proteico.
- NIH, N. I. on A. (2017). Important Nutrients to Know: Proteins, Carbohydrates, and Fats.
- OAC. (2016). Prueba Experimental.
- Oseguera-Toledo, M. E., De Mejia, E. G., Dia, V. P., & Amaya-Llano, S. L. (2011). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Chemistry*, 127(3), 1175–1185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.121>
- Padmanabhan, P., & Jangle, S. N. (2012). Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation , a combination of four. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 109–116.

- Park, J. H., Lee, Y. J., Kim, Y. H., & Yoon, K. S. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds Cultivated in Korea. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(3), 195–202. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.3.195>
- Poveda, T. (2016). *Evaluacion del grado de digestibilidad gastrointestinal, actividad antioxidantes y antiinflamatoria in vitro de aislados proteicos de sesamo*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Poveda, T., Vilcacundo, R., Carpio, C., & Carrillo, W. (2016). Analysis of sesame proteins isolate (*Sesamum indicum* L) with water and salt treatment. *Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research*, 9(3), 1–4.
- Quinteros, M. (2016). *Estudio de la Digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y Actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Quinteros, M., Vilcacundo, R., Carpio, C., & Carrillo, W. (2016). Digestibility and anti-inflammatory activity in vitro of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3), 20–23.
- Ríos, J., & Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(2), 80–84.
- Rivera, M. (2006). *Obtencion, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de quinua*. Universidad de Chile.
- Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 15(2), 212–218.
- Salom, S. (2006). *Botanica aplicada de los Andes Centrales*. Young, 573.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

Tapia, I. L., Taco, D. R., & Taco, V. J. (2016). Aislamiento de proteínas de quinua ecuatoriana (*Chenopodium quinoa* Willd) variedad INIAP Tunkahuan con remoción de compuestos fenólicos , para uso potencial en la nutrición y salud humanas, 41(1), 71–80.

Teniente, G., L, G. C., Cariño-cortés, R., Bernardino-nicanor, A., Celaya, T. De, Ingeniería, D. De, ... Tlaxiaca, S. A. (2016). Caracterización de las proteínas de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L .), 1(1), 1–6.

Toapanta, M. (2016). *Caracterización de aislados proteicos de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro)*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.

UNE-EN 15104. (2011). Determinación del contenido total de carbono, hidrógeno y nitrógeno.

Vilcacundo, R. (2017). *Liberación de peptidos multifuncionales durante la digestión gastrointestinal simulada de proteínas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y amaranto (Amaranthus caudatus)*. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., del Mar Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 127–131. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i2.384>

ANEXO A

**PESO DE PROTEÍNA PURA DE LOS CONCENTRADOS DE FRÉJOL Y
QUINUA PARA LA DETERMINACIÓN ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.**

Tabla 13. Porcentaje de proteína de acuerdo con la cuantificación por Biuret.

pH	Porcentaje de proteína en los concentrados	
	Fréjol	Quinoa
3	72,31	66,44
4	73,10	70,51
5	71,85	57,77
6	80,46	59,15

Tabla 14. Pesos de proteína pura en concentrados de fréjol utilizados en la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Concentración (ug/mL)	Peso de concentrado (mg)	Peso de proteína pura (mg) 2 mL de agua de cada pH.				Peso de proteína pura (mg) para 10 mL de cada pH.			
		3	3	4	5	6	4	5	6
		100	0,2	0,30	0,30	0,28	0,35	1,38	1,37
200	0,4	0,60	0,60	0,57	0,69	2,77	2,74	2,78	2,49
500	1	1,38	1,38	1,37	1,39	6,91	6,84	6,96	6,21
1000	2	2,77	2,77	2,74	2,78	13,83	13,68	13,92	12,43

Tabla 15. Pesos de proteína pura en concentrados de quinua utilizados en la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Concentración (ug/mL)	Peso de concentrado (mg)	Peso de proteína pura (mg) 2 mL de agua de cada pH.				Peso de proteína pura (mg) para 10 mL de cada pH.			
		3	3	4	5	6	4	5	6
		100	0,2	0,30	0,28	0,35	0,34	1,51	1,42
200	0,4	0,60	0,57	0,69	0,68	3,01	2,84	3,46	3,38
500	1	1,51	1,42	1,73	1,69	7,53	7,09	8,66	8,45
1000	2	3,01	2,84	3,46	3,38	15,05	14,18	17,31	16,91

ANEXO B

**DATOS OBTENIDOS, RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE
RENDIMIENTO PROTEICO DE FRÉJOL ROJO MOTEADO Y QUINUA
TUNKAHUAN**

FRÉJOL ROJO MOTEADO

Tabla 16. Pesos y porcentaje de rendimientos de los concentrados proteicos de fréjol obtenidos a diferentes pH de precipitación.

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	5,01	5,00	5,00
	w FINAL (g)	1,50	1,59	1,58
	% R	29,94	31,77	31,64
pH 4	w INICIAL (g)	5,00	5,01	5,00
	w FINAL (g)	1,44	1,36	1,54
	% R	28,78	27,23	30,82
pH 5	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	1,27	1,50	1,54
	% R	25,45	29,92	30,72
pH 6	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	1,53	1,55	1,5
	% R	30,50	31,08	29,91

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales (BIO-PROPEPTI), FCIAL –UTA.

Tabla 17. Anova del rendimiento de concentrados proteicos de fréjol por pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12,5084	3	4,16947	1,31	0,3355
Intra grupos	25,3851	8	3,17313		
Total (Corr.)	37,8935	11			

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 rendimiento de fréjol entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 18. Pruebas de múltiples rangos para el rendimiento de concentrados proteicos de fréjol por pH.

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5	3	28,6967	X	3 - 4		2,17333	4,656
4	3	28,9433	X	3 - 5		2,42	4,656
6	3	30,4967	X	3 - 6		0,62	4,656
3	3	31,1167	X	4 - 5		0,246667	4,656
				4 - 6		-1,55333	4,656
				5 - 6		-1,8	4,656

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

* indica una diferencia significativa

QUINUA TUNKAHUAN

Tabla 19. Pesos y porcentaje de rendimientos de los concentrados proteicos de quinua obtenidos a diferentes pH de precipitación.

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	0,34	0,33	0,31
	%R	6,80	6,52	6,27
pH 4	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	0,34	0,36	0,32
	%R	6,86	7,29	6,42
pH 5	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	0,31	0,32	0,34
	%R	6,18	6,39	6,88
pH 6	w INICIAL (g)	5,00	5,00	5,00
	w FINAL (g)	0,34	0,33	0,31
	%R	6,73	6,54	6,2

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales (BIO-PROPEPTI), FCIAL –UTA.

