



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

---

**Tema:** Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados proteicos de harina de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*.

---

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

El estudio es parte del proyecto: "**Valorización de la Calidad Nutricional y Funcional de Alimentos Tradicionales de la Población Ecuatoriana**" aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0248-CU-P-2017.

**Autor:** Anderson Aldair Aguinda Tanguila

**Tutora:** Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

AMBATO – ECUADOR

Enero – 2019

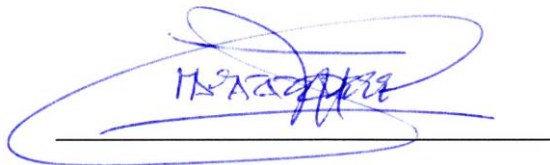
## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

**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, 17 de diciembre del 2018.



Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

C.I. 050187395-4

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Anderson Aldair Aguinda Tanguila, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters and numbers, positioned above a horizontal line.

Anderson Aldair Aguinda Tanguila

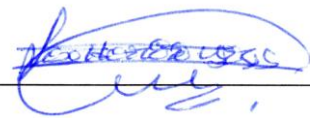
C.I. 150114841-3

**AUTOR**

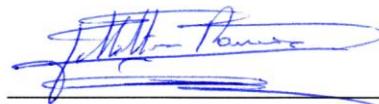
## APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Dr. José Homero Vargas López  
Presidente de Tribunal



Dr. Milton Rubén Ramos Moya  
C.I. 180111963-5



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

Ambato, 07 enero del 2019.

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

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

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

Anderson Aldair Aguinda Tanguila

C.I. 150114841-3

**AUTOR**

## DEDICATORIA

*Los triunfos hay que dedicarles a las personas que más amas en la vida, a los que te ayudaron a seguir en la batalla, es por eso que quiero dedicar todo mi esfuerzo a mis padres, especialmente a mi madre Irma Tanguila, gracias por su apoyo incondicional, por sus consejos, por la confianza y el cariño durante los momentos más difíciles de mi vida.*

*A mis abuelitos Carola, Santiago, Susana y Pedro por brindarme su cariño y amor cuando más lo necesitaba.*

*A mi querido Juliano Stefano por sacarme una sonrisa día a día y por empujarme a ser una mejor persona.*

*Gracias por formar parte de mi vida.*

*Anderson Aguinda*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por todas la bendiciones que me ha dado, por la salud, por la vida y por haberme dado una familia que fomentó en mí valores y deseos de superación.*

*A mi querida FCIAL-UTA, por haberme formado un profesional en la Ingeniería Bioquímica y también por darme la oportunidad haber sido Laboratorista de Química, impartiendo los conocimientos adquiridos en el aula y laboratorios para los futuros profesionales de la carrera de Alimentos, Biotecnología y Bioquímica.*

*Un agradecimiento muy especial a mi querida Tutora Mayra Paredes por su sencillez, humildad y calidad de persona que permitió una buena comunicación para llevar a cabo el Trabajo de Titulación.*

*A mis tíos y tías por haberme brindado consejos, especialmente a mi tía Verónica Aguinda por su cariño y confianza depositada para llegar a ser un profesional y por su ayuda en los momentos más difíciles de mi vida.*

*A mis grandes amigos Anita Tello, Diana Iler, Cristina Guevara, Geanella Bajaña, Mónica Núñez, Alexa Guerrero, Katherine López, Álvaro Díaz, José Cepeda y Lauro Noroña por brindarme su amistad desinteresada, por su apoyo incondicional y por haberme acompañado en este largo camino de vida universitaria.*

*Al grupo de investigación que conforma BIO-PROPEPTI, especialmente a Tatiana Poveda por estar dispuesta a compartir sus conocimientos, también al Dr. Jorge Briceño por la ayuda brindada en el desarrollo del Proyecto de titulación.*

*Gracias por brindarme su amistad.*

*Anderson Aguinda*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA.....	3
1.1 TEMA.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.2 HIPÓTESIS.....	8
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE HIPÓTESIS.....	8
CAPÍTULO III.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 MATERIALES.....	9
3.1.1 Materia Prima.....	9
3.1.2 Equipos.....	9
3.1.3 Reactivos.....	10
3.2 MÉTODOS.....	11
3.2.1 Desengrasado de Harina de Chocho.....	11
3.2.2 Obtención de aislados proteicos de harina chocho.....	11
3.2.3. Caracterización de los aislados proteicos.....	12
3.2.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE.....	12
3.2.3.2 Cuantificación proteica.....	14
3.2.4 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	15
3.2.5 Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos.....	16
3.2.6 Evaluación de la Actividad antioxidante de los aislados proteicos.....	18
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
CAPÍTULO IV.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	20



4.1.1 Rendimiento de los aislados proteicos.....	20
4.1.2 Caracterización de los aislados proteicos .....	21
4.1.2.1 Cuantificación proteica .....	21
4.1.2.2. Electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE.....	22
4.1.3 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	25
4.1.4 Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos .....	28
4.1.5 Evaluación de la Actividad antioxidante de los aislados proteicos .....	29
CAPÍTULO V.....	32
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	32
5.1 CONCLUSIONES .....	32
5.2 RECOMENDACIONES .....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del chocho (en 100 g en base seca). .....	6
Tabla 2. Volúmenes utilizados para la preparación de los geles de poliacrilamida. ....	13
Tabla 3. Rendimiento de los aislados proteicos de harina de chocho obtenidos a diferentes pH de precipitación. ....	20
Tabla 4. Valores de rendimiento de aislado proteico. ....	21
Tabla 5. Contenido proteico de los aislados de proteína de harina de chocho a diferentes pH de precipitación por dos métodos diferentes. ....	21
Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los aislados de proteicos de harina de chocho a diferentes pH de precipitación. ....	28
Tabla 7. Actividad antioxidante de los aislados de proteicos de harina de chocho a diferentes pH de precipitación. ....	30
Tabla 8. Pesos y rendimientos de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH a partir de 5 g de muestra de harina de chocho variedad 450 Andino. ....	42
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH. ....	42
Tabla 10. Prueba de comparación, Test Tukey, del rendimiento del aislado proteicos precipitado a diferentes pH. ....	42
Tabla 11. Datos de la curva estándar de pepsina para la cuantificación de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH. ....	44
Tabla 12. Valores de absorbancia de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 540 nm. ....	45
Tabla 13. Cálculo del contenido proteico (%) de la proteína aislada de chocho precipitada a diferentes pH, método Biuret. ....	45
Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) de la cuantificación proteica de los aislados de proteína de chocho precipitados a diferentes pH, método Biuret. ....	45
Tabla 15. Prueba de comparación, Test Tukey, de la cuantificación proteica del aislado de proteína precipitado a diferentes pH, método Biuret. ....	45
Tabla 16. Valores obtenidos de nitrógeno total (%) en los aislados proteicos de chocho precipitado a diferentes pH. ....	46
Tabla 17. Contenido de proteína (%) de los aislados proteicos de chocho precipitado a diferentes pH, método Kjeldahl. ....	46

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) de la cuantificación proteica de los aislados de proteína de chocho precipitados a diferentes pH, método Kjeldahl. ....	46
Tabla 19. Prueba de comparación, Test Tukey, de la cuantificación proteica del aislado de proteína precipitado a diferentes pH, método Kjeldahl. ....	46
Tabla 20. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 660 nm, sometidas a reacción con la albúmina de huevo. ....	48
Tabla 21. Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH. ....	49
Tabla 22. Actividad antiinflamatoria (%) del Diclofenaco sódico a diferentes concentraciones. ....	49
Tabla 23. Análisis de varianza (ANOVA), Diseño experimental AxB, entre el pH y concentración de los aislados proteicos de la actividad antiinflamatoria. ....	50
Tabla 24. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 100 µg/mL de la actividad antiinflamatoria. ....	51
Tabla 25. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 200 µg/mL de la actividad antiinflamatoria. ....	52
Tabla 26. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 500 µg/mL de la actividad antiinflamatoria. ....	52
Tabla 27. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 1000 µg/mL de la actividad antiinflamatoria. ....	53
Tabla 28. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 3 de la actividad antiinflamatoria. ....	53
Tabla 29. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 4 de la actividad antiinflamatoria. ....	54
Tabla 30. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 5 de la actividad antiinflamatoria. ....	54
Tabla 31. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 6 de la actividad antiinflamatoria. ....	55
Tabla 32. Comparación entre las concentraciones de Diclofenaco sódico (control positivo). ....	55
Tabla 33. Análisis de varianza (ANOVA) entre los tratamientos de la actividad antiinflamaatoria: pH y concentración de aislado proteico. ....	55

Tabla 34. Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antiinflamatoria). .....	56
Tabla 35. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 532 nm, sometidos a la reacción con aceite oxidado y ácido tiobarbitúrico.....	58
Tabla 36. Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH.....	59
Tabla 37. Actividad antioxidante (%) del vitamina C a diferentes concentraciones.....	59
Tabla 38. Análisis de varianza (ANOVA), Diseño experimental AxB, entre el pH y concentración de los aislados proteicos de la actividad antioxidante.....	60
Tabla 39. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 100 µg/mL de la actividad antioxidante. ....	61
Tabla 40. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 200 µg/mL de la actividad antioxidante. ....	62
Tabla 41. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 500 µg/mL de la actividad antioxidante. ....	62
Tabla 42. Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 1000 µg/mL de la actividad antioxidante. ....	63
Tabla 43. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 3 de la actividad antioxidante. ....	63
Tabla 44. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 4 de la actividad antioxidante. ....	64
Tabla 45. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 5 de la actividad antioxidante. ....	64
Tabla 46. Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 6 de la actividad antioxidante. ....	65
Tabla 47. Comparación entre las concentraciones de vitamina C (control positivo). ....	65
Tabla 48. Análisis de varianza (ANOVA) entre los tratamientos de la actividad antioxidante: pH y concentración de aislado proteico.....	65
Tabla 49. Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antioxidante). ....	66

## ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH se observan globulinas 7S cuyos pesos moleculares varían de 150 a 200 kDa.....	23
Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH se observa globulinas 11S (subunidades ácida y básica) y albúminas 2S. ....	24
Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH comparados con el estándar de peso molecular (kDa).....	25
Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la simulación de digestión gástrica (hidrolizado con pepsina) y duodenal (hidrolizado con pepsina y pancreatina a pH 7) del aislado proteico de chocho precipitado a pH 4 comparados con el estándar (kDa).....	27
Figura 5. Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes pH y a diferentes concentraciones ensayadas, con respecto al Diclofenaco (Control positivo). ....	29
Figura 6. Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes pH y a diferentes concentraciones ensayadas, con respecto a la vitamina C (Control positivo). ....	31
Figura 7. Curva estándar de Pepsina para la determinación de concentración de proteína mediante el Método Biuret. ....	44
Figura 8. Medias marginales estimadas de la Actividad antiinflamatoria (%) con respecto al pH de los aislados proteicos de chocho y del Diclofenaco sódico. ....	50
Figura 9. Medias marginales estimadas de la Actividad antiinflamatoria (%) con respecto a la concentración de los aislados proteicos de chocho y del Diclofenaco sódico.....	51
Figura 10. Medias marginales estimadas de la Actividad antioxidante (%) con respecto al pH de los aislados proteicos de chocho y del Vitamina C.....	60
Figura 11. Medias marginales estimadas de la Actividad antioxidante (%) con respecto a la concentración de los aislados proteicos de chocho y del Vitamina C. ....	61

## RESUMEN

El chocho es una leguminosa, perteneciente a la familia leguminosae (Fabaceae) del género lupinus, es una fuente rica en proteínas, contiene aminoácidos esenciales y grasas insaturadas. El interés por estudiar las propiedades funcionales del chocho ha aumentado debido a la calidad nutricional que presenta en relación a otras leguminosas. En este estudio, se evaluaron la digestibilidad gastrointestinal, la actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados de proteína de chocho. Los aislados proteicos se obtuvieron mediante precipitación isoeléctrica a diferentes pH, presentando en su perfil proteico bandas con pesos moleculares entre 6,5 y 30 kDa. El mayor rendimiento (31,4%) y el mayor contenido proteico (96,9%) presentaron el aislado a pH 5. Durante la determinación de la digestibilidad, las proteínas fueron hidrolizadas en su totalidad con pepsina (2000 U/mg) y pancreatina (100 U/mg), pues no se observaron polipéptidos en la digestión duodenal. La actividad antioxidante fue evaluada mediante la detección de peroxidación lipídica, obteniéndose como mejor tratamiento a pH 5 con una concentración de 1000 µg/mL (41,3%) y la actividad antiinflamatoria se determinó utilizando el método de la desnaturalización proteica, consiguiéndose como mejor tratamiento la concentración de proteína de 1000 µg/mL (18,2%).

La proteína de chocho presentó actividad antioxidante y antiinflamatoria por lo que podría ser utilizada como ingrediente funcional aportando un valor agregado a los alimentos ecuatorianos.

**Palabras claves:** chocho, aislados proteicos, digestibilidad gastrointestinal, electroforesis, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria.

## ABSTRACT

Lupine is a legume, belonging to the family leguminosae (Fabaceae) of the lupinus genus, is a rich source of protein, contains essential amino acids and unsaturated fats. The interest to study the functional properties of the cunt has increased due to the nutritional quality that it presents in relation to other legumes. In this study, gastrointestinal digestibility, antioxidant and anti-inflammatory activity of lupine protein isolates were evaluated. The protein isolates were obtained by isoelectric precipitation at different pH, presenting in their protein profile bands with molecular weights between 6.5 and 30 kDa. The highest yield (31.4%) and the highest protein content (96.9%) presented the isolate at pH 5. During the determination of the digestibility, the proteins were hydrolysed in their entirety with pepsin (2000 U/mg) and pancreatin (100 U/mg), since no polypeptides were observed in duodenal digestion. The antioxidant activity was evaluated by detecting lipid peroxidation, obtaining the best treatment at pH 5 with a concentration of 1000 µg/ml (41.3%) and the anti-inflammatory activity was determined using the protein denaturation method, achieving better treatment the protein concentration of 1000 µg/ml (18.2%).

The lupine protein presented antioxidant and anti-inflammatory activity that could serve as a functional element providing added value to Ecuadorian foods.

**Keywords:** lupine, protein isolates, gastrointestinal digestibility, electrophoresis, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio por sus siglas en inglés
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TBA</b>	Ácido 2-tiobarbitúrico
<b>%p/v</b>	Porcentaje peso-volumen
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>atm</b>	Atmósfera
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>μL</b>	Microlitros
<b>g</b>	Gramos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>U</b>	Unidades
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dibásico de sodio anhidro
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	Fosfato monobásico de sodio monohidratado



## INTRODUCCIÓN

El chocho es una planta dicotiledónea de la familia Leguminosas, tiene su origen en los Andes principalmente en Bolivia, Ecuador y Perú, donde se consumen en grano fresco. Esta leguminosa es cultivada en toda la región desde épocas antiguas (**Jiménez-Saiz et al., 2011**). Se estima que este cultivo constituía el 5% de la dieta diaria de las culturas prehispánicas, pero en la actualidad debido a su gran contenido de alcaloides que le confiere un sabor amargo ha sido sustituido por cultivos extranjeros, lo cual ha provocado una disminución en el área de cultivo a pesar de su buen contenido nutricional (**Caicedo et al., 2001**).

Los agricultores de la zona andina ecuatoriana han realizado sus cultivos con fines de comercialización y consumo, los cuales se concentran en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Tungurahua, Imbabura, Pichincha y Bolívar (**Peralta, 2016**). Afortunadamente, el cultivo de chocho se ha incrementado desde el 2001 al 2009 con un crecimiento de 1200 a 5000 hectáreas.

