



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



---

**“Estudio de la Digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y Actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)”**

---

Proyecto de Trabajo de Titulación. Modalidad Proyecto de Investigación, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos.

Este trabajo es parte del Proyecto **“Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de amaranto y quinua para la elaboración de un alimento funcional”**. Aprobado por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato. Con Resolución N° 1373-CUP-2014. Coordinado por el Dr. Ismael Carrillo Ph.D.

**Autora:** Quinteros Meneses, María Fernanda

**Tutor:** Carrillo Terán, Wilman Ismael Ph.D.

Ambato – Ecuador

Julio 2016

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Wilman Ismael Carrillo Terán PhD.**

### **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, 8 de junio del 2016.



---

Carrillo Terán, Wilman Ismael Ph.D

C.I. 175708005-4

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María Fernanda Quinteros Meneses, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

María Fernanda Quinteros Meneses


C.I.180462224-7

**AUTORA**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



---

**Presidente del Tribunal**



---

**Dr. Orestes Darío López Hernández**  
**CI. 175478486-4**



---

**Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar**  
**CI. 050187305-4**

Ambato, 7 de julio del 2016.

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste 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 de línea patrimonial de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

María Fernanda Quinteros Meneses

C.I.180462224-7

**AUTORA**

## DEDICATORIA

*Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi madre del cielo Mayta (+), mi más grande amor, mi guía, mi fortaleza. Quién ha sido mi inspiración y ejemplo de lucha para seguir adelante y poder cumplir con esta meta. A ti mi ángel te dedico el fruto de mi trabajo, algo que te entrego con dedicación, perseverancia y mucho esfuerzo, siempre vivirás en mi corazón y mi amor por ti no morirá jamás.*

*A mi querida madre Rosa por darme la vida, su amor, apoyo incondicional, confianza, guiarme siempre en la formación de ser una mejor persona día a día, por ser un ejemplo de superación y dedicación, valores inculcados que han permitido culminar una de las etapas importantes en mi vida.*

*A mis hermanos Ariel, Scarleth y Alejandro por su cariño y confianza depositada en mí, por la dicha de compartir momentos buenos y malos y sobre todo por regalarme una sonrisa que ha sido luz en mi camino.*

*A mis tías Mary Carmen, Mary y Katty, este es un logro más que también les pertenece, gracias por ser mi mayor ejemplo de perseverancia, constancia y fortaleza, porque sin ustedes nada de lo que soy sería. Las amo*

*Mafer*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, que con su infinito amor y fidelidad me fortaleció a cada instante de mi vida para alcanzar los anhelos de mi corazón.*

*A mis dos madres quienes han sido el ejemplo y apoyo incondicional durante toda mi vida, así como el aliento para mantenerme constante en el compromiso de llegar hasta el final.*

*A mi abuelito, Manuel, a mis tías y tíos, que siempre me han brindado un consejo para ser mejor cada día, a mis primos y primas por ser fuente más de inspiración y dedicación. A mi familia por el cariño y la confianza depositada y sobre todo por esa unión familiar que nos caracteriza.*

*A la Universidad Técnica de Ambato, y por medio de ella a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos la cual me brindó la oportunidad de formarme profesionalmente a través de su personal docente.*

*Mi profundo agradecimiento al Doctor Ismael Carrillo, Director del trabajo de Investigación, agradezco de manera especial la confianza depositada en mí, su paciencia y la palabra de aliento. Su capacidad para guiar el trabajo y el tiempo dedicado han sido aportes invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora y persona. El trabajo siempre ha estado enmarcado bajo su orientación y rigurosidad que han sido la clave del éxito en la culminación del mismo.*

*A la Ing. Cecilia Carpio, Ing. Rubén Vilcacundo y a la Ing. Dayana Morales docentes que han compartido su tiempo y conocimientos para el desarrollo de este trabajo, que los identifica como verdaderos maestros. Además mi profundo agradecimiento a la Ing. Mónica Silva y al Ing. Mario Álvarez por el apoyo brindando con el proyecto canje de deuda España-Ecuador.*