Tabla 20. Anova del rendimiento de concentrados proteicos de quinua por pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,288267	3	0,0960889	0,83	0,5117
Intra grupos	0,921333	8	0,115167		
Total (Corr.)	1,2096	11			

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 rendimiento de quinua entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 21. Pruebas de múltiples rangos para el rendimiento de concentrados proteicos de quinua por pH.

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5	3	6,48333	X	3 – 4		-0,326667	0,887017
6	3	6,49	X	3 – 5		0,0466667	0,887017
3	3	6,53	X	3 – 6		0,04	0,887017
4	3	6,85667	X	4 – 5		0,373333	0,887017
				4 – 6		0,366667	0,887017
				5 – 6		-0,00666667	0,887017

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

* indica una diferencia significativa.

ANEXO C

**DATOS, RESULTADOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA
CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE FRÉJOL ROJO MOTEADO Y QUINUA
TUNKAHUAN MEDIANTE BIURET Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL**

Tabla 22. Valores de la curva estándar de pepsina cuantificación de proteínas mediante el método Biuret.

		Pepsina	19,46 mg/mL
Std PEPSINA	P. total	Conc-Std Pepsina	
g	G	mg/g (mL)	Absorbancia (540 nm)
0,0000	0,0000	0,00	0,000
0,0446	0,2421	3,59	0,110
0,0978	0,2467	7,72	0,243
0,1505	0,2473	11,84	0,372
0,2023	0,2519	15,63	0,494
0,2417	0,2421	19,46	0,570

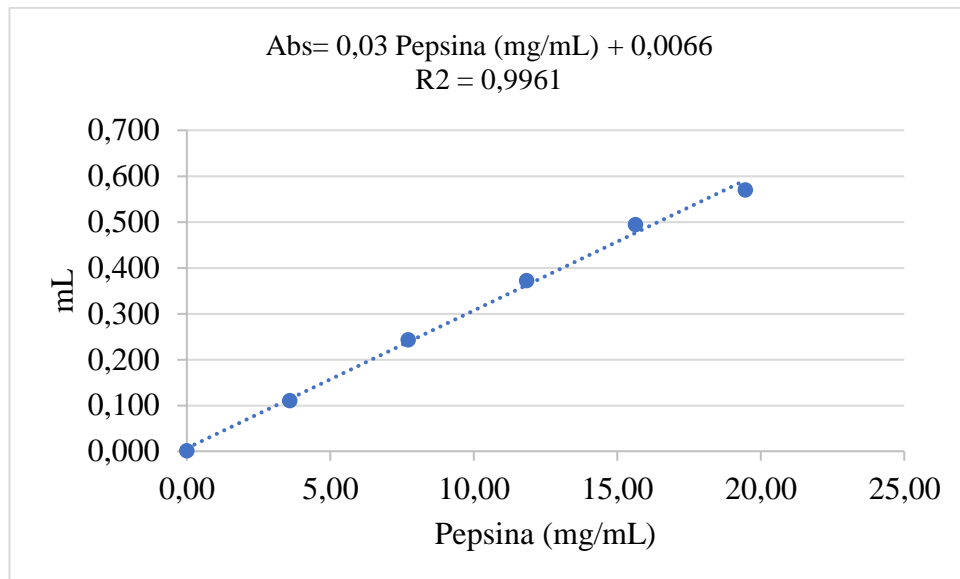


Figura 11. Curva de calibración para la cuantificación de concentrados proteicos de proteína mediante el método Biuret.

FRÉJOL ROJO MOTEADO

MÉTODO: BIURET

Tabla 23. Absorbancia de los concentrados proteicos de fréjol medidos a 540 nm.

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	0,215	0,213	0,209	0,235
R2	0,209	0,210	0,209	0,230
R3	0,216	0,208	0,207	0,231
R4	0,212	0,211	0,209	0,231

Tabla 24. Anova para porcentaje de proteína de fréjol por pH método Biuret.

<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	194,919	3	64,9729	106,05	0,0000
Intra grupos	7,35165	12	0,612637		
Total (Corr.)	202,27	15			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de proteína de fréjol entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 25. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de fréjol por pH método Biuret.

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
5	4	71,8475	X	3 - 4		-1,0425	1,64818
3	4	72,31	X	3 - 5		0,4625	1,64818
4	4	73,3525	X	3 - 6	*	-8,155	1,64818
6	4	80,465	X	4 - 5		1,505	1,64818
				4 - 6	*	-7,1125	1,64818
				5 - 6	*	-8,6175	1,64818

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

* indica una diferencia significativa.

MÉTODO: ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Tabla 26. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los concentrados proteicos de fréjol.

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	7,35	7,65	7,12	8,10
R2	7,42	8,02	7,51	8,34
R3	7,59	7,91	7,33	8,12

Tabla 27. Anova para el porcentaje de proteína de fréjol 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	54,834	3	18,278	17,41	0,0007
Intra grupos	8,39933	8	1,04992		
Total (Corr.)	63,2334	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de proteína de fréjol entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 28. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de fréjol por pH.

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5	3	45,75	X	3 – 4		-2,54	2,67822
3	3	46,5867	XX	3 – 5		0,836667	2,67822
4	3	49,1267	XX	3 – 6	*	-4,58333	2,67822
6	3	51,17	X	4 – 5	*	3,37667	2,67822
				4 – 6		-2,04333	2,67822
				5 – 6	*	-5,42	2,67822

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

* indica una diferencia significativa.

QUINUA TUNKAHUAN

MÉTODO: BIURET

Tabla 29. Absorbancia de los concentrados proteicos de quinua medidos a 540 nm.

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	0,192	0,204	0,170	0,174
R2	0,195	0,205	0,171	0,172
R3	0,193	0,211	0,168	0,173

Tabla 30. Anova para el porcentaje de proteína de quinua por pH, método Biuret.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	329,033	3	109,678	182,03	0,0000
Intra grupos	4,8202	8	0,602525		
Total (Corr.)	333,853	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de proteína de quinua entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 31. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de proteína de quinua por pH método Biuret

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	57,7633	X
6	3	59,15	X
3	3	66,4433	X
4	3	70,5133	X

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 4	*	-4,07	2,02888
3 - 5	*	8,68	2,02888
3 - 6	*	7,29333	2,02888
4 - 5	*	12,75	2,02888
4 - 6	*	11,3633	2,02888
5 - 6		-1,38667	2,02888

* indica una diferencia significativa.