El grano de chocho posee alto contenido proteico y es muy nutritivo por la presencia de lisina, un aminoácido esencial muy limitado en otras fuentes de leguminosas. También posee alto contenido en grasas y las propiedades nutricionales superan a las presentadas por la soya. El chocho es considerado como una planta con un alto contenido proteico que trasciende a nivel mundial (**Suca & Suca, 2015**).

Además de las propiedades nutricionales del grano de chocho, las actividades biológicas juegan un papel importante para encontrar compuestos activos de origen natural que podrían mejorar la salud y reducir el riesgo de padecer de enfermedades (**Leelaprakash & Dass, 2011**). La inflamación es una respuesta de los tejidos del cuerpo humano ante estímulos dañinos que producen dolor y enrojecimiento como traumas físicos, exposiciones químicas, infecciones bacterianas o virales (**Ma et al., 2016**). La propiedad de una sustancia que reduce la inflamación es de naturaleza antiinflamatoria, por lo que existe en el mercado farmacéutico productos antiinflamatorios que alivian el dolor contrarrestando a la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual sintetiza prostaglandinas produciendo inflamación (**Chikkanna et al., 2016**), el uso prolongado de estos fármacos pueden provocar erosiones gástricas,

úlceras estomacales y en casos extremos, provocar hemorragias graves que pueden causar la muerte (**Maroon, Bost, & Maroon, 2010**).

Los antioxidantes son compuestos que pueden disminuir el daño oxidativo directamente al reaccionar con radicales libres o indirectamente al inhibir la actividad de enzimas generadoras de radicales libres o potenciar la actividad de enzimas antioxidantes intracelulares (**Lü et al., 2010**). Por lo que el estudio de la actividad antioxidante se utiliza ampliamente como parámetro para caracterizar diferentes sustancias y mezclas que son capaces de neutralizar los radicales libre (**Dawidowicz & Olszowy, 2011**).

Para incrementar la producción y consumo del grano de chocho es necesario que los pobladores de la zona andina del Ecuador conozcan del alto contenido de proteínas, el cual es una excelente fuente nutricional y además, posee propiedades funcionales que pueden aportar a la salud de la población ecuatoriana y al desarrollo socioeconómico de las comunidades aledañas fomentando la producción y preservación de esta leguminosa.

En el presente estudio se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aislados proteicos precipitados a diferentes pH y su digestibilidad mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### 1.1 TEMA

Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados proteicos de harina de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*.

#### 1.2 JUSTIFICACIÓN

El chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) posee un alto valor nutritivo que se cultiva en la región andina ecuatoriana (Villacreses, 2011). Se distingue por el contenido de proteína, por la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico a la planta y por la habilidad de adaptarse a medios ecológicos más secos, ubicados entre 2800 y 3600 m.s.n.m. (Génard *et al.*, 2016). El chocho es una opción factible en el desarrollo agroindustrial (Ortega-David *et al.*, 2010) que puede conducir a un desarrollo significativo contribuyendo numerosos beneficios de salud que contrarrestan problemas que están relacionadas con presión arterial alta, la resistencia a la insulina o un nivel de colesterol alto teniendo en cuenta que tendrá una importancia cada vez mayor (Miano, García, & Augusto, 2015).

Según Apunte & León (2012), el chocho es un alimento que consume la población ecuatoriana, especialmente de la región sierra ya que contiene un alto contenido de proteínas que supera el 50% en base seca. Esta característica a nivel mundial lo coloca en un plano comparable al de la soya que tiene valores aproximados de 40%. Otros estudios indican que el valor máximo de proteínas de chocho (*L. mutabilis*) es de 49,2% en cotiledones, mientras que en la semilla es de 44,9%, por lo tanto, poseen valores superiores al de otras materias primas utilizadas en la industria alimentaria (Ortega-David *et al.*, 2010).

Para el consumo directo del grano de chocho se aplica un proceso de desamargado, por la presencia de esparteína, lupinina y lupadinina, los cuales son alcaloides tóxicos y de sabor amargo (Caicedo *et al.*, 2001).

Existen diversos estudios que demuestran que las características nutricionales del chocho promueven una ventaja alimentaria. En Pasto, Colombia **Ojeda & Salazar (2011)**, reportan valores de alta digestibilidad y absorción reflejando la ganancia de peso en cuyes. En Ecuador **Farinango & Quizhpi (2015)**, reportan una buena aceptabilidad de un suplemento proteico de calcio y hierro a partir de chocho. En el sector rural del Ecuador se implementó suplementos nutricionales a base de harina de chocho para niños en edad escolar, principalmente para disminuir los efectos negativos de la desnutrición (**Vinueza, 2010**).

Según **Peralta et al., (2012)**, el chocho puede ser un rubro importante en la economía de pequeños y medianos productores, agroindustriales y comerciantes mediante el apoyo del gobierno y del sector privado, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), promueve capacitaciones a la cadena agroalimentaria del chocho, fortaleciendo la investigación de los granos andinos del Ecuador.

En consecuencia, el objetivo de esta investigación es caracterizar el aislado proteico mediante electroforesis aportando conocimiento científico confiable del perfil de proteínas, grado de digestibilidad y actividades biológicas como antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de harina de chocho, contribuyendo a incrementar la producción y actividad socio-económico de los agricultores conjuntamente con la nutrición de la población ecuatoriana.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar la Actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados proteicos de harina de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Aislar las proteínas de la harina de chocho por precipitación isoeléctrica a diferentes pH.
- Caracterizar los aislados proteicos mediante la evaluación de la digestibilidad gastrointestinal (*in vitro*) empleando la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

- Determinar la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de la harina de chocho aplicando el método de desnaturalización de proteínas.
- Cuantificar la capacidad antioxidante de los aislados proteicos de la harina de chocho mediante el método TBARS.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

El chocho es una leguminosa con un alto contenido de proteína, grasa y fibra (**Lampart-Szczapa et al., 2003**). Es considerado un competidor potencial de la soya (**Materska et al., 2003**). El grano de chocho amargo en presencia de alcaloides quinolizidínicos contiene un promedio de 42% de proteínas, en base seca; mientras que en el proceso de desamargado se concentra más el contenido de este nutriente, obteniendo valores de hasta 51% de proteína, en base seca, tal como se muestra en la Tabla 1. También posee un alto contenido de aceite de 18 a 22% de ácidos grasos linoleico y linolénico; y aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) que es una característica de esta leguminosa (**Villacrés et al., 2006**).

**Tabla 1.** Composición química del chocho (en 100 g en base seca).

Proteína	51 %
Grasa	20,4 %
Carbohidrato	28,2 %
Fibra	7,3 %
Ceniza	2,2 %
Calcio	0,42 %
Fósforo	0,43 %

**Fuente: Rivera et al. (1998).**

Varias investigaciones realizadas por el INIAP y la UDLA (**Oliva, 2015**) han comprobado que el chocho contiene colesterol bueno (HDL – lipoproteínas de alta densidad), beneficioso para el organismo que controla el sobrepeso por su alto contenido de fibra, por lo tanto, disminuye el colesterol malo (LDL – lipoproteínas de baja densidad).

El chocho presenta características funcionales por contener fósforo lo cual ayuda a controlar el calcio en el mantenimiento del sistema óseo, actividad del músculo cardíaco y producción de energía (**De la Torre, 2013**). El Centro de Investigación

Traslacional de la Universidad de las Américas, ha reportado que el chocho andino de Ecuador posee un principio activo denominado Gamma conglutin, que reduce los niveles de glucosa en la sangre (**Baldeon *et al.*, 2012**).

Además, el cultivo chocho tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mejorando la calidad del suelo gracias al sistema radicular (**Caicedo & Peralta, 2001**), y por su gran contenido de proteína, minerales y vitaminas, fortalece la nutrición de la población ecuatoriana. Por lo que la producción, procesamiento y comercialización crea fuentes de trabajo y mejores ingresos.

El Instituto de la Grasa-CSI, **Millán-Linares *et al.* (2014)**, reportan el aislamiento de proteínas de chocho mediante hidrólisis enzimática con dos proteasas (Alcalasa e Izyme) con el fin de estudiar su potencial capacidad antiinflamatoria mediante la inhibición *in vitro* de las enzimas involucradas en el proceso inflamatorio: fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa 2 (COX-2), trombina y transglutaminasa (TG). La mejor actividad inhibitoria que encontraron en los hidrolizados de proteína de chocho (HPL) obtenidos fueron después de 15 minutos con Alcalasa y en los HLP obtenidos después de 60 minutos de hidrólisis con Izyme seguido de 15 minutos de hidrólisis con Alcalasa; dando como resultado que ambos hidrolizados inhibieron competitivamente la actividad de trombina y PLA2. No así en el caso COX-2 y TG, donde reportan una inhibición de tipo mixto, es decir, la combinación de dos tipos reversibles de inhibición enzimática, inhibición competitiva e inhibición no competitiva (**Lqari *et al.*, 2002**).

Mediante la hidrólisis enzimática de proteínas de origen vegetal, es posible producir péptidos con actividad antimicrobiana (**Dubin *et al.*, 2005**), los mismos que pueden ser usados como alimentos funcionales debido a que en la industria alimentaria los agentes antimicrobianos utilizados como aditivos en los alimentos pueden prevenir infecciones o enfermedades (**Rodríguez & Schöbitz, 2009**). El chocho es una leguminosa subutilizada, que posee un alto contenido de proteína, de la cual se puede obtener el aislado proteico, y mediante hidrólisis enzimática *in vitro*, péptidos con actividades biológicas como antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana.

## **2.2 HIPÓTESIS**

¿Existe influencia del pH de precipitación en el rendimiento, presencia de proteínas, actividad antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de la harina de chocho?

### **Hipótesis nula**

**Ho:** El pH de precipitación no influye en el rendimiento, presencia de proteínas, actividad antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de la harina de chocho.

### **Hipótesis alternativa**

**Ha:** El pH de precipitación influye en el rendimiento, presencia de proteínas, actividad antiinflamatoria y antioxidante de los aislados proteicos de la harina de chocho.

## **2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE HIPÓTESIS**

**1. Variable independiente:** pH

**1.1 Variable dependiente:** Rendimiento de los aislados proteicos

**1.2 Variable dependiente:** Presencia de proteínas

**1.3 Variable dependiente:** Actividad antiinflamatoria

**1.4 Variable dependiente:** Actividad antioxidante



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Materia Prima

La matriz de harina de chocho variedad INIAP 450 Andino fue proporcionada por la Escuela Politécnica Nacional (EPN) dentro del marco del proyecto REDU “**Valorización de la Calidad Nutricional y Funcional de Alimentos Tradicionales de la Población Ecuatoriana**” de la Red de Cereales, Leguminosas y Afines para las respectivas pruebas experimentales.

##### 3.1.2 Equipos

- Balanza analítica de precisión AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Balanza analítica VWR-224AC
- Plancha de calentamiento y agitación VWR
- Centrífuga, eppendorf Modelo 5702
- Microcentrífuga Labnet Modelo C2400-B
- Espectrofotómetro
- pH-metro Mettler Toledo y Thermo scientific
- Liofilizador SP SCIENTIFIC
- Congelador Panasonic (-80 °C) MDT-U33V-PA
- Congelador Mabe
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470
- Termobloque, Esco, Provolcell Shaking
- Vórtex Mixer VWR
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- Estufa lan incubator Modelo In-010
- Incubadora VWR
- Espectrofotómetro UV-Visible EVOLUTION 201 THERMO
- Baño de agua para uso general POLYSCIENCE

- Destilador de agua OSMOPURIF WATER

### **3.1.3 Reactivos**

- Hidróxido de sodio EMSURE
- Ácido clorhídrico EMSURE
- Ácido sulfúrico EMSURE
- Bicarbonato de sodio EMSURE
- Cloruro de calcio EMSURE
- Ácido acético glacial EMSURE
- Tartrato de sodio y potasio – tetrahidratado EMSURE
- Sulfato de cobre EMSURE
- Yoduro de potasio EMSURE
- Etanol EMSURE
- Metanol EMSURE
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) EMSURE
- Pancreatina IMPROVE – Pepsina de la mucosa gástrica de porcina SIGMA
- Fosfato di ácido de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) EMSURE
- Fosfato sódico dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) EMSURE
- Persulfato de amonio (PSA) BIORAD
- Tris-HCl BIORAD
- Acrilamida BIORAD
- Dodecilsulfato sódico (SDS) BIORAD
- Temed BIORAD
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) BIORAD
- Glicerol BIORAD
- Glicina BIORAD
- Azul de bromofenol BIORAD
- 2-mercaptoetanol BIORAD
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) MERCK
- Azul de comassie BIORAD
- Arbolito Aceite de oliva extra virgen
- Diclofenáco sódico – genérico MK

- Alcohol antiséptico 70%
- n-hexano EMSURE
- Azul comassie FISHER BIOREAGENTS
- Agua destilada

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Desengrasado de Harina de Chocho

La harina de chocho se desengrasó mediante la técnica descrita por **Padilla *et al.* (2010)**, con modificaciones. Se usó n-hexano como solvente para realizar el proceso desengrasado de la harina de chocho con una relación 1:10 (p/v). El proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua durante 18 horas y en reposo durante 6 horas, así completando el proceso del solvente con la harina en contacto por 24 horas. Posteriormente, se separó por filtración la harina del n-hexano y se la dejó a temperatura ambiente en la campana extractora de gases durante 12 horas esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de n-hexano. La harina se almacenó a 4°C hasta su utilización.

### 3.2.2 Obtención de aislados proteicos de harina chocho

Los aislados proteicos de la harina de chocho se obtuvieron según el método descrito por **Martínez & Anón (1996)**, con modificaciones.

La harina de chocho se disolvió en agua destilada en una relación 1:10 (p/v), se ajustó a pH 8 con NaOH 2 M y se dejó en agitación durante una hora manteniendo el pH constante, luego la mezcla fue llevada a centrifugación durante 45 minutos y 4400 rpm. Se desechó el precipitado y se filtró el sobrenadante para eliminar residuos que interfieran en las pruebas experimentales, el sobrenadante se ajustó a pH 3, 4, 5, 6 con HCl 2 M, se dejó en agitación durante 5 minutos manteniendo el pH constante y se llevó a refrigeración (4 °C) por 24 horas para luego eliminar el sobrenadante y obtener el precipitado de proteína. Posteriormente en un frasco plástico con tapa hermética se añadió y fue llevado a un congelador a -80 °C. Finalmente fueron liofilizados las muestras aisladas con las condiciones estándares del equipo (presión: < 0,2 atm; temperatura < -55 °C) y guardadas a 4 °C. Con esto se determinó el pH óptimo de precipitación y el porcentaje de rendimiento.

### **3.2.3. Caracterización de los aislados proteicos**

#### **3.2.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE**

Para la caracterización de aislados de proteína de la harina de chocho se utilizó la técnica analítica de electroforesis en gel con dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes utilizando el método descrito por **Laemmli (1970)**, con modificaciones.

Las muestras de aislados proteicos fueron expuestas en un campo eléctrico constante de 200 Voltios (V) durante 45 minutos utilizando el equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), luego los geles fueron introducidos con cuidado en una tarina de plástico con una solución de azul de coomassie hasta que cubra el gel y se lo dejó por toda la noche para que se tiñan las bandas. Posteriormente, los geles fueron colocadas en un recipiente con abundante solución de desteñido hasta observar las bandas del gel teñidas y luego el gel de poliacrilamida fue fotografiado mediante el uso de una cámara.

**Azul de comassie:** 40 mL H<sub>2</sub>O destilada, 0,1 g de azul de comassie; 50 mL de metanol; 10 mL de ácido acético glacial.