*Agradezco de manera especial al Sr. Abraham Sánchez, Gerente de la Agroindustria SAMPI, quien ha sido tan amable de proveer la materia prima para la realización de este estudio. Sin su ayuda no hubiese sido posible desarrollar este trabajo.*

*A mis grandes amigas Jessica, Jime y Gaby P. que se han convertido en unas hermanas más para mí, gracias por ser mi apoyo en todo momento, por brindarme esa amistad desinteresada así como Hugo, Marlon, Gaby, Tatty, Fer, Marcelo, March, Bolívar y Diego personas que se han convertido en una parte especial en mi vida y todo el grupo de quienes conformamos BIOPROPEPTI que con sus valiosos conocimientos han permitido ejecutar el estudio con éxito.*

**GRACIAS...!!**

## ÍNDICE

<b>1. CAPÍTULO</b> .....	3
<b>EL PROBLEMA</b> .....	3
1.1. Tema .....	3
1.2. Justificación .....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. General.....	5
1.3.2. Específicos .....	5
<b>2. CAPÍTULO</b> .....	6
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
2.1. Antecedentes investigativos.....	6
2.1.1. Sacha inchi .....	6
2.1.2. Torta de sachá inchi .....	7
2.1.3. Proteínas .....	8
2.1.4. Concentrados y aislados proteicos .....	10
2.1.5. Métodos para cuantificar proteína.....	10
2.1.6. Digestibilidad gastrointestinal .....	12
2.1.7. Electroforesis.....	13
2.1.8. Actividad Antiinflamatoria.....	14
2.1.9. Toxicidad de proteínas vegetales .....	17
2.1.10. Modelo pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	19
2.2. Hipótesis.....	20
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis .....	21
<b>3. CAPÍTULO</b> .....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Materiales .....	22
3.2. Métodos.....	24
3.2.1. Obtención de la torta de sachá inchi ( <i>Pluketenia volubilitis</i> L.).....	24
3.2.2. Análisis proximal de la torta de sachá inchi .....	24
3.2.3. Obtención de aislados y concentrados proteicos de la torta de sachá inchi.....	25
3.2.4. Cuantificación de proteínas de sachá inchi.....	26



3.2.5. Estudio de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> de las proteínas de sachá inchi .....	28
3.2.6. Caracterización de la proteína de sachá inchi mediante técnicas electroforéticas .....	30
3.2.7. Evaluación de las actividades biológicas .....	31
<b>4. CAPÍTULO</b> .....	34
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
4.1. Análisis y discusión de los resultados .....	34
4.1.1. Análisis proximal de la torta de sachá inchi .....	34
4.1.2. Aislados y concentrados proteicos de la torta de sachá inchi .....	35
4.1.3. Cuantificación de las proteínas aisladas de sachá inchi por el método de Biuret y BCA .....	37
4.1.4. Caracterización de la proteína mediante la aplicación de técnicas electroforéticas .....	40
4.1.5. Hidrolizados de sachá inchi llevados a digestión gástrica y duodenal <i>in vitro</i> , analizados por la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) .....	46
4.1.6. Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> en los aislados y concentrados proteicos de sachá inchi .....	50
4.1.7. Evaluación de la citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi en el modelo pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	52
4.2. Verificación de la hipótesis .....	54
<b>5. CAPÍTULO</b> .....	55
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	55
5.1 Conclusiones .....	55
5.2 Recomendaciones .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

### TABLAS

**Tabla 1.** Materiales de laboratorio (vidrio, plástico u otros) utilizados durante la investigación.

**Tabla 2.** Equipos de laboratorio utilizados durante la investigación.

**Tabla 3.** Reactivos utilizados durante la investigación.

**Tabla 4.** Materiales de acuario utilizados durante la investigación.

**Tabla 5.** Métodos analíticos utilizados en el análisis proximal de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.).