MÉTODO: ANALIZADOR ELEMENTAL

Tabla 32. Porcentaje de nitrógeno obtenido en los concentrados proteicos de quinua.

	pH3	pH4	pH5	pH6
R1	8,46	8,83	7,12	7,35
R2	8,69	9,07	7,34	7,71
R3	8,64	8,76	7,23	7,5

Tabla 33. Anova para el porcentaje de proteína de quinua por pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	228,659	3	76,2198	90,91	0,0000
Intra grupos	6,70713	8	0,838392		
Total (Corr.)	235,366	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de proteína de quinua entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 34. Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de proteína de quinua por pH.

pH	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	45,19	X
6	3	47,0033	X
3	3	53,73	X
4	3	55,5433	X

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 4		-1,81333	2,39327
3 - 5	*	8,54	2,39327
3 - 6	*	6,72667	2,39327
4 - 5	*	10,3533	2,39327
4 - 6	*	8,54	2,39327
5 - 6		-1,81333	2,39327

* indica una diferencia significativa

ANEXO D

**DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE CONCENTRADOS E HIDROLIZADO DE QUINUA TUNKAHUAN**

Cálculos de actividad antioxidante en quinua Tunkahuan

Tabla 35. Datos obtenidos de absorbancia para actividad antioxidante de quinua Tunkahuan.

		CONC. 1	CONC. 2	CONC. 3	CONC. 4	BLANCO
		100	200	500	1000	
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	
pH 3,0	R1	0,676	0,660	0,645	0,637	0,687
	R2	0,677	0,663	0,647	0,639	
	R3	0,678	0,664	0,649	0,640	
pH 4,0	R1	0,205	0,202	0,200	0,192	0,212
	R2	0,206	0,202	0,201	0,193	
	R3	0,206	0,203	0,201	0,193	
pH 5,0	R1	0,645	0,637	0,625	0,615	0,659
	R2	0,646	0,639	0,627	0,616	
	R3	0,647	0,64	0,629	0,619	
pH 6,0	R1	0,745	0,736	0,718	0,710	0,758
	R2	0,745	0,738	0,720	0,712	
	R3	0,747	0,739	0,721	0,713	
Hidrolizado	R1	0,193	0,180	0,176	0,170	0,205
	R2	0,194	0,180	0,178	0,170	
	R3	0,195	0,183	0,179	0,171	
Diclofenaco	R1	2,598	2,566	2,341	1,943	2,862
	R2	2,61	2,561	2,349	1,951	
	R3	2,604	2,571	2,336	1,932	

Tabla 36. Actividad antioxidante obtenida de concentrados de quinua mediante el método TBARS.

FACTOR A: pH precipitación	Concentración de proteína	Antioxidante (%)			Promedio	Desviación Estándar	C.V
		R1	R2	R3			
3	100	1,60	1,46	1,31	1,46	0,15	10,00
3	200	3,93	3,49	3,35	3,59	0,30	8,44
3	500	6,11	5,82	5,53	5,82	0,29	5,00
3	1000	7,28	6,99	6,84	7,04	0,22	3,16
4	100	3,3	2,83	2,83	2,99	0,27	9,12
4	200	4,95	4,72	4,25	4,64	0,36	7,77
4	500	5,66	5,19	5,19	5,35	0,27	5,09
4	1000	9,43	8,87	8,96	9,09	0,30	3,34
5	100	2,12	1,97	1,82	1,97	0,15	7,69
5	200	3,34	3,03	2,88	3,09	0,23	7,51
5	500	5,16	4,86	4,55	4,86	0,30	6,25
5	1000	6,68	6,53	6,07	6,42	0,32	4,92
6	100	1,72	1,72	1,45	1,63	0,15	9,36
6	200	2,90	2,64	2,51	2,68	0,20	7,51
6	500	5,54	5,28	5,01	5,28	0,26	5,00
6	1000	6,46	6,07	5,94	6,16	0,27	4,46

Tabla 37. Anova para Actividad Antioxidante por pH de quinua.

<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	6,09747	3	2,03249	0,38	0,7659
Intra grupos	63,3745	12	5,28121		
Total (Corr.)	69,472	15			

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 Antioxidante entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 38. Actividad antioxidante obtenida control positivo BHT de quinua mediante el método TBARS.

Concentración de proteína	Antioxidante (%)			Promedio	Desviación Estándar	C.V
	R1	R2	R3			
100	23,06	22,01	22,54	22,54	0,52	2,33
200	25,86	26,29	25,42	25,86	0,44	1,69
500	45,51	44,81	45,95	45,42	0,57	1,26
1000	80,28	79,58	81,24	80,36	0,83	1,04

Tabla 39. Análisis de varianza para actividad antioxidante de quinua entre patrón y concentrado pH 4,0 - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Factores	8678,07	1	8678,07	37426,97	0,0000
B:Concentración	3799,68	3	1266,56	5462,44	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2600,92	3	866,975	3739,11	0,0000
RESIDUOS	3,70987	16	0,231867		
TOTAL (CORREGIDO)	15082,4	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre actividad antioxidante con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 40. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Factores	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	12	5,515	0,139004	X
A1	12	43,545	0,139004	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	38,0308	0,416736

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 41. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concen- tración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	6	12,7617	0,196582	X
B2	6	15,2483	0,196582	X
B3	6	25,385	0,196582	X
B4	6	44,7267	0,196582	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-2,48667	0,795754
B1 - B3	*	-12,6233	0,795754
B1 - B4	*	-31,965	0,795754
B2 - B3	*	-10,1367	0,795754
B2 - B4	*	-29,4783	0,795754
B3 - B4	*	-19,3417	0,795754

* indica una diferencia significativa

Tabla 42. Actividad antioxidante obtenida de hidrolizado de quinua mediante el método TBARS.

Concentración de proteína	Antioxidante (%)			Promedio	Desviación Estándar	C.V
	R1	R2	R3			
100	14,63	13,41	12,20	13,41	1,22	9,09
200	30,49	30,49	26,83	29,27	2,11	7,22
500	35,37	32,93	31,71	33,33	1,86	5,59
1000	42,68	42,68	41,46	42,28	0,70	1,67

Tabla 43. Análisis de varianza para actividad antioxidante de quinua entre patrón e hidrolizado - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Factores	1171,38	1	1171,38	821,99	0,0000
B: Concentración	6284,11	3	2094,7	1469,91	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1366,73	3	455,576	319,69	0,0000
RESIDUOS	22,8009	16	1,42505		
TOTAL (CORREGIDO)	8845,03	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre actividad antioxidante con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 44. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Factores	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	12	29,5733	0,344608	×
A1	12	43,5458	0,344608	×

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	13,9725	1,03314

* indica una diferencia significativa.