**Solución de desteñido:** 45 mL de metanol; 50 mL de etanol; 5 mL ácido acético glacial.

#### **- Preparación de la muestra**

Se pesó 10 mg de la proteína aislada para cada pH (3, 4, 5 y 6) en un tubo eppendorf, se añadió 1 mL de agua destilada cuya mezcla se agitó en un vortex MIXER VWR hasta que la proteína aislada se disuelva, de la solución obtenida se tomaron 200 µL y se añadió en un tubo eppendorf. Posteriormente, se añadió 200 µL de solución buffer de muestra y se agitó nuevamente en el vortex. Finalmente, las muestras se colocaron en un termobloque a las condiciones: 80 °C, 10 min y 450 rpm.

**Buffer de muestra:** 4,8 mL H<sub>2</sub>O destilada; 2 mL Tris-HCl 1 M pH 6,8; 1 mL de glicerol puro; 2 mL SDS 10%; 0,6 mL β-mercaptoetanol; 0,1 g de azul de bromofenol.

- **Preparación del gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

La preparación del gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) consistió en la polimerización del gel de poliacrilamida en dos placas de vidrio con 1 mm de espesor. Los volúmenes utilizados se muestran en la Tabla 2. El gel estuvo compuesto por dos capas, la primera capa con una concentración del 14% de gel de poliacrilamida, llamado gel separador y la segunda capa con una concentración del 4% de gel de poliacrilamida, llamado gel concentrador.

**Tabla 2.** Volúmenes utilizados para la preparación de los geles de poliacrilamida.

<b>Gel separador (Gel abajo)</b>		<b>Gel concentrador (gel arriba)</b>	
Agua destilada	1,425 mL	Agua destilada	2,2 mL
Tris-HCl 1 M (pH 8,8)	3 mL	Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8)	0,42 mL
Acrilamida 30%	3 mL	Acrilamida 30%	0,7 mL
SDS 10%	75 µL	SDS 10%	3,3 µL
TEMED	9 µL	TEMED	6 µL
PSA 10%	30 µL	PSA 10%	20 µL

Posteriormente polimerizados los geles de poliacrilamida, se colocaron en la cámara de electroforesis y se añadió una solución buffer running. Luego se cargaron 20 µL de cada muestra preparada dentro de cada pocillo con concentración 10 mg/mL de proteína aislada.

**Buffer running:** 1,5 g Tris-HCl; 7,2 g glicina; 0,5 g de SDS; 500 mL H<sub>2</sub>O destilada.

Para la caracterización de los aislados proteicos de chocho sin β-mercaptoetanol, se realizó el mismo proceso de preparación de la muestra, pero con la diferencia que se utilizó 200 µL de solución de buffer de muestra sin el reactivo de β-mercaptoetanol.

Para la caracterización de las proteínas a condiciones no desnaturizantes, se realizó la Electroforesis Native-PAGE, se pesó 10 mg de la proteína aislada de cada pH y se añadió 600 µL de Buffer de muestra Native-PAGE directamente en la proteína extraída. Para la preparación del gel se realizó con todas las especificaciones detalladas en la Tabla 2, a excepción de SDS. Luego de tener el gel de poliacrilamida polimerizados, se colocaron en la cámara de electroforesis y se añadió una solución buffer running Native-PAGE. Luego se cargaron 20 µL de cada muestra preparada dentro de cada pocillo con concentración 10 mg/mL de proteína aislada.

**Buffer de muestra Native-PAGE:** 4,8 mL H<sub>2</sub>O destilada; 2 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1 mL glicerol puro; 0,1 g de azul de bromofenol.

**Buffer running Native-PAGE:** 1,5 g Tris; 7,2 g glicina; 500 mL H<sub>2</sub>O destilada.

### 3.2.3.2 Cuantificación proteica

#### Método colorimétrico de Biuret

Para la cuantificación proteica de aislados de proteína de la harina de chocho se aplicó el método de Biuret descrito por **Gornall *et al.*, (1949)**. El cual se determinó de acuerdo con la intensidad de coloración del complejo, midiendo su absorbancia. El complejo que se formó fue de una coloración violeta al unirse el Cu<sup>2+</sup> y los grupos NH de los enlaces peptídicos al encontrarse en un medio básico.

#### - Preparación del reactivo de Biuret

Se pesó 9 g de tartrato de sodio y potasio, 3 g de sulfato de cobre y 5 g de yoduro de potasio en la balanza. Estos reactivos se disolvieron en 400 mL de NaOH 0,2 M en el orden descrito, luego en un balón de aforo de 100 mL se añadió y se ajustó con 600 mL de agua destilada.

#### - Preparación de la muestra

Se pesó 10 mg del aislado proteico de cada pH por duplicado en tubos eppendorf y se taró la balanza analítica, luego se añadió 1 mL de agua destilada, 75 µL de NaOH 0,2 M y se anotó el peso final. Posteriormente, se llevó a agitación con la ayuda de magnetos durante 10 minutos. Luego se añadió en tubos eppendorf 1,25 mL del reactivo de Biuret y las muestras que estaban en agitación se tomaron dos alícuotas

de 250  $\mu$ L por cada pH y se llevó a la centrifuga por 30 min a 13000 rpm. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm de longitud de onda.

#### - **Preparación del blanco**

En un tubo eppendorf, se añadió 1 mL de agua destilada y 75  $\mu$ L de NaOH 0,2 M, luego se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L en un tubo eppendorf y se añadió 1,25 mL de la solución de Biuret.

#### **Método Analizador Elemental**

Para la determinación de contenido de proteína de los aislados proteicos de harina de chocho se utilizó el método Kjeldahl descrito por AOAC (2005), el cual determina el contenido de nitrógeno total en las muestras. Se utilizó 0,15 g de la proteína aislada de harina de chocho por cada pH y se sometió a digestión con Ácido sulfúrico concentrado, tras la digestión se neutralizó con NaOH al 30% de concentración y se destiló la solución digerida con vapor de agua en una cámara de destilación iluminada. Luego el destilado se recolectó en una solución de ácido bórico y se tituló con HCl 0,1 M. Posteriormente se determinó el contenido de nitrógeno en la muestra y para la cuantificación del contenido de proteínas se calculó utilizando el factor de conversión 5,7. La cuantificación del contenido proteico se realizó por triplicado por cada pH (3, 4, 5, 6).

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

Se aplicó el método descrito por Jiménez-Saiz *et al.*, (2011). Se trabajó con los aislados proteicos de la harina de chocho de pH 4 para la evaluación de la digestión gástrica y duodenal utilizando una solución de NaCl 0.35 M a pH 1,2; 2; 3,2 y pH 3,2; respectivamente. Se simuló un medio muy similar al de la digestión humana, en la digestión gástrica se complementó con la simulación de los fluidos gástricos con la pepsina, en cambio en la digestión duodenal se empleó fluidos que simulan los jugos pancreáticos y sales biliares.

#### **Digestión gástrica**

Se pesó 10 mg de aislado proteico de harina de chocho de pH 4 en tres tubos eppendorf y se añadió 1 mL de solución de NaCl 0,35 M de pH 1,2; 2,0; y 3,2 para

cada tubo eppendorf simulando las condiciones del estómago, luego se agitó en el vortex hasta que se disuelva completamente y se añadió 100 µL de pepsina porcina a una concentración de 2000 U/mg. Posteriormente se colocó en el termobloque a las condiciones de 37 °C, 120 min y 450 rpm. Luego de transcurridas las condiciones, se añadió 100 µL de bicarbonato de sodio en cada muestra y se colocó nuevamente en el termobloque a las condiciones de 80 °C, 10 min y 450 rpm para inactivar la enzima.

Para la preparación de las muestras de la digestión gástrica, se añadió 200 µL de cada pH (condiciones del estómago) en tres tubos eppendorf con 200 µL β-mercaptoetanol. Luego se cargaron 20 µL de la muestra preparada en los pocillos del gel de electroforesis. Finalmente, se empleó la técnica de electroforesis SDS-PAGE con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), utilizando un voltaje constante de 200 V para comprobar la digestión gástrica de las proteínas aisladas.

### **Digestión duodenal**

Para la digestión duodenal se tomó 1 mL de muestra de la digestión gástrica con NaCl 0,35 M a pH 3,2 antes de adicionar 100 µL de bicarbonato, se colocó en un tubo eppendorf, luego se añadió 1 mL de una mezcla de sales biliares 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM y pancreatina 100 U/mg; y se ajustó a pH 7 con NaOH 1 M. Luego se colocó en el termobloque a las condiciones de 37 °C, 120 min y 450 rpm. Después de transcurrir el tiempo establecido, se detuvo la reacción cambiando las condiciones del termobloque a 80 °C, 10 min y 450 rpm. Posteriormente, en un nuevo tubo eppendorf se añadió 200 µL de la muestra tratada de la digestión duodenal con 200 µL β-mercaptoetanol. Luego se cargaron 20 µL muestra preparada en los pocillos del gel de electroforesis. Finalmente, se determinó la digestión duodenal aplicando la técnica de electroforesis SDS-PAGE con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II., utilizando un voltaje constante de 200 V.

### **3.2.5 Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos**

Para la determinar la actividad antiinflamatoria de los aislados de proteína de la harina de chocho se utilizó el método descrito por **Alhakmani et al. (2013)**, con



modificaciones. Las concentraciones de las muestras con las que se trabajó fueron de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL a diferentes pH del aislado proteico de la harina de chocho y también se utilizó Diclofenaco sódico (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) como control positivo a las mismas concentraciones del aislado proteico.

#### - **Preparación de la muestra**

Se pesó 0,2; 0,4; 1,0 y 2,0 mg de la proteína aislada en tubos eppendorf por cada pH y se añadió 2 mL de agua destilada, luego se agitó en el vortex hasta que se disuelva la proteína aislada. También se preparó una solución buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 6,4. Posteriormente para obtener una solución homogénea de la solución buffer con la albúmina de huevo, en un vaso de precipitación se añadió 70 mL de la solución buffer a pH 6,4 y 5 mL de albúmina; y se homogenizó en una plancha de agitación con la ayuda de un agitador magnético. Después, se añadió 2 mL de la proteína disuelta en tubos de ensayo de 10 mL por cada pH y 3 mL de la solución homogénea de solución buffer y albúmina (2,8 mL y 0,2 mL) y se mezcló moderadamente con la ayuda de una tapa para tubos de ensayos.

Luego se llevó las muestras a una incubadora a temperatura de 37 °C durante 15 min, después al termostato a una temperatura de 70 °C durante 10 min. Pasado este tiempo, las muestras se llevaron a agua a temperatura ambiente para detener la reacción. Como último paso se midió la absorbancia de las muestras a 660 nm y se usó agua destilada como blanco.

Además, se preparó un estándar o control positivo de Diclofenaco sódico siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra. La actividad antiinflamatoria se determinó mediante la ecuación 1 de porcentaje de inhibición de la proteína desnaturalizada.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{a-b}{b} \times 100 \quad (\text{Ec 1})$$

Donde:

a= absorbancia de la muestra (concentración proteica + albúmina), (Diclofenaco + albúmina)

b= absorbancia de la albúmina desnaturalizada

Estos ensayos se realizó con las proteínas aisladas a diferentes pH y por cuadruplicado.

### **3.2.6 Evaluación de la Actividad antioxidante de los aislados proteicos**

Para la determinación de la actividad antioxidante de los aislados proteicos de la harina de chocho se aplicó la técnica descrita por **Guzmán-Chozas *et al.* (1997)**, con modificaciones en las concentraciones de las muestras. Las concentraciones fueron de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL a diferentes pH de los aislados proteicos, luego se utilizó aceite de oliva oxidado con la muestra en relación 1:1 v/v (500 µL:500 µL). Posteriormente, se preparó una solución de TBA 1 mM para añadir a las concentraciones a diferentes pH. Se utilizó un fármaco antioxidante capaz de rechazar la acción nociva de oxidantes como control positivo a las mismas concentraciones de los aislados proteicos.

#### **- Preparación de la muestra**

Se pesó 0,2; 0,4; 1,0 y 2,0 mg de proteína extraída de harina de chocho en tubos eppendorf por cada pH, se añadió 2 mL de agua destilada y se agitó en el vortex hasta que la proteína se disuelva. Luego en otro tubo eppendorf se añadió 500 µL de la proteína disuelta y 500 µL de aceite oxidado. El aceite oxidado que se empleó fue aceite de oliva “Arbolito” con 2 semanas de oxidación de acuerdo con las siguientes condiciones en la estufa, 40 °C y 70 °C, una semana de oxidación por cada condición de temperatura. Luego de añadir los 500 µL del aceite oxidado, se colocó en el termobloque a las condiciones de 28 °C, 13 horas y 450 rpm. Posteriormente se añadió 1 mL de solución de TBA 1% (0,5 g de Ác. Tiobarbitúrico, 40 ml de Ác. Acético glacial y 10 mL de agua destilada) y se colocó nuevamente en el termobloque a las condiciones de 95 °C, 60 min y 450 rpm. Por último, las muestras se enfriaron sumergiéndoles en hielo durante 15 minutos, luego se midió la absorbancia a 532 nm y se usó agua destilada como blanco.

Además, se preparó un control positivo con un fármaco antioxidante, Vitamina C, siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra.

El porcentaje de actividad de oxidación se determinó mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ act. oxidación} = \frac{a-b}{b} \times 100 \quad (\text{Ec } 2)$$

Donde:

a= absorbancia de la muestra (concentración proteica + aceite oxidado), (Vitamina C + aceite oxidado)

b= absorbancia del aceite oxidado

Estos ensayos se realizaron con las proteínas aisladas a diferentes pH y por triplicado.

### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental que se aplicó fue AxB para las actividades biológicas de los aislados proteicos.

Para las actividades antiinflamatoria y antioxidante se trabajó con los siguientes factores:

**FACTOR A:** pH de precipitación proteica

Niveles a<sub>0</sub>: 3,0; a<sub>1</sub>: 4,0; a<sub>2</sub>: 5,0; a<sub>3</sub>: 6,0

**FACTOR B:** Concentración de los aislados proteicos

Niveles b<sub>0</sub>: 100 (µg/mL); b: 200 (µg/mL); b<sub>2</sub>: 500 (µg/mL); b<sub>3</sub>: 1000(µg/mL)

El análisis de varianza (ANOVA) fue analizado con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22, presentados con la media de tres repeticiones ± la desviación estándar para la actividad antioxidante y cuatro repeticiones ± la desviación estándar para la actividad antiinflamatoria. El análisis de varianza y la prueba de comparación de Tukey se aplicaron a un nivel de confianza de 95% para la determinación de diferencias significativas y los mejores tratamientos de cada ensayo.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

##### 4.1.1 Rendimiento de los aislados proteicos

El rendimiento de los aislados proteicos de la harina de chocho variedad 450 Andino, fueron obtenidos mediante precipitación isoelectrica usando agua como solvente. En la Tabla 3, se muestra a pH 5 un mayor rendimiento de aislado proteico en base seca con 31,4%, seguido del pH 4 con 28,6% y el de menor rendimiento fue a pH 3 con 18,5%.

**Tabla 3.** Rendimiento de los aislados proteicos de harina de chocho obtenidos a diferentes pH de precipitación.

pH	Rendimiento de aislado proteico (%)
3	18,5 <sup>a</sup> ± 0,62
4	28,6 <sup>c</sup> ± 0,69
5	31,4 <sup>d</sup> ± 0,32
6	24,7 <sup>b</sup> ± 0,66

Promedio ± incertidumbre expresada como desviación estándar, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre los tratamientos, Test de Tukey.

Se determinó que a pH 5 fue el pH de precipitación con mayor aislado proteico, el mismo que es similar al reportado (Tabla 4) por **Acuña & Caiza (2010)**, quienes trabajaron a un pH de solubilización de 10,5 y de precipitación a pH 4,5 obteniendo un mayor rendimiento de aislado proteico de chocho de 42,6%. En otro reporte realizado en la Escuela Politécnica Nacional (EPN) con la colaboración del INIAP – Estación Experimental Santa Catalina realizaron la precipitación isoelectrica del chocho, previamente con un pH solubilización de 8,5 y de precipitación a pH 4,5 obteniendo un rendimiento del aislado proteico de 30,7% (**Villacrés, 2001**).