**Tabla 6.** Análisis proximal de la torta de sachá inchi.

**Tabla 7.** Determinación del porcentaje de rendimiento en los aislados proteicos de sachá inchi a diferentes pHs.

**Tabla 8.** Determinación del porcentaje de concentración de la proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método de Biuret.

**Tabla 9.** Determinación del porcentaje de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método BCA.

**Tabla 10.** Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* del aislado de la proteína de sachá inchi a pH 4,0.

**Tabla 11.** Evaluación de la citotoxicidad de la proteína de sachá inchi *in vivo* aislada a pH 4,0.

**Tabla 12.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

**Tabla 13.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

**Tabla 14.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

**Tabla 15.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

**Tabla 16.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras aisladas con el solvente agua en el análisis del mejor rendimiento.

**Tabla 17.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 18.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 19.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 20.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 21.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras aisladas con el solvente cloruro de sodio 1 M en el análisis del mejor rendimiento.

**Tabla 22.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 23.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 24.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 25.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1 M.

**Tabla 26.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras de los aislados dializados en el análisis del mejor rendimiento.

**Tabla 27.** Cálculos del diseño experimental A\*B para la determinación del mejor tratamiento.

**Tabla 28.** Tabla de doble entrada del diseño experimental A\*B.

**Tabla 29.** Análisis de varianza del diseño experimental A\*B.

**Tabla 30.** Absorbancias de las muestras de proteína de sachá inchi en la aplicación del método Biuret.

**Tabla 31.** Análisis estadístico de la concentración de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

**Tabla 32.** Análisis de varianza de la concentración de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

**Tabla 33.** Análisis estadístico de la concentración de pureza de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

**Tabla 34.** Análisis de varianza de la concentración de pureza de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

**Tabla 32.** Absorbancias de las muestras de proteína de sachá inchi en la aplicación del método BCA.

**Tabla 33.** Análisis estadístico de la concentración de la proteína de sachá inchi determinada por el método BCA.

**Tabla 34.** Absorbancia medida en el espectrofotómetro de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

**Tabla 35.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el mejor tratamiento con respecto a la concentración de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método Biuret.

**Tabla 36.** Absorbancias de las muestras de proteína de sachá inchi en la aplicación del método BCA. **Tabla 37.** Determinación de la concentración de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

**Tabla 37.** Determinación de la concentración de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

**Tabla 38.** Análisis estadístico de la concentración (1000 µg/mL) de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

**Tabla 39.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el mejor tratamiento con respecto a la concentración de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

**Tabla 40.** Absorbancia medida en el espectrofotómetro de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

**Tabla 41.** Porcentaje de la actividad antiinflamatoria (inhibición) de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

**Tabla 42.** Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

**Tabla 43.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el porcentaje de inhibición en la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 a distintas concentraciones.

**Tabla 44.-**Prueba de comparación múltiple test Tukey en el porcentaje de inhibición en el patrón de estudio (diclofenaco de sodio) a distintas concentraciones.

## FIGURAS

**Figura 1.** Semillas de sachá inchi.

**Figura 2.** Proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

**Figura 3.** Proceso de inflamación.

**Figura 4.** Pez cebra (*Danio rerio*).

**Figura 5.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: proteína aislada de sachá inchi a pH 4,0 (R1); pocillo 3: agua; pocillo 4: proteína aislada de sachá inchi a pH 4,0 (R2); pocillo 5: peso molecular.

**Figura 6.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 y analizada a la concentración de 10 mg/mL. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: muestra.

**Figura 7.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con el análisis 2-β-mercaptoetanol de aislados de proteína de sachá inchi a diferentes pHs.

**Figura 8.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-β-mercaptoetanol en el análisis de aislados de proteína de sachá inchi a diferentes pHs.

**Figura 9.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con presencia de 2-β-mercaptoetanol en el análisis de aislados de proteína de sachá inchi a diferentes pHs con el disolvente NaCl 1 M.