Tabla 45. Pruebas de múltiples rangos para actividad antioxidante de quinua por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	6	17,975	0,487349	×
B2	6	27,5633	0,487349	×
B3	6	39,38	0,487349	×
B4	6	61,32	0,487349	×

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-9,58833	1,97276
B1 - B3	*	-21,405	1,97276
B1 - B4	*	-43,345	1,97276
B2 - B3	*	-11,8167	1,97276
B2 - B4	*	-33,7567	1,97276
B3 - B4	*	-21,94	1,97276

* indica una diferencia significativa.

ANEXO E

**DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA DE CONCENTRADOS E HIDROLIZADOS DE
FRÉJOL ROJO MOTEADO Y QUINUA TUNKAHUAN.**

FRÉJOL ROJO MOTEADO

Tabla 46. Datos de absorbancia medidos a 660 nm de concentrados de proteína de fréjol precipitados a diferentes pH e hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína.

		CONC. 1 100 µg/mL	CONC. 2 200 µg/mL	CONC. 3 500 µg/mL	CONC. 4 1000 µg/mL	BLANCO
pH 3,0	R1	1,591	1,546	1,489	1,442	1,656
	R2	1,593	1,552	1,491	1,446	
	R3	1,593	1,554	1,494	1,447	
	R4	1,597	1,555	1,495	1,449	
pH 4,0	R1	1,685	1,649	1,583	1,503	1,755
	R2	1,687	1,655	1,584	1,503	
	R3	1,691	1,657	1,587	1,505	
	R4	1,692	1,659	1,591	1,507	
pH 5,0	R1	1,779	1,734	1,726	1,661	1,911
	R2	1,780	1,735	1,733	1,668	
	R3	1,788	1,743	1,736	1,671	
	R4	1,792	1,748	1,737	1,673	
pH 6,0	R1	1,462	1,385	1,341	1,263	1,545
	R2	1,464	1,390	1,342	1,265	
	R3	1,467	1,390	1,343	1,268	
	R4	1,472	1,396	1,347	1,270	
Hidrolizado	R1	1,425	1,337	1,221	1,098	1,598
	R2	1,432	1,339	1,222	1,102	
	R3	1,441	1,343	1,223	1,103	
	R4	1,445	1,350	1,232	1,114	
Diclofenaco	R1	1,299	1,045	0,868	0,556	1,587
	R2	1,304	1,066	0,869	0,567	
	R3	1,308	1,088	0,871	0,575	
	R4	1,309	1,098	0,883	0,580	

Tabla 47. Actividad antiinflamatoria (%) de concentrados proteicos de fréjol precipitados a diferentes pH.

FACTOR A: pH precipitación	Concentración de proteína	Actividad antiinflamatoria (%)				Promedio	Desviación Estándar	C.V
		R1	R2	R3	R4			
3	100	3,93	3,80	3,80	3,56	3,77 ^a	0,15	4,03
3	200	6,64	6,28	6,16	6,10	6,30 ^a	0,24	3,87
3	500	10,08	9,96	9,78	9,72	9,89 ^a	0,17	1,68
3	1000	12,92	12,68	12,62	12,5	12,68 ^a	0,18	1,40
4	100	3,99	3,87	3,65	3,59	3,77 ^a	0,19	4,99
4	200	6,04	5,70	5,58	5,47	5,70 ^a	0,25	4,32
4	500	9,8	9,74	9,57	9,34	9,62 ^a	0,2	2,13
4	1000	14,36	14,36	14,25	14,13	14,27 ^a	0,11	0,76
5	100	6,91	6,86	6,44	6,23	6,61 ^a	0,33	4,98
5	200	9,26	9,21	8,79	8,53	8,95 ^a	0,35	3,91
5	500	9,68	9,31	9,16	9,11	9,31 ^a	0,26	2,79
5	1000	13,08	12,72	12,56	12,45	12,7 ^a	0,27	2,16
6	100	5,37	5,24	5,05	4,72	5,10 ^a	0,28	5,52
6	200	10,36	10,03	10,03	9,64	10,02 ^a	0,29	2,91
6	500	13,20	13,14	13,07	12,82	13,06 ^a	0,17	1,30
6	1000	18,25	18,12	17,93	17,80	18,03 ^a	0,20	1,12

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el % de actividad antiinflamatoria de los concentrados obtenidos a diferentes pH de precipitación.

Tabla 48. Anova para actividad antiinflamatoria por pH de fréjol.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	29,154	3	9,71801	0,54	0,6669
Intra grupos	217,911	12	18,1593		
Total (Corr.)	247,065	15			

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 y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 49. Actividad antiinflamatoria (%) de control positivo diclofenaco a diferentes concentraciones utilizado para fréjol y quinua.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad antiinflamatoria (%)				Promedio	Desviación Estándar	C.V
	R1	R2	R3	R4			
100	18,15	17,83	17,58	17,52	17,77	0,29	1,61
200	34,15	32,83	31,44	30,81	32,31	1,49	4,61
500	45,31	45,24	45,12	44,36	45,01	0,44	0,97
1000	64,97	64,27	63,77	63,45	64,11	0,66	1,03

Tabla 50. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria de fréjol entre patrón y concentrado pH 4,0 - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Factores	6385,35	1	6385,35	16121,86	0,0000
B: Concentración	3772,01	3	1257,34	3174,55	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1220,06	3	406,685	1026,81	0,0000
RESIDUOS	9,50562	24	0,396068		
TOTAL (CORREGIDO)	11386,9	31			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

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 51. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Factores	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	16	11,5481	0,157335	×
A1	16	39,8	0,157335	×

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	28,2519	0,459229

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 52. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concen-tración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	8	11,4325	0,222505	×
B2	8	21,1612	0,222505	×
B3	8	29,0325	0,222505	×
B4	8	41,07	0,222505	×

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-9,72875	0,868272
B1 - B3	*	-17,6	0,868272
B1 - B4	*	-29,6375	0,868272
B2 - B3	*	-7,87125	0,868272
B2 - B4	*	-19,9088	0,868272
B3 - B4	*	-12,0375	0,868272

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 53. Actividad antiinflamatoria (%) de hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína (pH:6) de fréjol.