**Tabla 4.** Valores de rendimiento de aislado proteico.

pH de solubilización	pH de precipitación	Rendimiento de aislados proteicos (%)	Referencia
10,5	4,5	42,6	(Acuña & Caiza, 2010)
8,5	4,5	30,7	(Villacrés, 2001)
8	5	31,4	(UTA, 2018)

#### 4.1.2 Caracterización de los aislados proteicos

##### 4.1.2.1 Cuantificación proteica

Se determinó el contenido proteico de los aislados de proteína de la harina de chocho a diferentes pH mediante el método colorimétrico de Biuret (**Badui, 2006**). Se realizó el método de Biuret utilizando una curva estándar de pepsina y método Kjeldahl para la determinación del contenido proteico, los resultados arrojados se observan en la Tabla 5 a diferentes pH.

**Tabla 5.** Contenido proteico de los aislados de proteína de harina de chocho a diferentes pH de precipitación por dos métodos diferentes.

pH	Contenido proteico (%)	
	Biuret, n=4	Kjeldahl, n= 3
3	76,8 <sup>a</sup> ± 1,44	55,1 <sup>a</sup> ± 1,81
4	95,0 <sup>b</sup> ± 3,17	69,1 <sup>b</sup> ± 0,98
5	96,9 <sup>b</sup> ± 0,51	69,9 <sup>b</sup> ± 0,28
6	95,6 <sup>b</sup> ± 2,82	74,9 <sup>c</sup> ± 0,69

Promedio ± incertidumbre expresada como desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a diferentes pH de precipitación, Test de Tukey.

Para el Método de Biuret, no hubo diferencia significativa a pH 4, 5 y 6, siendo a pH 5 con mayor contenido proteico de 96,9% y a pH 3 con contenido proteico de 76,8% habiendo diferencia significativa con los demás pH. Por tanto, el pH es un factor importante que influye en el contenido de proteico de los aislados.

Según **Villacrés (2001)**, el contenido proteico de la harina de chocho es de 99,3% mediante la solubilización a pH de 8,5 y de precipitación isoelectrica a pH 4,5, se

puede atribuir que resultados obtenidos a pH 4 y 5 están cerca a los valores obtenidos en este estudio, con la única diferencia que se trabajó con un pH 8.

También, el contenido de proteínas fue cuantificado con el Método Kjeldahl, el cual determina el porcentaje de nitrógeno total en la muestra. En la Tabla 5, se muestra que a pH 6 tiene un mayor contenido proteico con 74,9%, seguido a pH 4 y 5 que tienen valores de 69,9 y 69,1%; respectivamente, mientras a pH 3 tiene el menor contenido proteico con 55,1%.

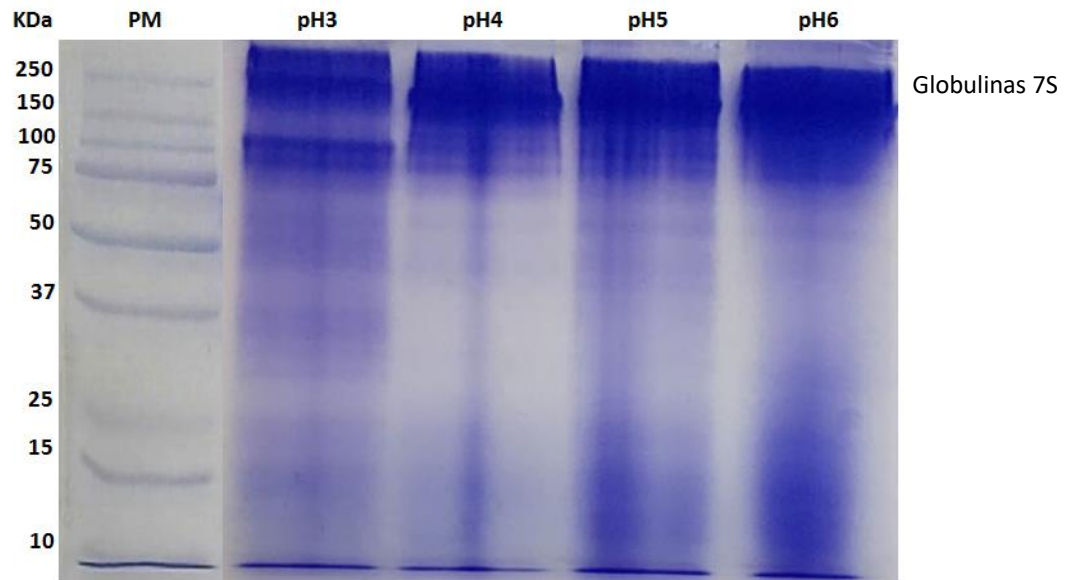
Según **Pérez, Peñafiel & Delgado (2017)**, el contenido proteico de la harina de chocho desamargado tiene 56,7% con respecto al chocho sin desamargar que tiene 43,5%, cabe recalcar que la harina no está expuesta a cambios de pH es por ello que el contenido proteico es menor; estos resultados difieren de lo mencionado **Acuña & Caiza (2010)**, quienes reportan valores de 78,9% de contenido proteico mediante una solubilización básica de pH 10,5 y una precipitación isoelectrica a pH 4,5.

Por lo tanto, al realizar un proceso de desamargado en el grano de chocho aumenta el porcentaje de contenido proteico debido a la reducción del contenido de alcaloides que son tóxicos hasta un límite aceptable para nuestro organismo (**Pablo-Pérez et al., 2015**).

Al comparar los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de cuantificación, se observó valores diferentes. Esto es explicado debido a que en el Método de Biuret se mide los enlaces peptídicos y al poseer mayor contenido proteico representa la presencia de dos o más enlaces peptídicos consecutivos (**Suca & Suca, 2015**); mientras que el Método Kjeldahl mide el nitrógeno total dentro de una muestra.

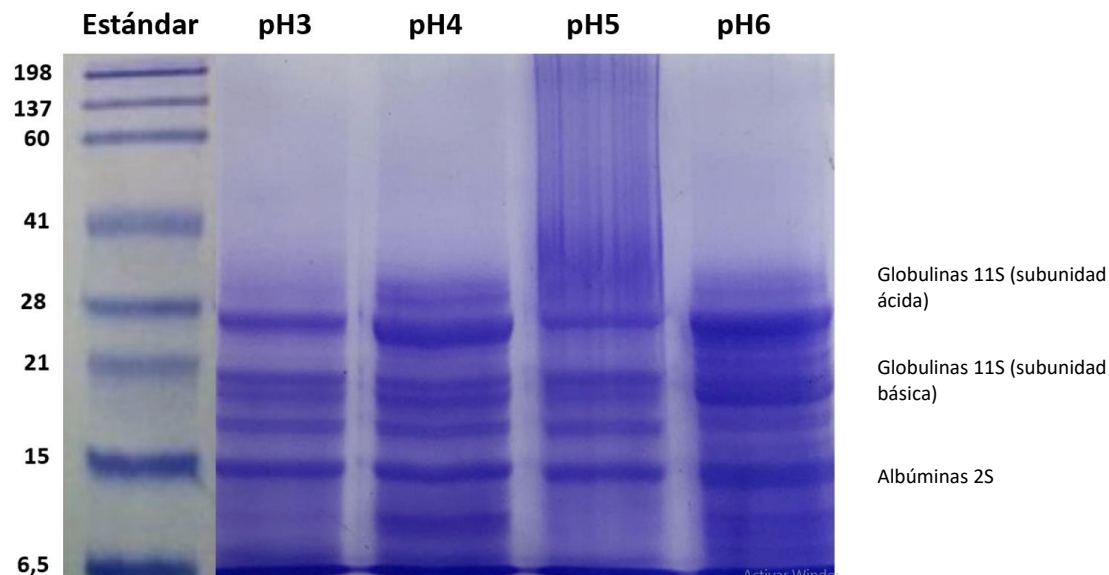
#### **4.1.2.2. Electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE**

En la Figura 1, se identifican estructuras polipeptídicas con diferentes pesos moleculares que varían entre 150 a 200 kDa en el aislado proteico de pH 4, 5 y 6, los cuales corresponden a globulinas 7S porque el peso molecular de esta proteína varía entre 150 a 190 kDa (**Espitia, Negrete, Ordoñez, & León, 2016**).



**Figura 1.** Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH se observan globulinas 7S cuyos pesos moleculares varían de 150 a 200 kDa.

Los aislados proteicos de harina de chocho fueron caracterizados a diferentes pH obtenidos bajo condiciones reductoras mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 2, se identifican estructuras polipeptídicas con diferentes pesos moleculares de 6,5 hasta 30 kDa aproximadamente. Las Albúminas 2S corresponden a las bandas de 6,5 a 15 kDa, las globulinas 11S (subunidad básica) se encuentran entre 18 y 28 kDa; y las globulinas 11S (subunidad ácida) son mayores a 28 kDa. En este perfil proteico no se identificó globulinas 7S cuyo peso molecular varía de 150 a 190 kDa (**Espitia et al., 2016**). En el perfil proteico se observan polipéptidos más abundantes y con mayor claridad a pH 4.

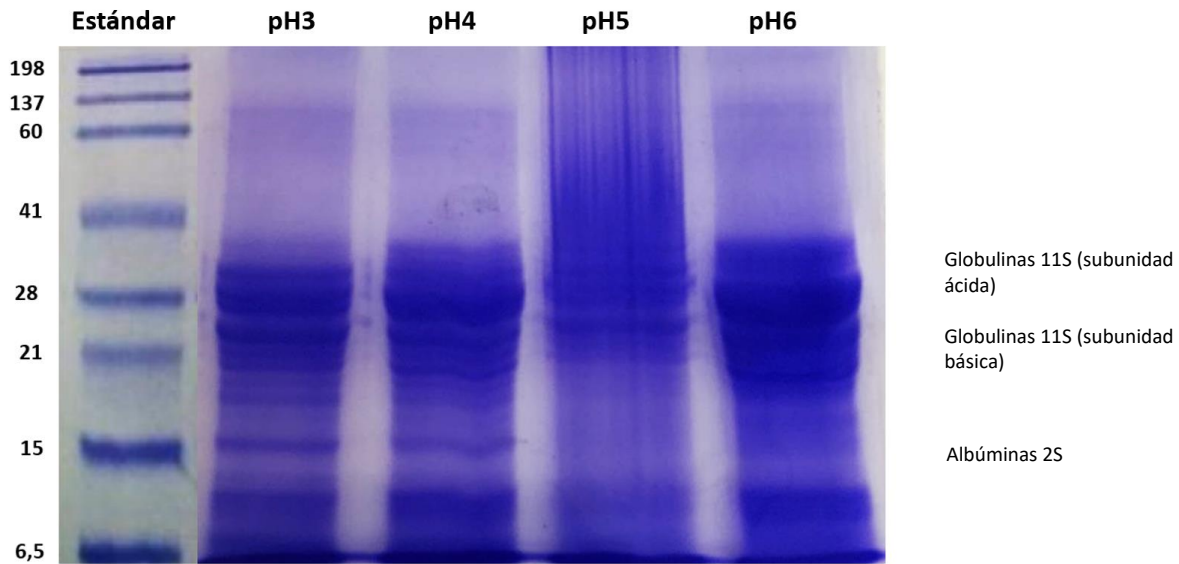


**Figura 2.** Electroforesis SDS-PAGE con 2- $\beta$ -mercaptoetanol de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH se observa globulinas 11S (subunidades ácida y básica) y albúminas 2S.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por **Suca & Suca (2015)**, donde el chocho al ser una planta dicotiledónea presentó dos tipos de proteínas de reserva, las globulinas que representan el 80% del total de proteínas y las albúminas que presentan diferente solubilidad de acuerdo a sus pesos moleculares. También **Espitia et al. (2016) & Raya et al. (2012)** señalan que las plantas dicotiledóneas presentan proteínas de reserva las cuales son albúminas y globulinas. Siendo las globulinas de tipo 11S las principales proteínas de reserva en plantas dicotiledóneas, es decir cumplen con la función de aportar energía para el organismo.

Del mismo modo fueron caracterizados por electroforesis SDS-PAGE los aislados proteicos de harina de chocho bajo condiciones no reductoras (ausencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol). En la Figura 3, se muestra un perfil proteico similar al perfil proteico bajo condiciones reductoras (Figura 2), donde se observa que el 2- $\beta$ -mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH) (**Maldonado & Jorrín, 2006**), por lo que en la Figura 3, las bandas están comprendidas entre 6,5 y 30 kDa, pero no se encuentran definidas, observando menor separación y menor nitidez de los polipéptidos que el gel obtenido a condiciones reductoras.





**Figura 3.** Electroforesis SDS-PAGE con 2- $\beta$ -mercaptoetanol de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH comparados con el estándar de peso molecular (kDa).

Se reportan estudios de **Santos *et al.* (1997)**, donde las semillas de lupino son ricas en globulinas totales en relación con el contenido de albúminas. Además, que las globulinas muestran mayor movilidad electroforética en condiciones reductoras, en comparación al perfil proteico en condiciones no reductoras. Esto lo corroboran **Castillo *et al.*, (1998)**, donde fraccionaron las proteínas de chocho mediante solubilización, obteniendo globulinas (71,8%), albuminas (11,2%), glutelinas (5,5%) y prolaminas (1%).

Para los estudios realizados en esta investigación, la ausencia del agente reductor no logró completar la separación de las proteínas aisladas de chocho ya que no hubo un agente reductor que fraccione los puentes disulfuro de los aminoácidos azufrados, específicamente de tipo  $\gamma$  y  $\delta$  conglutinas, como la metionina y cisteína (**Schoeneberger *et al.*, 1983**).

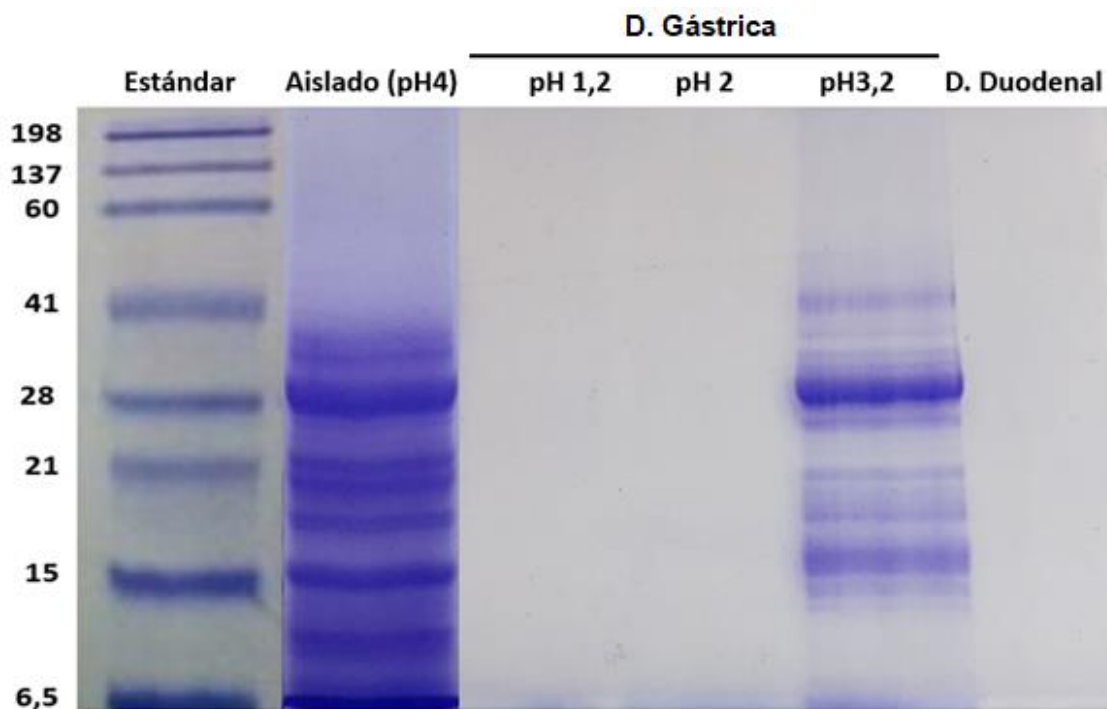
#### **4.1.3 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro***

Las condiciones fisiológicas de digestión de nuestro organismo se puede simular mediante la digestión gastrointestinal *in vitro* ya que gracias a esta simulación se puede evaluar la cantidad de nutrientes que libera un alimento durante el proceso de digestión para ser absorbido por el sistema digestivo (**Duliński *et al.*, 2015**).