**Figura 10.** Técnica de electroforesis 2D SDS -PAGE de proteína de sachá inchi a pH 4,0.

**Figura 11.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de sachá inchi e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20

(172 U/mg). Pocillo 1: estándar de pesos moleculares, pocillo 2: hidrolizado de sachá inchi a pH 1,2, pocillo 3: hidrolizado de sachá inchi a pH 2,0, pocillo 4: hidrolizado de sachá inchi a pH 3,2, pocillo 5: aislado de sachá Inchi a pH 4,0.

**Figura 12.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteínas de sachá inchi e hidrolizados con pepsina (2000 U/mg). Pocillo 1: estándar de pesos moleculares, pocillo 2: hidrolizado de sachá inchi a pH 1,2, pocillo 3: hidrolizado de sachá inchi a pH 2,0, pocillo 4: hidrolizado de sachá inchi a pH 3,2, pocillo 5: aislado de sachá Inchi a pH 4,0.

**Figura 13.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: aislado puro; pocillo 3: digerido gástrico; pocillo 4: digerido duodenal (hidrolizado con pepsina y pancreatina a pH 7); pocillo 5: agua

**Figura 14.** Morfología de la larva del pez cebra observada a las 24 horas de desarrollo en presencia de su medio natural y proteína de sachá inchi. A: control; B: Muestra

**Figura 15.** Torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

**Figura 16.** Pesado de la torta de sachá inchi.

**Figura 17.** Proceso de agitación de la torta de sachá inchi suspendida con agua.

**Figura 18.** Ajustado a pH 8,0 de la torta de sachá inchi suspendida con agua.

**Figura 19.** Proteína de sachá inchi centrifugada a pH 8,0.

**Figura 20.** Proteína de sachá inchi ajustada a pH 4,0.

**Figura 21.** Precipitación de la proteína de sachá inchi a pH 4,0 (H<sub>2</sub>O).

**Figura 22.** Precipitación de la proteína de sachá inchi a pH 4,0 (NaCl).

**Figura 23.** Precipitación de la proteína de sachá inchi por su punto isoeléctrico.

**Figura 24.** Proceso de liofilización de la proteína de sachá inchi.

**Figura 25.** Proteína de sachá inchi liofilizada y aislada a pH 4,0.

**Figura 26.** Proteína de sachá inchi liofilizada y aislada con NaCl 1M.

**Figura 27.** Proteína de sachá inchi aislada con NaCl 1M dializándose.

**Figura 28.** Equipo de electroforesis tradicional, corrida del gel.

**Figura 29.** Equipo de electroforesis bidimensional.

**Figura 30.** Incubador y agitador para microtubos. Proceso de digestión.

**Figura 31.** Liofilizador

**Figura 32.** Espectrofotómetro

**Figura 33.** Medición de la absorbancia de la proteína de sachá inchi. Método Biuret

**Figura 34.** Preparación de la muestra para determinar la actividad antiinflamatoria de la proteína de sachá inchi.

**Figura 35.** Muestras de la proteína de sachá inchi y patrón para la determinación de la actividad antiinflamatoria.

**Figura 36.** Pez cebra (*Danio rerio*).

**Figura 37.** Desarrollo del pez cebra en medio de proteína de sachá inchi.

## **GRÁFICOS**

**Gráfico 1.** Curva de estándar de BSA para la determinación de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método Biuret.

**Gráfico 2.** Curva de calibrado para la determinación de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método BCA.



## Resumen

Las características nutricionales de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) ha motivado a realizar un estudio complejo de este subproducto, principalmente de su proteína debido a que posee un alto contenido (58%), este parámetro permitió estudiar su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y citotoxicidad de la proteína, con el fin de aprovechar la torta en la alimentación humana y animal. En este estudio se obtuvieron concentrados y aislados proteicos de sachá inchi usando diferentes pHs de precipitación con agua y sal, la proteína fue cuantificada por el método Biuret y BCA, y analizada mediante la aplicación de técnicas electroforéticas, además se evaluó la digestibilidad gastrointestinal y actividad antiinflamatoria usando un modelo *in vitro*, y la citotoxicidad bajo el modelo del pez cebra (*Danio rerio*).