Concentración (µg/mL)	Actividad antiinflamatoria (%)				Promedio	Desviación Estándar	C.V
	R1	R2	R3	R4			
100	10,83	10,39	9,82	9,57	10,15	0,56	5,54
200	16,33	16,21	15,96	15,52	16,00	0,36	2,24
500	23,59	23,53	23,47	22,90	23,37	0,32	1,36
1000	31,29	31,04	30,98	30,29	30,90	0,43	1,39

Tabla 54. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria entre patrón e hidrolizado de fréjol - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Factores	3102,36	1	3102,36	6763,55	0,0000
B: Concentración	4923,61	3	1641,2	3578,04	0,0000
INTERACCIONES					
AB	687,858	3	229,286	499,87	0,0000
RESIDUOS	11,0085	24	0,458688		
TOTAL (CORREGIDO)	8724,83	31			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

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 55. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Factores	Ca-sos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	16	20,107	0,16932	X
A1	16	39,8	0,16932	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	19,6925	0,4942

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 56. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de fréjol por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	8	13,9613	0,239449	X
B2	8	24,1562	0,239449	X
B3	8	34,19	0,239449	X
B4	8	47,5075	0,239449	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-10,195	0,934393
B1 - B3	*	-20,2288	0,934393
B1 - B4	*	-33,5462	0,934393
B2 - B3	*	-10,0338	0,934393
B2 - B4	*	-23,3512	0,934393
B3 - B4	*	-13,3175	0,934393

* indica una diferencia significativa.

QUINUA TUNKAHUA

Tabla 57. Datos de absorbancia medidos a 660 nm de concentrados de proteína de quinua precipitados a diferentes pH e hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína.

		CONC. 1 100 µg/mL	CONC. 2 200 µg/mL	CONC. 3 500 µg/mL	CONC. 4 1000 µg/mL	BLANCO
pH 3,0	R1	1,947	1,859	1,710	1,557	1,952
	R2	1,947	1,860	1,710	1,559	
	R3	1,947	1,865	1,715	1,560	
	R4	1,948	1,870	1,725	1,574	
pH 4,0	R1	1,598	1,504	1,408	1,274	1,629
	R2	1,599	1,507	1,413	1,277	
	R3	1,600	1,508	1,417	1,279	
	R4	1,601	1,510	1,417	1,281	
pH 5,0	R1	1,540	1,479	1,369	1,251	1,552
	R2	1,540	1,481	1,371	1,252	
	R3	1,541	1,484	1,377	1,265	
	R4	1,542	1,488	1,383	1,268	
pH 6,0	R1	1,490	1,393	1,302	1,205	1,505
	R2	1,490	1,394	1,305	1,210	
	R3	1,491	1,404	1,317	1,226	
	R4	1,492	1,404	1,323	1,228	
Hidrolizado	R1	1,643	1,505	1,387	1,277	1,720
	R2	1,645	1,509	1,396	1,284	
	R3	1,655	1,515	1,400	1,286	
	R4	1,651	1,515	1,406	1,289	
Diclofenaco	R1	1,299	1,045	0,868	0,556	1,587
	R2	1,304	1,066	0,869	0,567	
	R3	1,308	1,088	0,871	0,575	
	R4	1,309	1,098	0,883	0,580	

Tabla 58. Actividad antiinflamatoria (%) de concentrados proteicos de quinua precipitados a diferentes pH.

FACTOR A: pH precipitación	Concentración de proteína	Actividad antiinflamatoria (%)				Promedio	Desviación Estándar	C.V
		R1	R2	R3	R4			
3	100	0,26	0,26	0,26	0,20	0,24 ^a	0,03	10,53
3	200	4,76	4,71	4,46	4,20	4,53 ^a	0,26	5,72
3	500	12,40	12,40	12,14	11,63	12,14 ^a	0,36	2,98
3	1000	20,24	20,13	20,08	19,36	19,95 ^a	0,40	1,99
4	100	1,90	1,84	1,78	1,72	1,81 ^a	0,08	4,38
4	200	7,67	7,49	7,43	7,31	7,47 ^a	0,15	2,05
4	500	13,57	13,26	13,01	13,01	13,21 ^a	0,26	1,98
4	1000	21,79	21,61	21,49	21,36	21,56 ^a	0,18	0,85
5	100	0,77	0,77	0,71	0,64	0,72 ^a	0,06	8,51
5	200	4,70	4,57	4,38	4,12	4,45 ^a	0,25	5,68
5	500	11,79	11,66	11,28	10,89	11,40 ^a	0,41	3,57
5	1000	19,39	19,33	18,49	18,30	18,88 ^a	0,56	2,99
6	100	1,00	1,00	0,93	0,86	0,95 ^a	0,06	6,72
6	200	7,44	7,38	6,71	6,71	7,06 ^a	0,40	5,72
6	500	13,49	13,29	12,49	12,09	12,84 ^a	0,66	5,13
6	1000	19,93	19,60	18,54	18,41	19,12 ^a	0,76	3,99

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el % de actividad antiinflamatoria de los concentrados obtenidos a diferentes pH de precipitación.

Tabla 59. ANOVA para actividad antiinflamatoria por pH de quinua.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10,8996	3	3,63319	0,05	0,9829
Intra grupos	813,955	12	67,8296		
Total (Corr.)	824,855	15			

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 y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 60. Análisis de varianza para actividad antiinflamatoria entre patrón y concentrado pH 4,0 de quinua - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Factores	28625,1	1	28625,1	4346,09	0,0000
B:Concentración	1554,06	3	518,02	78,65	0,0000
INTERACCIONES					
AB	15,9269	3	5,30897	0,81	0,5029
RESIDUOS	158,074	24	6,5864		
TOTAL (CORREGIDO)	30353,1	31			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Puesto que 2 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 61. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Factores	Ca-sos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
A2	16	11,015	0,641599	X
A1	16	70,8325	0,641599	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A1 - A2	*	59,8175	1,8727

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 62. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concen-tración	Ca-sos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
B1	8	31,4613	0,907359	X
B2	8	38,4587	0,907359	X
B3	8	43,1787	0,907359	X
B4	8	50,5963	0,907359	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
B1 - B2	*	-6,9975	3,54075
B1 - B3	*	-11,7175	3,54075
B1 - B4	*	-19,135	3,54075
B2 - B3	*	-4,72	3,54075
B2 - B4	*	-12,1375	3,54075
B3 - B4	*	-7,4175	3,54075

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 63. Actividad antiinflamatoria (%) de hidrolizado del pH con mayor contenido de proteína (pH:4) de quinua.