Conforme a lo mencionado, la digestibilidad es de vital importancia para el ser humano ya que el organismo requiere de nutrientes que sean asimilables por las células de nuestro organismo, gracias a la acción enzimática que reduce el tamaño de los alimentos. El proceso de digestión inicia en la boca con una mezcla de la saliva con el alimento, luego en el estómago donde ocurre una hidrólisis o una reducción de tamaño de las partículas. Este proceso depende del pH de cada individuo y el estado de salud (**Nguyen *et al.*, 2015**). Después de la fase gástrica pasa al duodeno donde el proceso digestivo es llevado a cabo por la acción de las enzimas pancreáticas y las secreciones biliares, al finalizar la fase duodenal los alimentos se hidrolizan, así las proteínas se reducen a péptidos, los cuales se absorben a través de la capa del moco del epitelio de las paredes del intestino delgado (**Bourlieu *et al.*, 2014**).

Se tomó de referencia el aislado de proteína de chocho que fue precipitado a pH 4 por la claridad de sus bandas polipeptídicas, luego se sometió a digestión gástrica con solución de pepsina (2000 U/mg) a diferentes pH de 1,2; 2; 3,2 (pH de un adulto con enfermedades gástricas, pH de un adulto sano y pH de niños no lactantes, respectivamente). Las variaciones de pH incide en el grado de hidrólisis de proteínas (**Jiménez-Saiz *et al.*, 2011**) y a digestión duodenal con pancreatina (100 U/mg), con la técnica de electroforesis SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras, se identificó el grado de hidrólisis de las proteínas de chocho.

En la Figura 4, se observa el perfil proteico del aislado de chocho precipitado a pH 4 que se tomó como control ya que no se sometió a acción enzimática, los hidrolizados obtenidos mediante la acción enzimática de la pepsina (pH 1,2; 2; 3,2) sometido a digestión gástrica y el hidrolizado con pepsina y pancreatina sometido a digestión duodenal.



**Figura 4.** Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la simulación de digestión gástrica (hidrolizado con pepsina) y duodenal (hidrolizado con pepsina y pancreatina a pH 7) del aislado proteico de chocho precipitado a pH 4 comparados con el estándar (kDa).

El grado de digestibilidad del aislado proteico a pH 4 se observaron bandas polipeptídicas menores a 6,5 kDa en la digestión gástrica a pH 1,2 y 2, por lo tanto, las proteínas fueron susceptibles o degradadas por la acción de la pepsina, pero las albúminas 2S presentaron resistencia proteica a la acción de la pepsina. Por el contrario, en el pH 3,2 de la digestión gástrica se observó una hidrólisis parcial ya que se identificó bandas proteicas de pesos moleculares entre 15 y 28 kDa. Las complejas estructuras formadas por los puentes disulfuro inter e intra moleculares presentes en las proteínas podrían ser las que limitan la acción enzimática evitando la hidrólisis de algunas bandas proteicas (Sen *et al.*, 2002).

En la digestión duodenal ya no se observaron bandas proteicas ya que hubo una hidrólisis total de las proteínas de chocho por la acción enzimática de la pancreatina y las sales biliares. Los resultados obtenidos concuerdan con aquellos reportados por varios autores, donde mencionan que la proteína de chocho está sobre el 80% de digestibilidad (Suca & Suca, 2015; Villacrés, 2001), mientras que la proteína de lupino cruda y procesada presenta valores de digestibilidad entre 80 y 85,8%, respectivamente (Schoeneberger *et al.*, 1982), otro estudio ha reportado un alto

grado de digestibilidad proteica (>90%) en semillas de lupino dulce (Písaříková & Zdeněk, 2009). Generalmente las leguminosas presentan valores de digestibilidad inferiores al 80% como la arveja y algunos tipos de fréjol, mientras el chocho tiene un valor de digestibilidad real del 92%, casi equivalente a la caseína (Schoeneberger *et al.*, 1983).

#### 4.1.4 Evaluación de la Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos

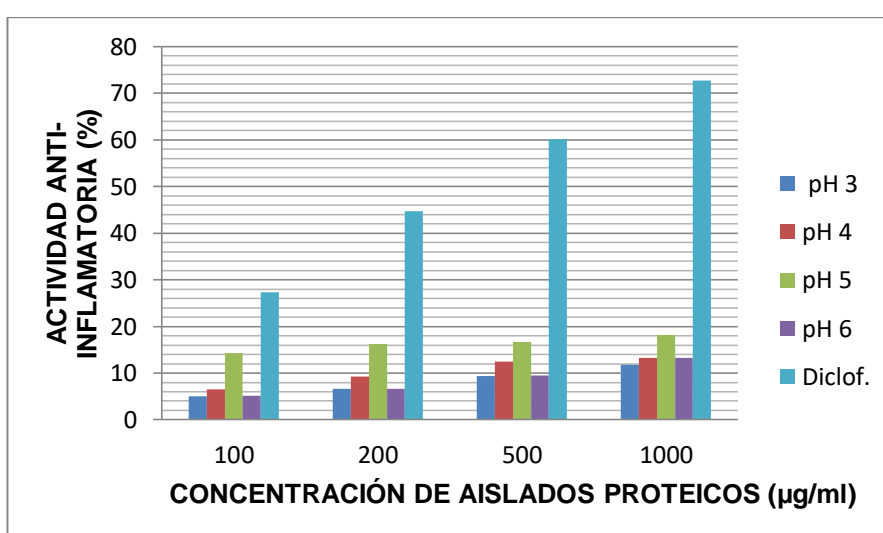
En la Tabla 6, se muestra la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes pH. Las concentraciones con las que se trabajó fueron 100, 200, 500 y 1000 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se empleó el diseño experimental AxB y los tratamientos fueron comparados con un control positivo de Diclofenaco sódico (75 mg/3 ml), un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) utilizado para el tratamiento de reumatismos e inflamaciones no articulares que inhibe la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (Kamble, Palatty, & Kamble, 2012), en este estudio el Diclofenaco sódico se usó como un medicamento de referencia ya que inhibe la desnaturalización de la proteína (albumina de huevo).

**Tabla 6.** Actividad antiinflamatoria de los aislados de proteicos de harina de chocho a diferentes pH de precipitación.

% inhibición	Concentración de aislados proteicos ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	100	200	500	1000
<b>pH 3</b>	5,0 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,33	6,6 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0,26	9,4 <sup>Ca</sup> $\pm$ 0,31	11,7 <sup>Da</sup> $\pm$ 0,73
<b>pH 4</b>	6,6 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,54	9,3 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,24	12,4 <sup>Cb</sup> $\pm$ 0,47	13,3 <sup>Cb</sup> $\pm$ 1,06
<b>pH 5</b>	14,4 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0,25	16,2 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0,37	16,7 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0,08	18,2 <sup>Cc</sup> $\pm$ 0,35
<b>pH 6</b>	5,1 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,36	6,6 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0,60	9,5 <sup>Ca</sup> $\pm$ 0,19	13,2 <sup>Db</sup> $\pm$ 0,27
<b>Diclofenaco (Control positivo)</b>	27,3 <sup>Ad</sup> $\pm$ 0,47	44,7 <sup>Bd</sup> $\pm$ 0,26	60,1 <sup>Cd</sup> $\pm$ 0,17	72,8 <sup>Dd</sup> $\pm$ 0,37

Promedio  $\pm$  incertidumbre expresada como desviación estándar, n=4. Las letras mayúsculas diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los porcentajes de actividad antiinflamatoria de las diferentes concentraciones de los aislados proteicos. Letras minúsculas diferentes indican, para cada concentración de aislados proteicos, diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los porcentajes de actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos a diferentes pH de precipitación, Test de Tukey.

En la Tabla 6, se muestra que la actividad antiinflamatoria obtenida con Diclofenaco sódico (control positivo) es directamente proporcional con la concentración de los aislados proteicos de harina de chocho. También, a medida que aumenta la concentración de los aislados proteicos a diferentes pH aumenta la actividad, sin embargo, no son comparables con el Diclofenaco sódico ya que los aislados proteicos no llegan a los valores de actividad antiinflamatoria del Diclofenaco, tal como se muestra en la Figura 5. Cabe mencionar que a pH 5 se obtuvo una actividad antiinflamatoria de 18,2% a una concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Lo que indicó que a pH 5 existe la mayor actividad antiinflamatoria.



**Figura 5.** Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes pH y a diferentes concentraciones ensayadas, con respecto al Diclofenaco (Control positivo).

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que el pH y la concentración de los aislados y la combinación de ambos factores influyen en la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de harina de chocho, es decir que los dos factores inciden sobre la actividad mencionada. Al aplicar la prueba de Tukey, se determinó que la muestra de mayor actividad fue aquella a pH 5 con concentración de aislado proteico de 1000  $\mu\text{g/ml}$  presentó más actividad.

#### 4.1.5 Evaluación de la Actividad antioxidante de los aislados proteicos

El método que se aplicó fue el ensayo de las Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), esta se basa en detectar de peroxidación lipídica o actividad antioxidante de un alimento que se forma a partir de la degradación de

hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos obteniendo como producto una especie reactiva de malondialdehído (MDA), formando un aducto con el ácido tiobarbitúrico (TBA) de color rosa. El aducto de MDA-TBA es la unión dos moléculas por enlace covalente y se mide espectrofotométricamente a 532-535 nm (Ghani, Barril, Bedgood, & Prenzler, 2017; Lü et al., 2010).

En la Tabla 7, se muestra la actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml vs pH. Se utilizó aceite de oliva oxidado y vitamina C (fármaco antioxidante), una para cuantificar la efectividad que tienen los aislados proteicos para inhibir peroxidación lipídica y otro como control positivo, respectivamente. Se empleó el diseño experimental AxB y los tratamientos fueron comparados con un control positivo de vitamina C.

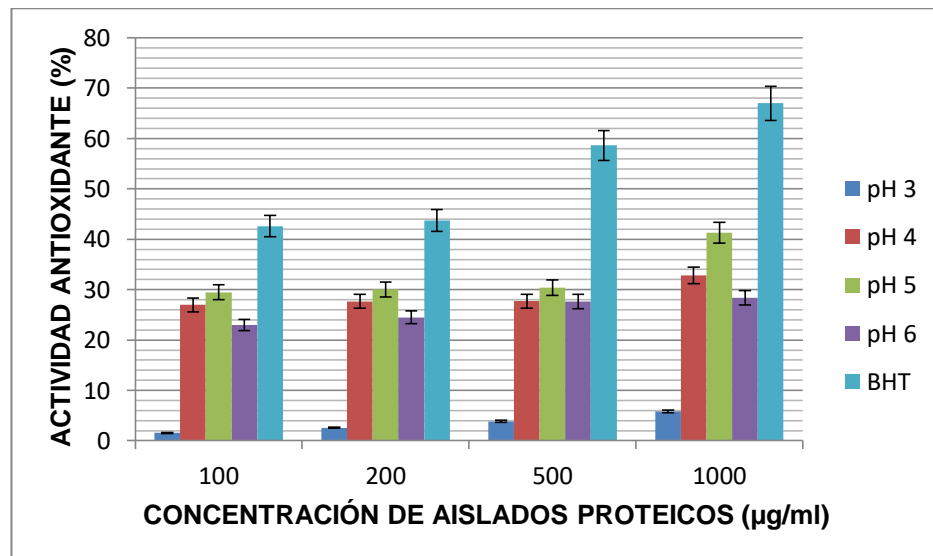
**Tabla 7.** Actividad antioxidante de los aislados de proteicos de harina de chocho a diferentes pH de precipitación.

Actividad antioxidante (%)	Concentración de aislados proteicos (µg/ml)			
	100	200	500	1000
<b>pH 3</b>	1,6 <sup>Aa</sup> ± 0,07	2,6 <sup>Ba</sup> ± 0,26	3,8 <sup>Ca</sup> ± 0,30	5,8 <sup>Da</sup> ± 0,37
<b>pH 4</b>	26,9 <sup>Ac</sup> ± 0,35	27,7 <sup>Abc</sup> ± 0,37	27,7 <sup>Ab</sup> ± 0,84	32,8 <sup>Bc</sup> ± 0,88
<b>pH 5</b>	29,5 <sup>Ac</sup> ± 2,04	30,0 <sup>Ac</sup> ± 2,25	30,4 <sup>Ab</sup> ± 2,77	41,3 <sup>Bd</sup> ± 0,19
<b>pH 6</b>	22,9 <sup>Ab</sup> ± 0,05	24,5 <sup>ABb</sup> ± 2,23	27,6 <sup>BCb</sup> ± 1,44	28,4 <sup>Cb</sup> ± 0,54
<b>Vitamina C (Control positivo)</b>	42,6 <sup>Ad</sup> ± 0,56	43,8 <sup>Ad</sup> ± 0,82	58,6 <sup>Bc</sup> ± 0,26	66,9 <sup>Ce</sup> ± 0,37

Promedio ± incertidumbre expresada como desviación estándar, n=3. Las letras mayúsculas diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas (p<0,05) entre los porcentajes de actividad antioxidante de las diferentes concentraciones de los aislados proteicos. Letras minúsculas diferentes indican, para cada concentración de aislados proteicos, diferencias significativas (p<0,05) entre los porcentajes de actividad antioxidante de los aislados proteicos a diferentes pH de precipitación, Test de Tukey.

En la Figura 6, se identificó que el pH 5 posee mayor actividad antioxidante con las diferentes concentraciones, teniendo una mayor actividad a una concentración de 1000 µg/ml con 41,3%, y al comparar con el fármaco antioxidante, vitamina C, se obtuvo valores similares a una concentración de 100 µg/ml con 42,6%. Por tanto, los

resultados obtenidos de la actividad antioxidante de los aislados proteicos de harina de chocho son una fuente importante que beneficia a personas con enfermedades cardiovasculares y previene el desarrollo del cualquier tipo de cáncer donde los procesos oxidativos son notables (Meena *et al.*,2012).



**Figura 6.** Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de harina de chocho a diferentes pH y a diferentes concentraciones ensayadas, con respecto a la vitamina C (Control positivo).

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se determinó que el pH y la concentración de los aislados, y también la combinación de ambos factores influyen en la actividad antioxidante de los aislados proteicos de chocho. Al aplicar la prueba de Tukey, se determinó que a pH5 con concentración de aislado proteico de 1000 µg/ml presentó más actividad antioxidante con 41,3%, siendo el mejor tratamiento.