Los aislados y concentrados proteicos son solubles en agua y NaCl 1 M con altos rendimientos. El método Biuret determinó en el aislado a pH 4,0 una concentración de proteína de 75,31%, mientras que con el método BCA se obtuvo 93,1%. Se caracterizó la proteína de los aislados a través de la técnica de electroforesis SDS-PAGE, donde se observaron polipéptidos entre un peso molecular de 14-70 kDa correspondientes a las fracciones de las globulinas y albúminas. Respecto a la digestibilidad gastrointestinal de la proteína de sachá inchi se determinó la presencia de las globulinas 11S, mientras que las globulinas 7S y albúminas 2S fueron susceptibles a la hidrólisis gástrica. Finalmente, la actividad antiinflamatoria *in vitro* de la proteína dió como resultado a una concentración de 1000 µg/mL 78,13%, sin presentar ningún grado de toxicidad en el modelo pez cebra.

**Palabras claves:** Sachá inchi, proteínas, digestibilidad gastrointestinal, electroforesis, pez cebra.

## Abstract

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) defatted seed flour nutritional characteristics. The flour was obtained using cold pressing after extraction of the oil seeds. The high protein content of this flour (58%) is the reason for this study. This study identified the gastrointestinal digestibility, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of this protein. Sacha inchi flour will be used in the near future to feed human beings and animals. In this study, protein isolate was obtained from Sacha inchi using different pHs of precipitation with water and salt. Protein was quantified using the Biuret and BCA methods. Protein was analyzed by applying electrophoretic techniques. The gastrointestinal digestibility and anti-inflammatory activity was evaluated using an *in vitro* cytotoxicity zebrafish model (*Danio rerio*).

Protein isolates of this product are soluble in water and NaCl with high yields. The protein proximate analysis determined 57.6 % of protein content on the defatted seed flour from Sacha Inchi. Using the Biuret method, the protein content of the protein isolate at pH 4.0 was 75.31 % whereas using the BCA method, the protein content was 93.1 %. Protein isolate was characterized using the SDS-PAGE electrophoresis technique. Polypeptides were observed between 14-70 kDa of molecular weight corresponding to albumins and globulins fractions. These fractions were identified in the precipitated protein in the presence of water and salt. The gastrointestinal digestibility of Sacha inchi proteins determined the presence of globulins 11S. Globulins 7S and albumins 2S were susceptible of gastric hydrolysis. Finally, the *in vitro* anti-inflammatory activity of Sacha inchi proteins resulted in a high percentage of inhibition at concentration of 1000 µg/mL (78.13 %) without presenting any toxicity.

**Keywords** : Sacha inchi , proteins , gastrointestinal digestibility , electrophoresis, zebrafish .

## INTRODUCCIÓN

Las plantas alimentarias son importantes en la nutrición humana y animal. De acuerdo con la FAO, durante el 2005–2007 se reportaron datos estadísticos del consumo de alimentos de origen vegetal a nivel global como cereales (46,4%), aceites vegetales (9,6%), azúcares/edulcorantes (8,1%), frutas (5,9%), raíces/tubérculos (5,1%), y legumbres (2,1%). Las leguminosas como los frijoles y semillas oleaginosas hacen una contribución significativa al suministro de proteínas en la alimentación humana y por lo tanto son considerados como cultivos valorados **(Sathe et al., 2012)**.

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) también llamada inca peanut es una planta que crece en la selva nativa de la región Andina de Sudamérica. Esta planta pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y está compuesta por 19 especies. Las semillas de esta planta son valoradas por poseer un alto contenido de aceite 54% y un contenido de proteína del 27% **(Sathe et al., 2002; Czubinski et al., 2014)**, mientras que el subproducto llamado torta o harina obtenido durante la producción del aceite de sacha inchi posee un alto contenido de proteína reportado entre el 50-70% **(Quinteros et al., 2016)**.