Concentración (µg/mL)	Actividad antiinflamatoria (%)				Promedio	Desviación Estándar	C.V
	R1	R2	R3	R4			
100	4,48	4,36	3,78	4,01	4,16	0,32	7,70
200	12,50	12,27	11,92	11,92	12,15	0,28	2,34
500	19,36	18,84	18,60	18,26	18,76	0,46	2,47
1000	25,76	25,35	25,23	25,06	25,35	0,30	1,17

Tabla 64. Análisis de Varianza para actividad antiinflamatoria entra patrón e hidrolizado de quinua - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Factores	24843,3	1	24843,3	3746,73	0,0000
B: Concentración	1688,58	3	562,86	84,89	0,0000
INTERACCIONES					
AB	15,7183	3	5,23945	0,79	0,5113
RESIDUOS	159,136	24	6,63067		
TOTAL (CORREGIDO)	26706,8	31			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Puesto que 2 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 65. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua por factores.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Factores</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A2	16	15,1063	0,643752	X
A1	16	70,8325	0,643752	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A1 - A2	*	55,7262	1,87898

* indica una diferencia significativa.

Tabla 66. Pruebas de múltiples rangos para actividad antiinflamatoria de quinua 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	32,635	0,910403	X
B2	8	40,7975	0,910403	X
B3	8	45,955	0,910403	X
B4	8	52,49	0,910403	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
B1 - B2	*	-8,1625	3,55263
B1 - B3	*	-13,32	3,55263
B1 - B4	*	-19,855	3,55263
B2 - B3	*	-5,1575	3,55263
B2 - B4	*	-11,6925	3,55263
B3 - B4	*	-6,535	3,55263

* indica una diferencia significativa.

ANEXO F

**FIGURAS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE FRÉJOL Y QUINUA**

Figuras obtenidas de los concentrados contra microorganismos patógenos.

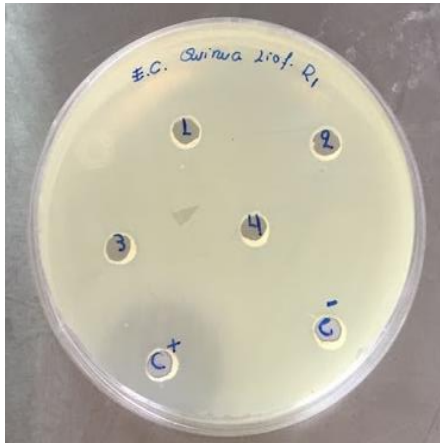


Figura 12. Concentrado de quinua contra *E. coli*,



Figura 15. Concentrado de quinua contra *L. Monocytogenes*

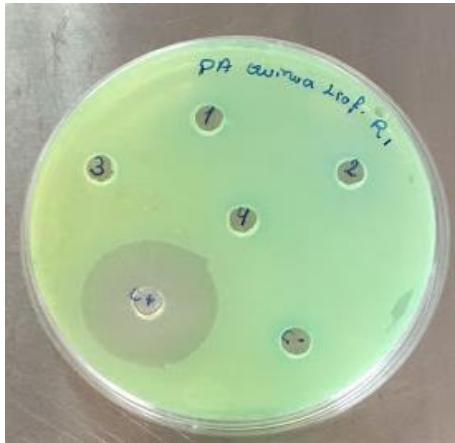


Figura 13. Concentrado de quinua contra *P. aeruginosas*.



Figura 16. Concentrado de quinua contra *S. aureus*



Figura 14. Concentrado de quinua contra *B. cereus*.



Figura 17. Concentrado puro.

Fotografías de la actividad antimicrobiana frente a 5 microorganismos patógenos
de hidrolizado de fréjol