La prueba TBARS puede carecer de reproducibilidad aceptable, pero a pesar de estas limitaciones potenciales, existen características que hacen útil como complemento de las pruebas de detección populares, como la capacidad antioxidante equivalente de Trolox. Por lo tanto, puede usarse como un ensayo para determinar la actividad antioxidante de aislados proteicos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- Se aisló proteínas de harina de chocho mediante precipitación isoeléctrica. Se logró un mayor rendimiento a pH 8 de solubilización y posterior precipitación de la misma a pH 5.
- Se determinó el mayor contenido proteico de 96,9% en el aislado a pH 5 y 82,1% en el aislado a pH 6.
- Se caracterizaron los aislados proteicos con estándar molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, identificando bandas polipeptídicas entre 6,5 hasta 30 KDa, siendo las más representativas las globulinas 11S de las subunidades ácidas y básicas (18 a 30 KDa) y albúminas 2S (6,5 a 15 KDa) en el perfil proteico.
- Se observó una digestión gástrica parcial y una digestión duodenal total frente a la acción de enzimas proteolíticas.
- La mejor actividad antiinflamatoria de 18,2% de inhibición de la desnaturalización de proteínas fue obtenida en aislados proteicos de chocho a pH 5 y una concentración de 1000 µg/mL.
- El tratamiento con mayor actividad antioxidante en los aislados proteicos de chocho fue a pH 5 con 41,3% de inhibición de peroxidación lipídica a una concentración de 1000 µg/mL.

#### 5.2 RECOMENDACIONES

- Utilizar métodos que permitan realizar precipitación en soluciones salinas o usando otros solventes como etanol.
- Evaluar el contenido proteico de chocho por diferentes métodos.



- Realizar ensayos con diferentes pH de solubilización, precipitación isoeléctrica entre pH 4 y 5 para determinar el mejor rendimiento proteico en la harina de chocho.
- Aplicar la técnica analítica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE) ya que identifica isoformas de las proteínas a través de su punto isoeléctrico y peso molecular.
- Analizar el perfil de aminoácidos presente en los aislados proteicos mediante el uso de HPLC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, O., & Caiza, J. (2010). Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. *Revista Politécnica*, 29(1), 70–77.
- 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.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (18th Edición). Gaithersburg, MD, USA.
- Apunte, G. P., & León, G. O. (2012). *Utilización de Harina de Chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en la Elaboración de Pan*. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta). México: Pearson Educación.
- Baldeon, M. E., Villacres, E., Narváez, L., & Fomasini, M. (2012). Hypoglycémie effect of cooked lupinus mutabilis and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutrición Hospitalaria*, 27(4), 1261–1266.
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A., & Dupont, D. (2014). Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing Relevant In Vitro Models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 1427–1457.
- Caicedo, C., & Peralta, E. (2001). *El Cultivo de Chocho (Lupinus mutabilis Sweet): Fitonutrición, enfermedades y plagas, en el Ecuador*.
- Caicedo, C., Peralta, E., Villacrés, E., & Rivera, M. (2001). *Poscosecha y Mercado de Chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador*.
- Castillo, P., Orbea, M., Guerrero, M., Acuña, O., & Chérrez, M. (1998). Lupin protein fractionation by solubility and determination of molecular weights (*Lupinus mutabilis* sweet). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 239–250.
- Chikkanna, D., Ramadas, D., Kashyap, H., Mundasada, S., & Kumar, S. (2016). In vitro anti-inflammatory activity of proteins isolated from pippali (*Piper longum*). *RJLBPCS*, 2(1), 33–39.
- Dawidowicz, A., & Olszowy, M. (2011). Antioxidant properties of BHT estimated

- by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *European Food Research and Technology*, 232, 837–842.
- De la Torre, M. B. (2013, April 11). Los chochos son ricos y saludables. *El Comercio*.
- Dubin, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec-Niemczyk, J., Wladyka, B., ... Chmiel, D. (2005). New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochim.Pol.*, 52(3), 633–638.
- Duliński, R., Cielecka, E., Pierzchalska, M., & Żyła, K. (2015). Phytases Improve Myo- Inositol Bioaccessibility in Rye Bread: A Study Using an In Vitro Method of Digestion and a Caco-2 Cell Culture Model. *Food Technology and Biotechnology*, 53(1), 66–72.
- Espitia, F., Negrete, A., Ordoñez, L., & León, M. (2016). Caracterización de las proteínas de reserva de la semilla de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 147–152.
- Farinango, A. R., & Quizhpi, J. D. (2015). *Preparación de un suplemento proteico elaborado a partir de Lupinus mutabilis “chocho” y su valorización bromatológica*. Universidad de Cuenca.
- Génard, T., Etienne, P., Laîné, P., & Yvin, J.-C. (2016). Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition. *Heliyon*, 2(9), 1–15.
- Ghani, A., Barril, C., Bedgood, D., & Prenzler, P. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, 195–207.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751–766.
- Guzmán-Chozas, M., Vicario, I. M., & Guillén-Sans, R. (1997). Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2452–2457.
- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2011).

- Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127, 1719–1726.
- Kamble, P., Palatty, P., & Kamble, S. (2012). Comparative study of anti-inflammatory effects of rosiglitazone and pioglitazone with diclofenac sodium in carageenan induced rat hind paw oedema. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 1–7.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, 680–685.
- Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Trojanowska, K., Nogala-Kalucka, M., Malecka, M., & Pacholek, B. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. *Nahrung - Food*, 47(5), 286–290.
- Leelaprakash, G., & Dass, S. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicotemma axillare*. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(3), 189–196.
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Milla, F. (2002). Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76, 349–356.
- Lü, J., Lin, P., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840–860.
- Ma, Y., Liu, J., Shi, H., & Yu, L. (2016). Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science*, 99, 6902–6912.
- Maldonado, A. M., & Jorrín, J. (2006). *Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba.*
- Maroon, J., Bost, J., & Maroon, A. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*, 1, 80.
- Martínez, E. N., & Anón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523–2530.
- Materska, M., Perucka, I., Stochmal, A., Piacente, S., & Oleszek, W. (2003). Quantitative and Qualitative Determination of Flavonoids and Phenolic Acid

- Derivatives From Pericarp of Hot Pepper Fruit Cv. Bronowicka Ostra. *Polish Journal Of Food and Nutritional Sciences*, 12(53), 72–76.
- Meena, H., Pandey, H., Pandey, P., Arya, M., & Ahmed, Z. (2012). Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Baccopa monnieri* and *Centella asiatica*. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1), 114–118.
- Miano, A. C., García, J. A., & Augusto, P. E. D. (2015). Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) grains. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 290–298.
- Millán-Linares, M. D. C., Yust, M. D. M., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., & Pedroche, J. (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chemistry*, 151, 141–147.
- Nguyen, T., Bhandari, B., Cichero, J., & Prakash, S. (2015). A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula. *Food Research International*, 76, 373–386.
- Ojeda, L. C., & Salazar, J. A. (2011). *Efecto de la suplementación con harina de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en el comportamiento productivo de cuyes (Cavia porcellus) en la fase de levante y engorde*. Universidad de Nariño.
- Oliva Torres, C. E. (2015). *Caracterización del potencial biológico de Bacillus spp. y sus metabolitos para el control del Colletotrichum acutatum causante de la antracnosis del chocho andino (Lupinus mutabilis) en la provincias de Chimborazo y Cotopaxi*. Universidad de la Américas.
- Ortega-David, E., Rodríguez, A., David, A., & Zamora-Burbano, Á. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado s en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 111–118.
- Pablo-Pérez, M., Lagunes-Espinoza, L., López-Upton, J., Aranda-Ibáñez, E., & Ramos-Juárez, J. (2015). Composición química de especies silvestres del género *Lupinus* del Estado de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(1), 49–55.
- Padilla, F., Guédez, T., Alfaro, M., Regnault, M., & Rincón, A. (2010). Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.). *Revista Del Instituto Nacional de*

*Higiene*, 41(1), 38–42.

Peralta, E. (2016). *El chocho en Ecuador. El “Estado del Arte.”* Quito.

Peralta, E., Mazón, N., Murillo, Á., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., & Monar, C. (2012). *Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco.* (Tercera). *Miscelánea*. Quito.

Pérez, K., Peñafiel, C., & Delgado, V. (2017). Bocado con alto contenido proteico : un extruido a partir de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y camote (*Ipomoea batatas* L.). *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 377–388.

Písaříková, B., & Zdeněk, Z. (2009). Nutritional Value of Lupine in the Diets for Pigs (a Review). *Acta Veterinaria Brno*, 78, 399–409.

Raya, J., Aguirre, C., Tapia, R., Ramírez, J., & Covarrubias, J. (2012). Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotánica*, (32), 223–235.

Rodríguez, D., & Schöbitz, R. (2009). Película antimicrobiana a base de proteína de suero lácteo, incorporada con Bacterias lácticas como controlador de *Listeria monocytogenes*, aplicada sobre salmón ahumado. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(2), 49–54.

Santos, C., Ricardo, F., & Teixeira, A. (1997). Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3821–3825.

Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H. D., & Elmadfa, I. (1982). Composition and Protein Quality of *Lupinus Mutabilis*. *The Journal of Nutrition*, 112, 70–76.

Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H., & Elmadfa, I. (1983). The protein quality of lupins (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32, 133–143.

Sen, M., Kopper, R., Abraham, E., Burks, A., & Bannon, G. (2002). Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *Journal of Immunology*, 169(2), 882–887.

Suca, G. R., & Suca, C. A. (2015). Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como fuente proteínica y avances de su desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18(2), 55–71.

Villacrés, E. (2001). *Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a*

- partir del chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Escuela Politécnica Nacional.
- Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L., & Segovia, G. (2006). Usos Alternativos del Chocho. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria, INIAP*, 1–19.
- Villacreses, N. R. (2011). *Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica*. Universidad San Francisco de Quito.
- Vinueza, M. G. (2010). *Diseño de un suplemento nutricional a base de chocho para niños de edad escolar en la ciudad de Quito*. Universidad de las Américas.

# **ANEXOS**



**ANEXO A**

**VALORES OBTENIDOS EN LA PARTE  
EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO DE  
LOS AISLADOS PROTEICOS DE CHOCHO**

**Tabla 8.** Pesos y rendimientos de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH a partir de 5 g de muestra de harina de chocho variedad 450 Andino.

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	5,06	5,00	5,04
	w FINAL (g)	0,97	0,93	0,90
	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>19,09</b>	<b>18,65</b>	<b>17,86</b>
pH 4	w INICIAL (g)	5,02	5,00	5,01
	w FINAL (g)	1,40	1,47	1,43
	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>27,93</b>	<b>29,32</b>	<b>28,65</b>
pH 5	w INICIAL (g)	5,01	5,01	5,02
	w FINAL (g)	1,57	1,59	1,56
	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>31,42</b>	<b>31,68</b>	<b>31,04</b>
pH 6	w INICIAL (g)	5,01	5,01	5,01
	w FINAL (g)	1,27	1,24	1,20
	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>25,33</b>	<b>24,68</b>	<b>24,02</b>

**Tabla 9.** Análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	279,705	3	93,235	265,445	,000
Dentro de grupos	2,810	8	,351		
Total	282,515	11			

**Tabla 10.** Prueba de comparación, Test Tukey, del rendimiento del aislado proteicos precipitado a diferentes pH.

HSD Tukey<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
3.00	3	18,53			
6.00	3		24,67		
4.00	3			28,63	
5.00	3				31,38
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

**ANEXO B**

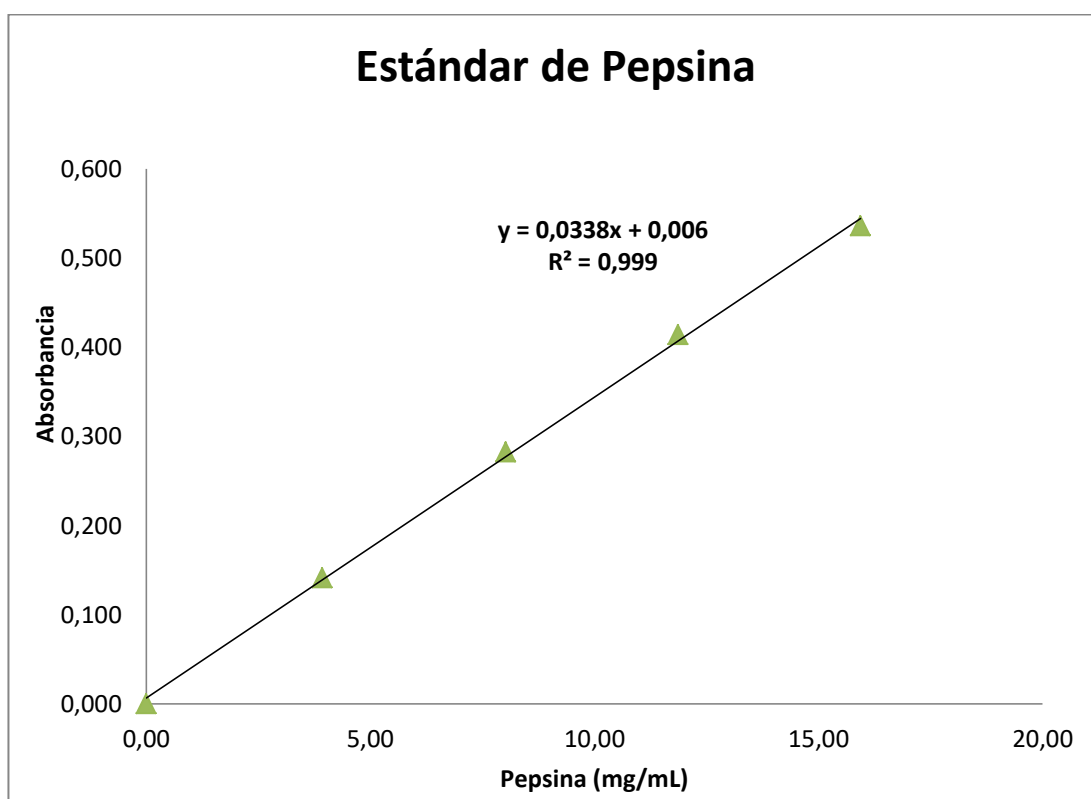
**VALORES OBTENIDOS EN LA PARTE  
EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACION  
PROTEICA DE LOS AISLADO DE  
PROTEÍNA DE CHOCHO**

## ANEXO B-I

### MÉTODO BIURET

**Tabla 11.** Datos de la curva estándar de pepsina para la cuantificación de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH.

Conc-Std Pepsina (mg/mL)	Absorbancia
0,00	0,000
3,59	0,110
7,72	0,243
11,84	0,372
15,63	0,494
19,46	0,570



**Figura 7.** Curva estándar de Pepsina para la determinación de concentración de proteína mediante el Método Biuret.

**Tabla 12.** Valores de absorbancia de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 540 nm.

	pH3	pH4	pH5	pH6
<b>R1</b>	0,220	0,264	0,275	0,27
<b>R2</b>	0,224	0,269	0,270	0,30
<b>R3</b>	0,221	0,249	0,276	0,26
<b>R4</b>	0,216	0,266	0,271	0,286

**Tabla 13.** Cálculo del contenido proteico (%) de la proteína aislada de chocho precipitada a diferentes pH, método Biuret.

	pH3	pH4	pH5	pH6
<b>R1</b>	75,89	95,81	96,39	96,02
<b>R2</b>	76,23	90,40	96,74	92,48
<b>R3</b>	78,95	97,51	97,19	99,21
<b>R4</b>	76,15	96,43	97,55	94,61
Promedio	76,81	95,04	96,97	95,58
Desv. estándar	1,44	3,17	0,51	2,82

**Tabla 14.** Análisis de varianza (ANOVA) de la cuantificación proteica de los aislados de proteína de chocho precipitados a diferentes pH, método Biuret.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1097,395	3	365,798	71,903	,000
Dentro de grupos	61,049	12	5,087		
Total	1158,444	15			

**Tabla 15.** Prueba de comparación, Test Tukey, de la cuantificación proteica del aislado de proteína precipitado a diferentes pH, método Biuret.