La producción de proteína vegetal aislada tiene un alto interés para la industria alimentaria debido a las crecientes aplicaciones de las proteínas vegetales en los mercados de alimentos, productos nutraceúticos y alimentos funcionales **(Quinteros et al., 2016)**. Respecto al valor nutricional, se encontró que las proteínas presentes en un aislado proteico de la semilla de sacha inchi corresponde principalmente a la fracción de albúmina con un valor de 31% de la proteína total, un balance aminoacídico adecuado con los patrones FAO/OMS para cubrir los requerimientos proteicos de un adulto **(Sathe et al., 2002)**.

La digestibilidad de los alimentos es uno de los parámetros más empleados para determinar la calidad de las proteínas. Generalmente uno de los métodos que se aplica en la evaluación del grado de digestibilidad de las proteínas es el enzimático, ensayo basado en crear un medio muy similar al de los organismos de las personas con una mezcla de enzimas y sales biliares **(Jiménez et al., 2011)**. Los hidrolizados proteicos juegan un papel importante en el proceso de digestión, se pueden obtener por métodos físicos, químicos o enzimáticos, los más utilizados específicamente para producir hidrolizados con finalidades nutricionales son los enzimáticos. La ruptura de los enlaces peptídicos se llevan a cabo con la utilización de las proteasas, dando lugar a la mezcla de péptidos y aminoácidos **(Vioque, 2000)**.

Las plantas medicinales así como compuestos naturales son usados en la medicina tradicional para tratar condiciones antiinflamatorias, al parecer son una alternativa lógica para buscar agentes antiinflamatorios seguros y efectivos **(Fatma et al., 2013)**. El proceso de inflamación es el mecanismo de defensa del cuerpo para eliminar o limitar la propagación de estímulos nocivos y curar la lesión, el exceso de inflamación está asociada con la aparición de enfermedades como la artritis reumatoide, el asma, la periodontitis, enfermedad inflamatoria intestinal, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer incluso el cáncer tal como carcinoma de la vesícula biliar **(Ashley et al., 2012)**.

El uso de fármacos utilizados en tratamientos de enfermedades inflamatorias se asocia con efectos adversos como gastritis severa, úlceras, náusea, vómito, retención de sal y agua, deterioro de la función renal en pacientes renales o cardíacas, hipersensibilidad, etc **(Amir et al., 2010)**. Es necesario el desarrollo de fármacos antiinflamatorios nuevos, económicos, potentes y seguros a partir de fuentes naturales, especialmente para los países en desarrollo.

# 1. CAPÍTULO

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema

“Estudio de la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)”

### 1.2. Justificación

Dada la diversidad edafoclimática que existe en el país junto con la viabilidad de cultivar diversas especies, el cultivo de sachá inchi constituye una alternativa, con posibilidades de industrialización y potencial rendimiento económico. En el Ecuador se están desarrollando gran cantidad de productos a base de fuentes vegetales, en el 2013 gracias a las políticas del gobierno relacionadas con el Plan Nacional del Buen Vivir que tiene como objetivo “Impulsar la transformación de la matriz productiva”, ha permitido a las agroindustrias alimentarias como SAMPI, el procesamiento de alimentos utilizando el sachá inchi.

Actualmente en muchos países se están desarrollando productos a partir de semillas de sachá inchi para mejorar la nutrición humana, entre los que se destacan: alimentos funcionales enriquecidos con omega-3, productos nutraceúticos y otros (**Maurer et al., 2012**). En el Ecuador las fábricas encargadas del procesamiento de sachá inchi no cuentan con personal capacitado para incursionar en el mundo de nuevas tecnologías y procesos de mejora continua, por lo que la torta obtenida después del prensado de las semillas de sachá inchi en la mayoría de los casos es desechada o utilizada en la

alimentación animal. Las proteínas de sachá inchi tienen un alto valor nutricional y pueden ejercer actividades biológicas sobre el organismo humano, ayudando a prevenir enfermedades cardiometabólicas en el mismo. Por este motivo, el presente estudio podría ser una alternativa de aplicación en diferentes sectores: alimentario, farmacéutico, nutracéutico, entre otros. En el Ecuador el gobierno actual ha planteado como un objetivo del Plan Nacional del Buen Vivir “Mejorar la calidad de vida de la población”, poniendo como meta erradicar la desnutrición crónica en niños/as menores de 2 años y revertir la tendencia de la incidencia de obesidad y sobrepeso en niños/as de 5 a 11 años. Productos derivados de la torta de sachá inchi procesados en el Ecuador podrían ayudar en ésta problemática, al ser proteínas de alto valor nutricional y biológico.