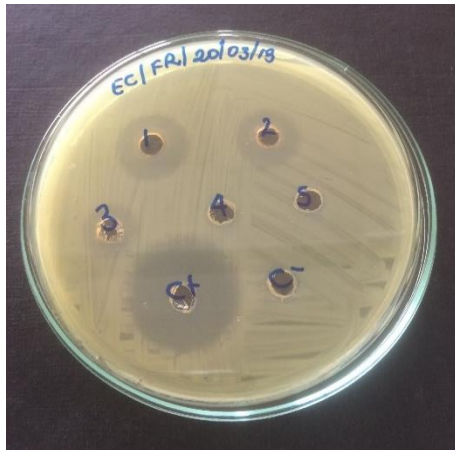


Figura 18. Hidrolizado de fréjol
contra *E. coli*

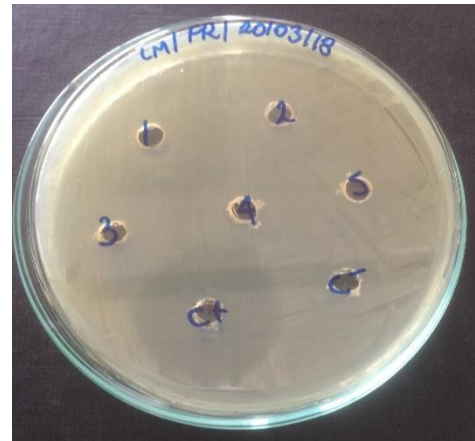


Figura 21. Hidrolizado de fréjol
contra *L. Monocytogenes*

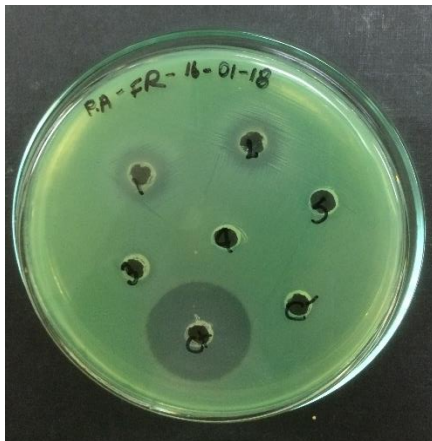


Figura 19. Hidrolizado de fréjol
contra *P. aeruginosas*

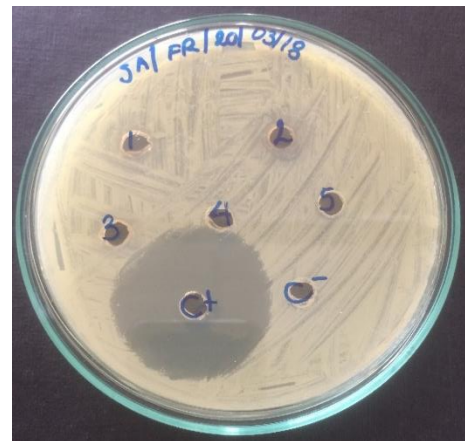


Figura 22. Hidrolizado de fréjol
contra *S. aureus*

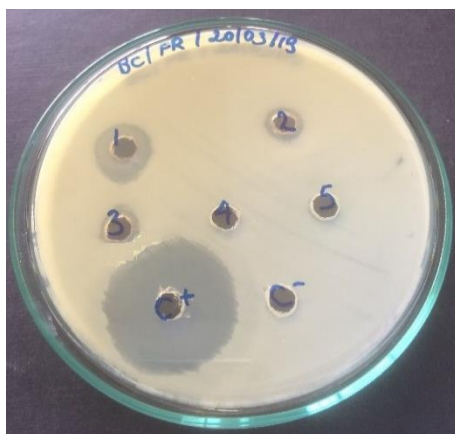


Figura 20. Hidrolizado de fréjol
contra *B. cereus*

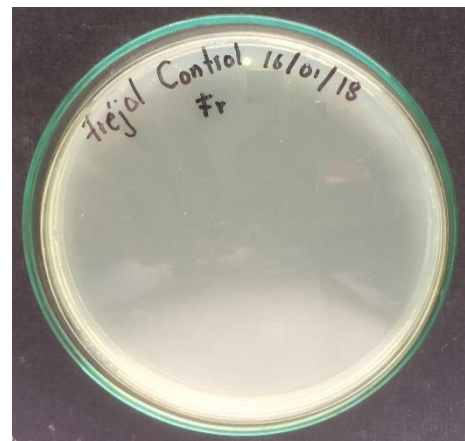


Figura 23. Hidrolizado puro de fréjol.

Fotografías de la actividad antimicrobiana frente a 5 microorganismos patógenos de hidrolizado de quinua

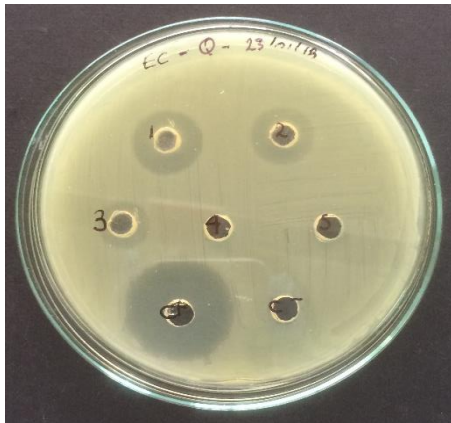


Figura 24. Hidrolizado de quinua contra *E. coli*

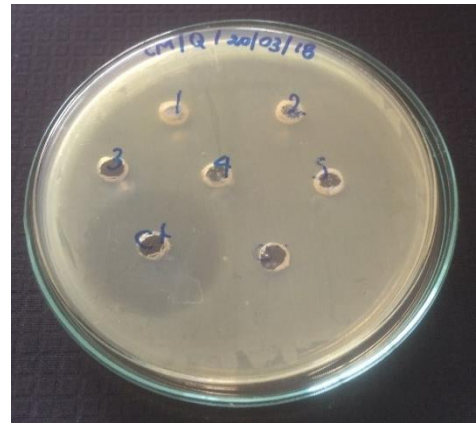


Figura 27. Hidrolizado de quinua contra *L. Monocytogenes*

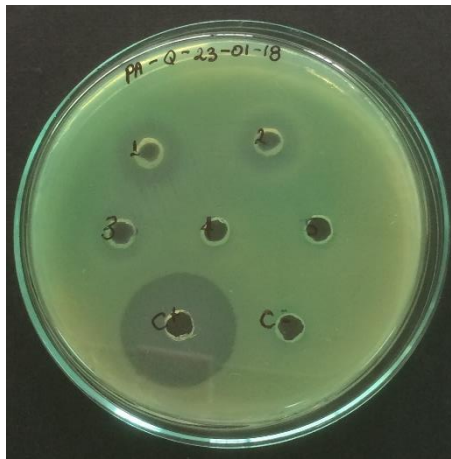


Figura 25. Hidrolizado de quinua contra *P. aeruginosas*

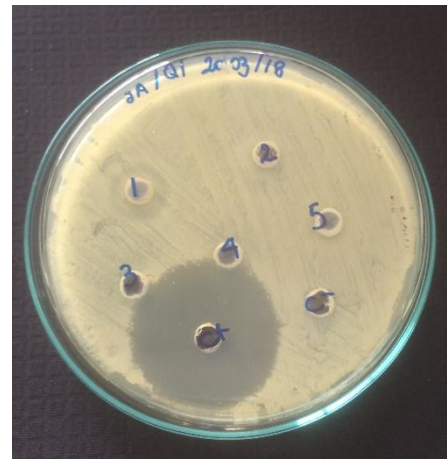


Figura 28. Hidrolizado de quinua contra *S. aureus*

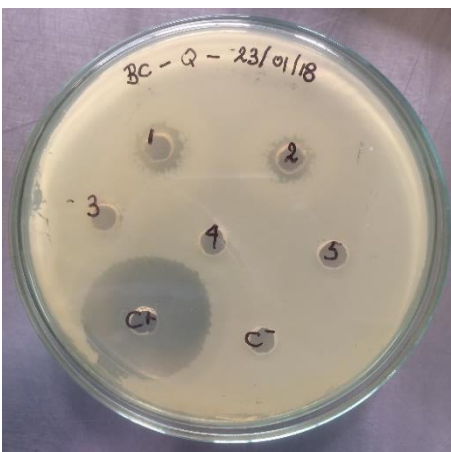


Figura 26. Hidrolizado de quinua contra *B. cereus*

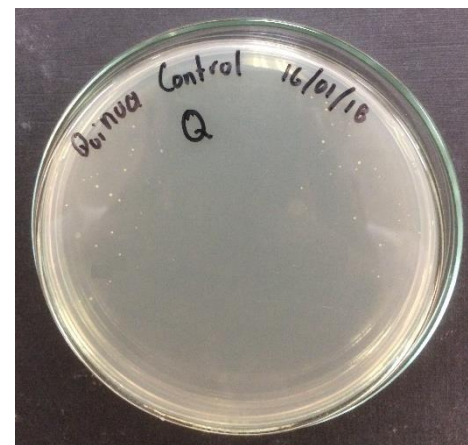


Figura 29. Hidrolizado puro de quinua.