HSD Tukey

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3	4	76,81	
4	4		95,04
6	4		95,58
5	4		96,97
Sig.		1,000	,632

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

## ANEXO B-II

### MÉTODO KJELDAHL

**Tabla 16.** Valores obtenidos de nitrógeno total (%) en los aislados proteicos de chocho precipitado a diferentes pH.

	pH3	pH4	pH5	pH6
<b>R1</b>	9,55	12,12	12,06	13,27
<b>R2</b>	9,43	12,46	12,14	13,12
<b>R3</b>	10,03	12,24	12,15	13,03

**Tabla 17.** Contenido de proteína (%) de los aislados proteicos de chocho precipitado a diferentes pH, método Kjeldahl.

	pH3	pH4	pH5	pH6
<b>R1</b>	54,44	69,08	68,74	75,64
<b>R2</b>	53,75	71,02	69,20	74,78
<b>R3</b>	57,17	69,77	69,26	74,27
<b>Promedio</b>	55,12	69,96	69,07	74,90
<b>Desv. estándar</b>	1,81	0,98	0,28	0,69

**Tabla 18.** Análisis de varianza (ANOVA) de la cuantificación proteica de los aislados de proteína de chocho precipitados a diferentes pH, método Kjeldahl.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	648,703	3	216,234	180,259	,000
Dentro de grupos	9,597	8	1,200		
Total	658,300	11			

**Tabla 19.** Prueba de comparación, Test Tukey, de la cuantificación proteica del aislado de proteína precipitado a diferentes pH, método Kjeldahl.

HSD Tukey<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3	3	55,1200		
5	3		69,0667	
4	3		69,9567	
6	3			74,8967
Sig.		1,000	,756	1,000

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

**ANEXO C**

**VALORES OBTENIDOS EN LA PARTE  
EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD  
ANTIINFLAMATORIA DE LOS AISLADO  
DE PROTEÍNA DE CHOCHO**

**Tabla 20.** Valores de absorbancia de distintas concentraciones de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 660 nm, sometidas a reacción con la albúmina de huevo.

		Concentración del aislado proteico				Blanco: Albúmina de huevo desnaturalizada
		100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	
pH 3	R1	1,502	1,477	1,431	1,393	1,587
	R2	1,504	1,483	1,438	1,395	
	R3	1,508	1,483	1,439	1,398	
	R4	1,514	1,487	1,443	1,418	
pH 4	R1	1,938	1,889	1,825	1,778	2,089
	R2	1,948	1,895	1,838	1,82	
	R3	1,960	1,897	1,839	1,823	
	R4	1,962	1,901	1,848	1,824	
pH 5	R1	1,57	1,531	1,53	1,497	1,838
	R2	1,571	1,538	1,53	1,501	
	R3	1,576	1,542	1,532	1,503	
	R4	1,58	1,547	1,533	1,512	
pH 6	R1	1,913	1,871	1,827	1,751	2,023
	R2	1,919	1,891	1,83	1,752	
	R3	1,926	1,896	1,832	1,757	
	R4	1,929	1,897	1,836	1,763	
Diclofenaco	R1	1,204	0,916	0,661	0,446	1,668
	R2	1,211	0,923	0,666	0,453	
	R3	1,214	0,924	0,667	0,459	
	R4	1,223	0,926	0,667	0,459	



**Tabla 21.** Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA (%)	FACTOR A: pH precipitación	FACTOR B: Concentración proteína (µg/mL)	Tratamientos	R1	R2	R3	R4	Promedio	Desviación estándar
	3	100	a0b0	5,36	5,23	4,98	4,6	5,04	0,33
		200	a0b1	6,93	6,55	6,55	6,30	6,58	0,26
		500	a0b2	9,83	9,39	9,33	9,07	9,40	0,31
		1000	a0b3	12,22	12,10	11,91	10,65	11,72	0,73
	4	100	a1b0	7,23	6,75	6,18	6,08	6,56	0,54
		200	a1b1	9,57	9,29	9,19	9,00	9,26	0,24
		500	a1b2	13,05	12,41	12,36	11,91	12,43	0,47
		1000	a1b3	14,89	12,88	12,73	12,69	13,3	1,06
	5	100	a2b0	14,58	14,53	14,25	14,04	14,35	0,25
200		a2b1	16,70	16,32	16,10	15,83	16,24	0,37	
500		a2b2	16,76	16,76	16,65	16,59	16,69	0,08	
1000		a2b3	18,55	18,34	18,23	17,74	18,21	0,35	
6	100	a3b0	5,44	5,14	4,79	4,65	5,12	0,36	
	200	a3b1	7,51	6,52	6,28	6,23	6,64	0,60	
	500	a3b2	9,69	9,54	9,44	9,24	9,48	0,19	
	1000	a3b3	13,45	13,40	13,15	12,85	13,21	0,27	

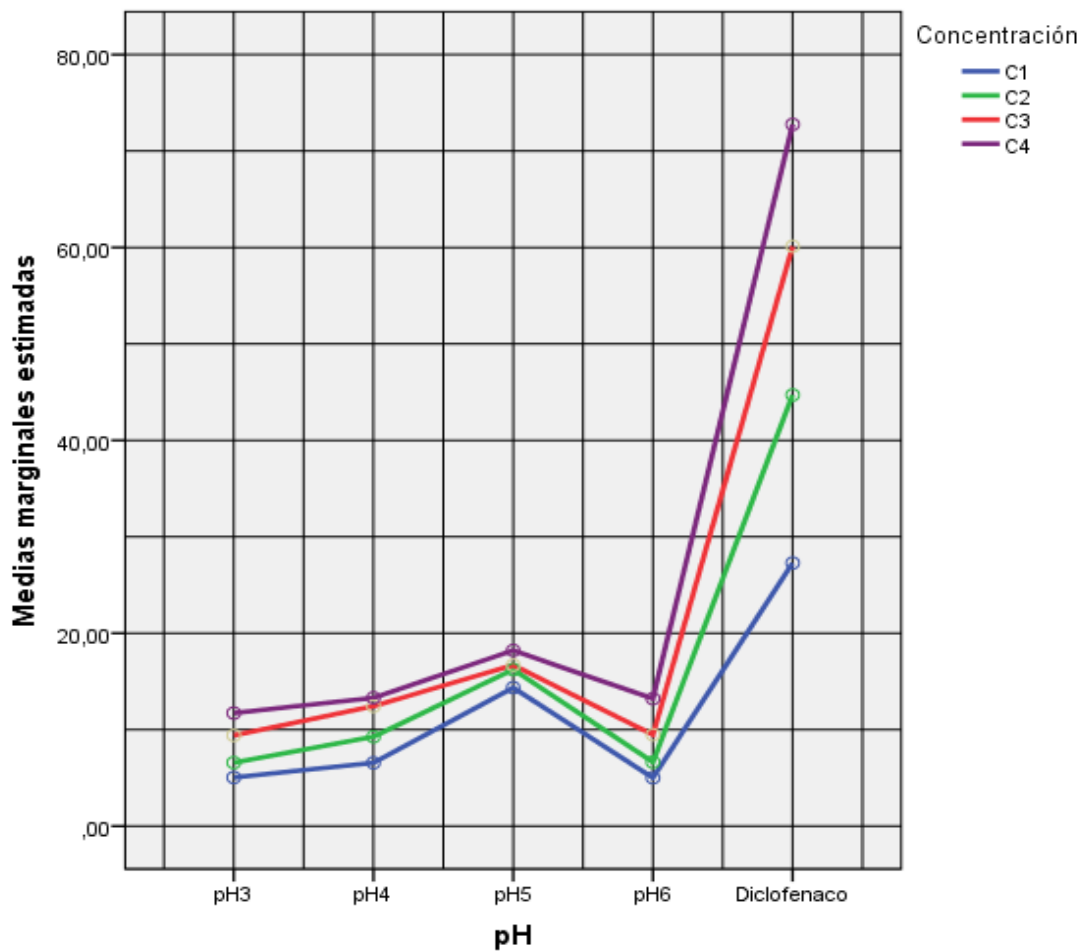
**Tabla 22.** Actividad antiinflamatoria (%) del Diclofenaco sódico a diferentes concentraciones.

Concentración proteína (µg/mL)	R1	R2	R3	R4	Promedio	Desviación estándar
100	27,82	27,4	27,22	26,68	27,28	0,47
200	45,08	44,66	44,6	44,48	44,71	0,26
500	60,37	60,07	60,01	60,01	60,12	0,17
1000	73,26	72,84	72,48	72,48	72,77	0,37

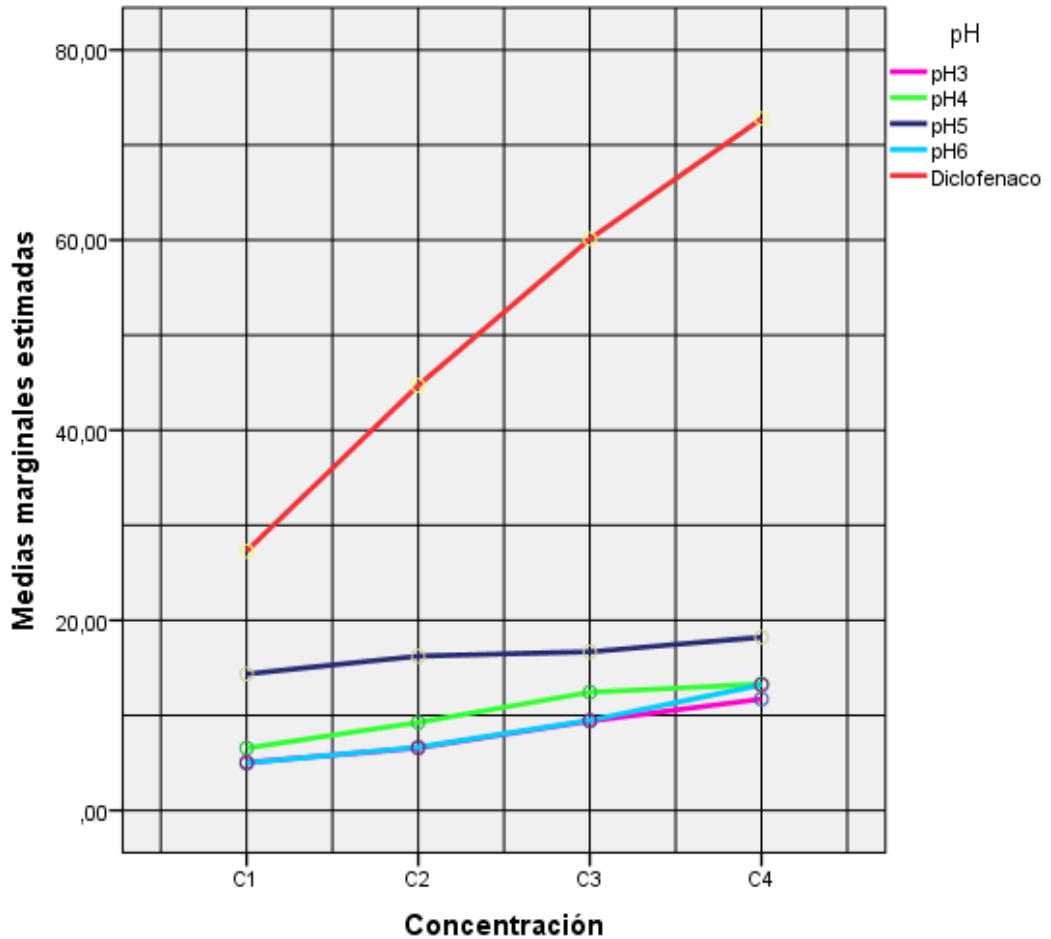
**Tabla 23.** Análisis de varianza (ANOVA), Diseño experimental AxB, entre el pH y concentración de los aislados proteicos de la actividad antiinflamatoria.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	26551,188 <sup>a</sup>	19	1397,431	7207,029	,000
Interceptación	28726,684	1	28726,684	148153,331	,000
pH	21509,973	4	5377,493	27733,572	,000
Concentración	2262,179	3	754,060	3888,943	,000
pH * Concentración	2779,036	12	231,586	1194,370	,000
Error	11,634	60	,194		
Total	55289,506	80			
Total corregido	26562,822	79			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = ,999)



**Figura 8.** Medias marginales estimadas de la Actividad antiinflamatoria (%) con respecto al pH de los aislados proteicos de chocho y del Diclofenaco sódico.



**Figura 9.** Medias marginales estimadas de la Actividad antiinflamatoria (%) con respecto a la concentración de los aislados proteicos de chocho y del Diclofenaco sódico.

**Tabla 24.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 100  $\mu\text{g/mL}$  de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH6	4	5,0050			
pH3	4	5,0425			
pH4	4		6,5600		
pH5	4			14,3500	
Diclofenaco	4				27,2800
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,162.

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

b. Alfa = 0,05.

**Tabla 25.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 200  $\mu\text{g/mL}$  de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH3	4	6,5825			
pH6	4	6,6350			
pH4	4		9,2625		
pH5	4			16,2375	
Diclofenaco	4				44,7050
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,137.

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

b. Alfa = 0,05.

**Tabla 26.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 500  $\mu\text{g/mL}$  de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH3	4	9,4050			
pH6	4	9,4775			
pH4	4		12,4325		
pH5	4			16,6900	
Diclofenaco	4				60,1150
Sig.		,996	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,078.

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

b. Alfa = 0,05.

**Tabla 27.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH3	4	11,7200			
pH6	4		13,2125		
pH4	4		13,2975		
pH5	4			18,2150	
Diclofenaco	4				72,7650
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,398.

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

b. Alfa = 0,05.

**Tabla 28.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 3 de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
C1	4	5,0425			
C2	4		6,5825		
C3	4			9,4050	
C4	4				11,7200
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,201.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 29.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 4 de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
C1	4	6,5600		
C2	4		9,2625	
C3	4			12,4325
C4	4			13,2975
Sig.		1,000	1,000	,287

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,424.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 30.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 5 de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
C1	4	14,3500		
C2	4		16,2375	
C3	4		16,6900	
C4	4			18,2150
Sig.		1,000	,165	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,081.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 31.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 6 de la actividad antiinflamatoria.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
C1	4	5,0050			
C2	4		6,6350		
C3	4			9,4775	
C4	4				13,2125
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,149.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 32.** Comparación entre las concentraciones de Diclofenaco sódico (control positivo).

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
C1	4	27,2800			
C2	4		44,7050		
C3	4			60,1150	
C4	4				72,7650
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,115.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 33.** Análisis de varianza (ANOVA) entre los tratamientos de la actividad antiinflamaatoria: pH y concentración de aislado proteico.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZÓN DE LA VARIANZA	F Tabla
Tratamientos	1092,82	15	72,8545	928,8738	1,89
Réplicas	6,73	3	2,2428	28,5946	2,81
Error	3,53	45	0,0784		
Total	1103,08	63			

**Tabla 34.** Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antiinflamatoria).

		a0b0	a3b0	a1b0	a0b1	a3b1	a1b1	a0b2	a3b2	a0b3	a1b2	a3b3	a1b3	a2b0	a2b1	a2b2	a2b3	TUKEY
		5,04	5,12	6,56	6,58	6,64	9,26	9,4	9,48	11,72	12,43	13,21	13,3	14,35	16,24	16,69	18,21	
a0b0	5,04	0,00	0,08	1,52	1,54	1,60	4,22	4,36	4,44	6,68	7,39	8,17	8,26	9,31	11,20	11,65	13,17	0,7224
a3b0	5,12		0,00	1,44	1,46	1,52	4,14	4,28	4,36	6,60	7,31	8,09	8,18	9,23	11,12	11,57	13,09	
a1b0	6,56			0,00	0,02	0,08	2,70	2,84	2,92	5,16	5,87	6,65	6,74	7,79	9,68	10,13	11,65	
a0b1	6,58				0,00	0,06	2,68	2,82	2,90	5,14	5,85	6,63	6,72	7,77	9,66	10,11	11,63	
a3b1	6,64					0,00	2,62	2,76	2,84	5,08	5,79	6,57	6,66	7,71	9,60	10,05	11,57	
a1b1	9,26						0,00	0,14	0,22	2,46	3,17	3,95	4,04	5,09	6,98	7,43	8,95	
a0b2	9,4							0,00	0,08	2,32	3,03	3,81	3,90	4,95	6,84	7,29	8,81	
a3b2	9,48								0,00	2,24	2,95	3,73	3,82	4,87	6,76	7,21	8,73	
a0b3	11,72									0,00	0,71	1,49	1,58	2,63	4,52	4,97	6,49	
a1b2	12,43										0,00	0,78	0,87	1,92	3,81	4,26	5,78	
a3b3	13,21											0,00	0,09	1,14	3,03	3,48	5,00	
a1b3	13,3												0,00	1,05	2,94	3,39	4,91	
a2b0	14,35													0,00	1,89	2,34	3,86	
a2b1	16,24														0,00	0,45	1,97	
a2b2	16,69															0,00	1,52	
a2b3	18,21																0,00	



**ANEXO D**

**VALORES OBTENIDOS EN LA PARTE  
EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO  
DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
LOS AISLADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO**

**Tabla 35.** Valores de absorbancia de distintas concentraciones de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH medidos a 532 nm, sometidos a la reacción con aceite oxidado y ácido tiobarbitúrico.