El país hace importaciones de torta de soja para preparar aislados proteicos, alimento balanceado y otros productos. La torta de soja al ser el segundo componente más importante en la formulación de alimento balanceado, conllevó a tomar una resolución por el COMEX conjunto con el MAGAP, estableciendo que la torta y demás residuos sólidos de la extracción del aceite de soja, ingresará al país sin pagar aranceles hasta diciembre del 2016. Sin embargo, se puede considerar otras alternativas de torta como es la torta de sachá inchi ya que de acuerdo al perfil de aminoácidos podría constituirse en una excelente alternativa de la torta de soja, además pudiendo constituir un suplemento alimenticio para la preparación de mezclas nutritivas en principio, para consumo humano (**Hurtado, 2013**). La torta de sachá inchi puede ser un instrumento beneficioso ya que permitirá economizar un importante rubro para el sector, el mismo que se vería reflejado en el valor agregado de los aislados proteicos de sachá inchi. Además, ayudaría a incentivar el cultivo masivo de esta planta en el Ecuador, permitiendo el fomento de fuentes de trabajo que van de la mano con conocimientos científicos y tecnológicos, que dan apertura de interés en el estudio de las proteínas obtenidas de la torta de sachá inchi, como en este caso en la

descripción de la digestibilidad de estas proteínas simulando condiciones fisiológicas humanas.

### **1.3. Objetivos**

#### 1.3.1. General

- Estudiar la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de las proteínas de la torta obtenida del prensado en frío después de la extracción del aceite de las semillas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*).

#### 1.3.2. Específicos

- Aislar las proteínas de sachá inchi mediante precipitación isoeléctrica.
- Caracterizar las proteínas de sachá inchi mediante la aplicación de técnicas electroforéticas.
- Evaluar la citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi en el modelo pez cebra (*Danio rerio*).
- Determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* (método de desnaturalización de proteína).

## 2. CAPÍTULO

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

##### 2.1.1. Sacha inchi

El sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), es una oleaginosa silvestre que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*. Se encuentra distribuida en estado silvestre en diversos lugares desde América Central hasta la Amazonía. Diversos estudios realizados en el Perú, han demostrado un gran potencial de este cultivo como fuente de ácidos grasos insaturados (**Dostert, 2009; Follegatti, 2009; Gutiérrez, 2011; Gómez, 2005**).

Los nativos de la selva amazónica conocen al sacha inchi desde hace siglos y fue descrita por Linneo en 1753. La especie *Plukenetia volubilis* L. es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: “sacha inchi”, “sacha maní”, “maní del inca”, “maní del monte”, “inca peanut” (**Manco, 2006; Valadeau, 2010; Huamán et al., 2008**).



**Figura 1.** Semillas de sacha inchi.

**Fuente:** Manco, E. 2006



En los últimos años, su cultivo ha tomado importancia económica e industrial en el mercado internacional, debido a la demanda de ácidos grasos esenciales (ácido linolénico, linoleico y oleico, conocidos como omega 3, 6 y 9 respectivamente) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), que la semilla de sachá inchi concentra en cantidades elevadas con respecto a otras oleaginosas. Investigaciones recientes realizadas con aceites que contienen omegas y vitamina E, indican la importancia nutricional y terapéutica de su consumo para el control de radicales libres y una serie de enfermedades que estos originan en el cuerpo humano **(Palanca, 2006; Coronado, 2006)**.