ANEXO G

**DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE CONCENTRADOS E HIDROLIZADOS DE
FRÉJOL ROJO MOTEADO Y QUINUA TUNKAHUAN.**

Tabla 67. Absorbancias medias a 600 nm de los microorganismos patógenos para las 3 réplicas realizadas de actividad antimicrobiana en fréjol y quinua.

Microorganismos	C ₁			V ₁		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>E. coli</i>	0,603	0,775	0,975	497,51	387,10	307,69
<i>P. aeruginosas</i>	0,420	0,404	0,458	714,29	742,57	655,02
<i>B. cereus</i>	0,405	0,553	0,988	740,74	542,50	303,64
<i>L. monocytogenes</i>	0,467	0,416	0,078	642,40	721,15	3846,15
<i>S. aureus</i>	1,287	0,809	0,960	233,10	370,83	312,50

Tabla 68. Valores de proteína y cantidad de agua utilizada en utilizadas para las diferentes concentraciones de proteína.

%	Concentración	Concentración (mg/mL)	Proteína (µL) tomada de la mayor concentración (500 mg/mL)	Agua (µL)
100	C 1	500	360	0
75	C 2	375	270	90
50	C 3	250	180	180
25	C 4	125	90	270
10	C 5	50	36	324

ANÁLISIS ESTADÍSTICO FRÉJOL ROJO MOTEADO

Tabla 69. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra *E. coli* por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,32667	2	0,663333	140,47	0,0000
Intra grupos	0,0283333	6	0,00472222		
Total (Corr.)	1,355	8			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad Antimicrobiana entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza

Tabla 70. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra *E. coli* por concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,783333	X
375	3	1,15	X
500	3	1,71667	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375	*	-0,366667	0,172157
250 - 500	*	-0,933333	0,172157
375 - 500	*	-0,566667	0,172157

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 71. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra *P. aeruginosas* por concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,755	2	0,3775	151,00	0,0000
Intra grupos	0,015	6	0,0025		
Total (Corr.)	0,77	8			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad Antimicrobiana entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 72. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra *P. aeruginosas* por concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,833333	X
375	3	1,28333	X
500	3	1,53333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375	*	-0,45	0,125263
250 - 500	*	-0,7	0,125263
375 - 500	*	-0,25	0,125263

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 73. Anova para la actividad antimicrobiana de fréjol contra *B. cereus* por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,38389	2	1,19194	286,07	0,0000
Intra grupos	0,025	6	0,00416667		
Total (Corr.)	2,40889	8			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad Antimicrobiana entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 74. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de fréjol contra *B. cereus* por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,666667	X
375	3	1,433333	X
500	3	1,91667	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375	*	-0,766667	0,161713
250 - 500	*	-1,25	0,161713
375 - 500	*	-0,483333	0,161713

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 75. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra *E. coli* por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,702222	2	0,351111	45,14	0,0002
Intra grupos	0,0466667	6	0,00777778		
Total (Corr.)	0,748889	8			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad Antimicrobiana entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 76. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra *E. coli* por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,833333	X
375	3	1,3	X
500	3	1,5	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375	*	-0,466667	0,220943
250 - 500	*	-0,666667	0,220943
375 - 500		-0,2	0,220943

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 77. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra *P. aeruginosa* por concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,595556	2	0,297778	53,60	0,0001
Intra grupos	0,0333333	6	0,00555556		
Total (Corr.)	0,628889	8			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad antimicrobiana entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 78. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra *P. aeruginosas* por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,933333	X
375	3	1,4	X
500	3	1,533333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375	*	-0,466667	0,186731
250 - 500	*	-0,6	0,186731
375 - 500		-0,133333	0,186731

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

Tabla 79. Anova para la actividad antimicrobiana de quinua contra *B. cereus* por concentración.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,920556	2	0,460278	4,19	0,0725
Intra grupos	0,658333	6	0,109722		
Total (Corr.)	1,57889	8			

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 Antimicrobiana entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 80. Pruebas de múltiples rangos para actividad antimicrobiana de quinua contra *B. cereus* por concentración.

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
250	3	0,75	X
375	3	1,133333	X
500	3	1,533333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
250 - 375		-0,383333	0,829849
250 - 500		-0,783333	0,829849
375 - 500		-0,4	0,829849

* indica una diferencia significativa.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X.

ANEXO H

**FIGURAS DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS EN ESTA
INVESTIGACIÓN.**

Figuras de las actividades realizadas durante esta investigación.



Figura 30. Molido del grano de fréjol rojo moteado.



Figura 34. Pesado de harina para precipitación isoeléctrica.



Figura 31. Tamizado de la harina Mesh N° 100.



Figura 35. Precipitación isoeléctrica de la proteína.



Figura 32. Desengrasado de harina de quinua con n-hexano.



Figura 36. Liofilizado de muestras.



Figura 33. Secado de la harina.

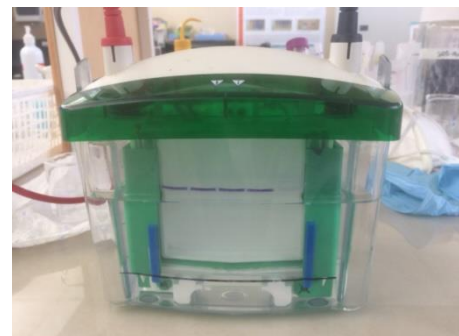


Figura 37. Técnica de electroforesis.



Figura 38. Método de cuantificación de proteína (Biuret).

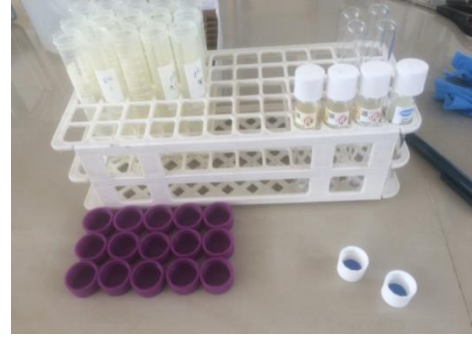


Figura 40. Actividad antiinflamatoria.



Figura 39. Actividad antioxidante.

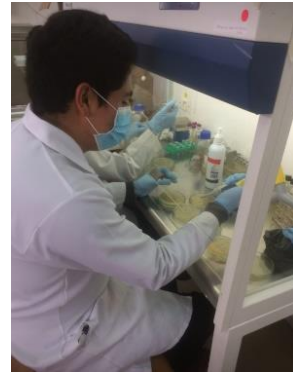


Figura 41. Actividad antimicrobiana.