		Concentración del aislado proteico				Blanco: Aceite oxidado
		100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL	
pH 3	R1	2,118	2,103	2,075	2,020	2,153
	R2	2,120	2,098	2,073	2,028	
	R3	2,121	2,092	2,063	2,036	
pH 4	R1	1,573	1,549	1,538	1,428	2,153
	R2	1,565	1,557	1,556	1,447	
	R3	1,580	1,565	1,574	1,466	
pH 5	R1	1,474	1,458	1,431	1,260	2,153
	R2	1,518	1,507	1,519	1,264	
	R3	1,562	1,555	1,545	1,268	
pH 6	R1	1,657	1,570	1,527	1,529	2,153
	R2	1,658	1,651	1,558	1,546	
	R3	1,659	1,655	1,589	1,551	
Vitamina C	R1	1,248	1,218	0,885	0,719	2,153
	R2	1,224	1,224	0,891	0,711	
	R3	1,236	1,191	0,896	0,703	

**Tabla 36.** Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de chocho precipitados a diferentes pH.

ACTIVIDAD ANTIIOXIDANTE (%)	FACTOR A: pH precipitación	FACTOR B: Concentración proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tratamientos	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
	3	100	a0b0	1,63	1,53	1,49	1,55	0,07
		200	a0b1	2,32	2,55	2,83	2,57	0,26
		500	a0b2	3,62	3,72	4,18	3,84	0,30
		1000	a0b3	6,18	5,81	5,43	5,81	0,37
	4	100	a1b0	26,96	27,31	26,61	26,96	0,35
		200	a1b1	28,05	27,68	27,31	27,68	0,37
		500	a1b2	28,56	27,73	26,89	27,73	0,84
		1000	a1b3	33,67	32,79	31,91	32,79	0,88
	5	100	a2b0	31,54	29,49	27,45	29,49	2,04
200		a2b1	32,28	30,03	27,78	30,03	2,25	
500		a2b2	33,53	29,45	28,24	30,41	2,77	
1000		a2b3	41,48	41,29	41,11	41,29	0,19	
6	100	a3b0	23,04	22,99	22,94	22,99	0,05	
	200	a3b1	27,08	23,32	23,13	24,51	2,23	
	500	a3b2	29,08	27,64	26,2	27,64	1,44	
	1000	a3b3	28,98	28,19	27,96	28,38	0,54	

**Tabla 37.** Actividad antioxidante (%) del vitamina C a diferentes concentraciones.

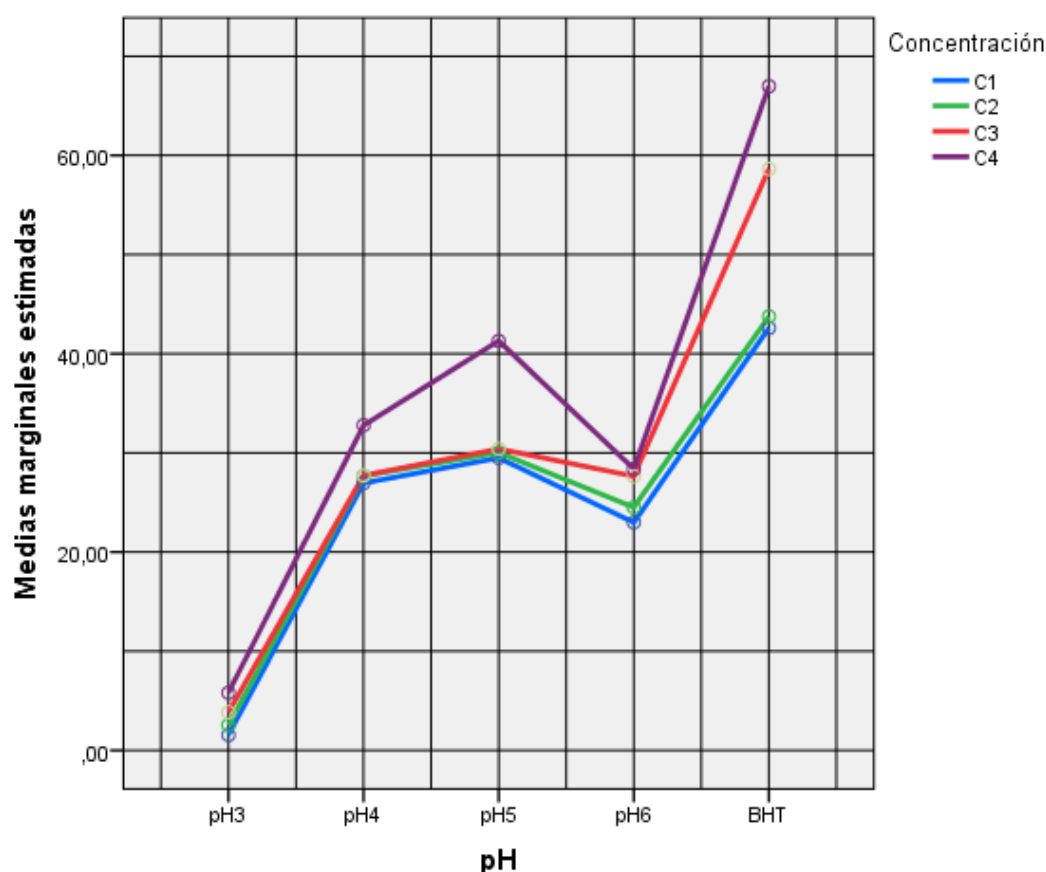
Concentración proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
100	42,03	43,15	42,59	42,59	0,56
200	43,43	43,15	44,68	43,75	0,82
500	58,89	58,62	58,38	58,63	0,26
1000	66,6	66,98	67,35	66,98	0,37

**Tabla 38.** Análisis de varianza (ANOVA), Diseño experimental AxB, entre el pH y concentración de los aislados proteicos de la actividad antioxidante.

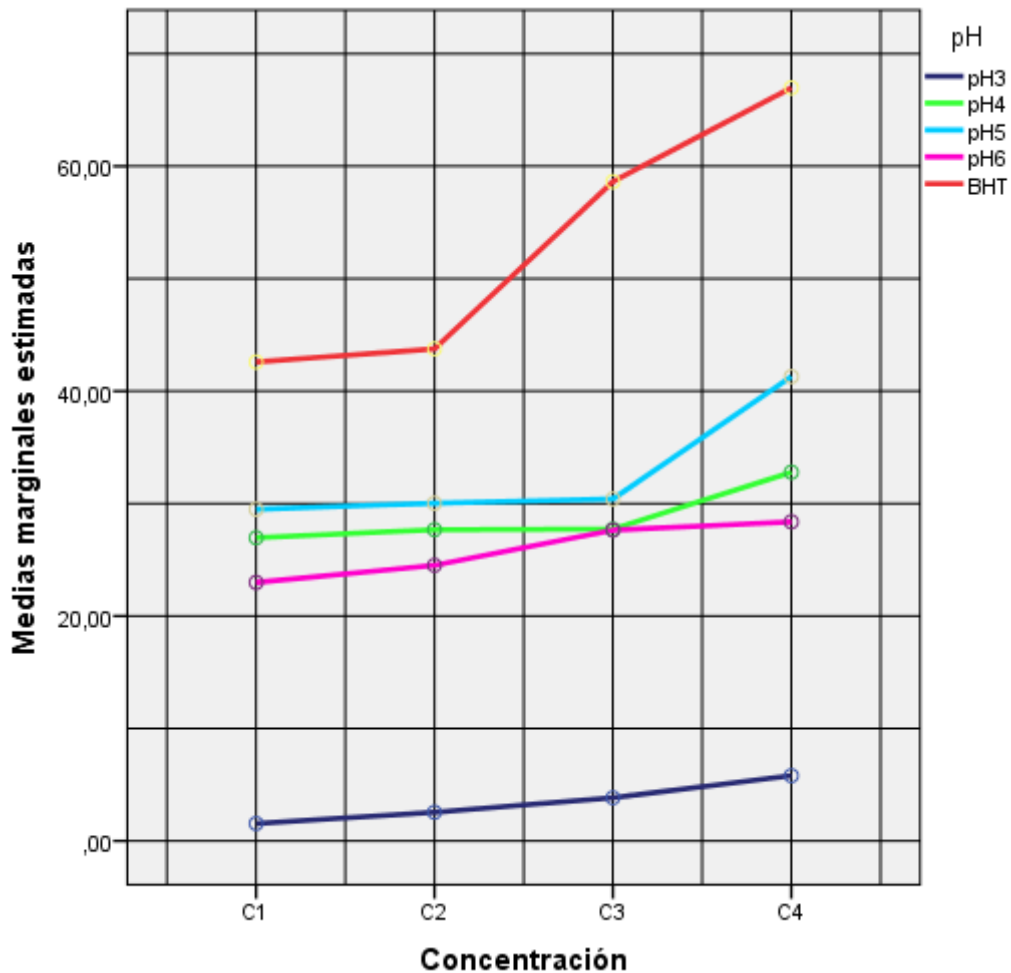
Variable dependiente: Actividad antioxidante (%)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	16741,261 <sup>a</sup>	19	881,119	640,763	,000
Interceptación	49696,153	1	49696,153	36139,809	,000
pH	15034,918	4	3758,730	2733,406	,000
Concentración	990,287	3	330,096	240,051	,000
pH * Concentración	716,056	12	59,671	43,394	,000
Error	55,004	40	1,375		
Total	66492,418	60			
Total corregido	16796,265	59			

a. R al cuadrado = ,997 (R al cuadrado ajustada = ,995)



**Figura 10.** Medias marginales estimadas de la Actividad antioxidante (%) con respecto al pH de los aislados proteicos de chocho y del Vitamina C.



**Figura 11.** Medias marginales estimadas de la Actividad antioxidante (%) con respecto a la concentración de los aislados proteicos de chocho y del Vitamina C.

**Tabla 39.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 100 µg/mL de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH3	3	1,5500			
pH6	3		22,9900		
pH4	3			26,9600	
pH5	3			29,4933	
Vitamina C	3				42,5900
Sig.		1,000	1,000	,055	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,925.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 40.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 200 µg/mL de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
pH3	3	2,5667			
pH6	3		24,5100		
pH4	3		27,6800	27,6800	
pH5	3			30,0300	
Vitamina C	3				43,7533
Sig.		1,000	,137	,353	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,178.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 41.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 500 µg/mL de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto		
		1	2	3
pH3	3	3,8400		
pH6	3		27,6400	
pH4	3		27,7267	
pH5	3		30,4067	
Vitamina C	3			58,6300
Sig.		1,000	,214	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,122.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 42.** Comparación entre pH a una concentración de aislado proteico de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
pH3	3	5,8067				
pH6	3		28,3767			
pH4	3			32,7900		
pH5	3				41,2933	
Vitamina C	3					66,9767
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,275.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 43.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 3 de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
C1	3	1,5500			
C2	3		2,5667		
C3	3			3,8400	
C4	3				5,8067
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,075.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 44.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 4 de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto	
		1	2
C1	3	26,9600	
C2	3	27,6800	
C3	3	27,7267	
C4	3		32,7900
Sig.		,518	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,433.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 45.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 5 de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto	
		1	2
C1	3	29,4933	
C2	3	30,0300	
C3	3	30,4067	
C4	3		41,2933
Sig.		,946	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,240.

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

b. Alfa = ,05.



**Tabla 46.** Comparación entre las concentraciones de aislados proteico precipitado a pH 6 de la actividad antioxidante.

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
C1	3	22,9900		
C2	3	24,5100	24,5100	
C3	3		27,6400	27,6400
C4	3			28,3767
Sig.		,546	,084	,907

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1,831.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 47.** Comparación entre las concentraciones de vitamina C (control positivo).

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
C1	3	42,5900		
C2	3	43,7533		
C3	3		58,6300	
C4	3			66,9767
Sig.		,114	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,296.

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

b. Alfa = ,05.

**Tabla 48.** Análisis de varianza (ANOVA) entre los tratamientos de la actividad antioxidante: pH y concentración de aislado proteico.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	RAZÓN DE LA VARIANZA	F Tabla
Tratamientos	6686,22	15	445,7479	442,8822	2,01
Réplicas	22,44	2	11,2205	11,1483	3,32
Error	30,19	30	1,0065		
Total	6738,85	47			

**Tabla 49.** Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antioxidante).

		a0b0	a0b1	a0b2	a0b3	a3b0	a3b1	a1b0	a3b2	a1b1	a1b2	a3b3	a2b0	a2b1	a2b2	a1b3	a2b3	TUKEY
		1,55	2,57	3,84	5,81	22,99	24,51	26,96	27,64	27,68	27,73	28,38	29,49	30,03	30,41	32,79	41,29	
a0b0	1,55	0,00	1,02	2,29	4,26	21,44	22,96	25,41	26,09	26,13	26,18	26,83	27,94	28,48	28,86	31,24	39,74	3,06
a0b1	2,57		0,00	1,27	3,24	20,42	21,94	24,39	25,07	25,11	25,16	25,81	26,92	27,46	27,84	30,22	38,72	
a0b2	3,84			0,00	1,97	19,15	20,67	23,12	23,80	23,84	23,89	24,54	25,65	26,19	26,57	28,95	37,45	
a0b3	5,81				0,00	17,18	18,70	21,15	21,83	21,87	21,92	22,57	23,68	24,22	24,60	26,98	35,48	
a3b0	22,99					0,00	1,52	3,97	4,65	4,69	4,74	5,39	6,50	7,04	7,42	9,80	18,30	
a3b1	24,51						0,00	2,45	3,13	3,17	3,22	3,87	4,98	5,52	5,90	8,28	16,78	
a1b0	26,96							0,00	0,68	0,72	0,77	1,42	2,53	3,07	3,45	5,83	14,33	
a3b2	27,64								0,00	0,04	0,09	0,74	1,85	2,39	2,77	5,15	13,65	
a1b1	27,68									0,00	0,05	0,70	1,81	2,35	2,73	5,11	13,61	
a1b2	27,73										0,00	0,65	1,76	2,30	2,68	5,06	13,56	
a3b3	28,38											0,00	1,11	1,65	2,03	4,41	12,91	
a2b0	29,49												0,00	0,54	0,92	3,30	11,80	
a2b1	30,03													0,00	0,38	2,76	11,26	
a2b2	30,41														0,00	2,38	10,88	
a1b3	32,79															0,00	8,50	
a2b3	41,29																0,00	