La primera referencia científica del sachá inchi fue hecha en 1980 a consecuencia de los análisis de contenido graso y proteico realizados por la Universidad de Cornell en USA, los que demostraron que las semillas del sachá inchi tienen alto contenido de proteínas 33% y aceite 49% **(Hazen & Stoewesand, 1980)**.

### **2.1.2. Torta de sachá inchi**

La extracción del aceite de sachá inchi se realiza por el método de prensado en frío, obteniendo como un subproducto la torta, la cual posee un elevado contenido de proteína y aceite **(Hamaker et al., 1992)**. Estudios realizados por **Hurtado (2013)** determinaron que el contenido de proteína encontrado en la torta de sachá inchi siguiendo métodos establecidos por la AOAC, es significativamente elevado con un 51,23%.

**Ruiz et al (2013)** determinaron que el contenido proteico de las tortas de sachá inchi es más alto en la variedad *Plukenetia. volubilis* (59%) en comparación con la variedad *Plukenetia. huayllabambana* (46%), sin embargo, ambas especies son deficientes en los aminoácidos esenciales lisina y leucina. **Betancourth (2013)** determinó que la torta obtenida después del proceso de extracción del aceite de sachá inchi por el método de prensado en frío contiene alta cantidad de

proteína 59,1% y grasa 6,93% en base seca, por lo que representa una alternativa a la torta de soja en la elaboración de alimentos concentrados para animales. De igual forma **Pascual & Mejía (2000)** reportaron un porcentaje de proteína similar (58,72%) a los autores mencionados.

### 2.1.3. Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en las células, constituyen el 50% de su peso seco, desempeñan el mayor número de funciones de todos los seres vivos (**Byong, 2000**). Todas las proteínas están constituidas por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, la mayoría de las proteínas contienen azufre, y algunas contienen elementos adicionales; por ejemplo, las proteínas lácteas contienen fósforo y las hemoglobinas contienen hierro. El cobre y el zinc son también constituyentes de algunas proteínas (**Vaclavik, 2002**).

Las unidades más simples de la estructura química común a todas las proteínas son los aminoácidos. En el código genético se pueden encontrar codificados los veinte  $\alpha$ -aminoácidos, también llamados residuos, que constituyen los eslabones que conforman péptidos, que cuando forman cadenas polipeptídicas y alcanzan altos pesos moleculares se denominan proteínas. Para fines prácticos es posible definir a las proteínas alimentarias como las proteínas que son fácilmente digeribles, no tóxicas, nutricionalmente adecuadas, útiles en los alimentos, disponibles en abundancia y con un alto valor nutricional (**Badui, 2006**).

Es importante y necesario realizar investigaciones sobre compuestos bioactivos de las plantas tradicionales, que posteriormente servirán como base para estudios farmacológicos, alimentarios, nutraceúticos entre otros (**Hemalatha et al., 2013**). Las proteínas funcionales como los péptidos bioactivos al ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos

sobre el sistema cardiovascular, el sistema inmune o el tracto gastrointestinal **(Martínez & Martínez, 2006)**.

Respecto al valor nutricional, se encontró que las proteínas presentes en un aislado proteico de las semillas de sachá inchi corresponden principalmente a la fracción de albúmina con un valor de 31% de la proteína total, un balance aminoacídico adecuado con los patrones FAO/OMS para cubrir los requerimientos proteicos de un adulto **(Sathe et al., 2002)**.

Debido a la naturaleza anfotérica, la solubilidad de las proteínas está muy influenciada por el pH, ésta es mínima en su punto isoeléctrico (pI) que depende principalmente de la estructura de la proteína, dependiendo del pH del sistema, estos polímeros pueden actuar como cationes o como aniones, lo que repercute en el aumento de la solubilidad y estabilidad. En general, a valores de pH diferentes del punto isoeléctrico habrá un aumento significativo en la solubilidad de las proteínas, pero la fuerza iónica, el tipo de solvente, la temperatura y otros factores jugarán un papel importante **(Peña, 2004)**. Estudios acerca de la solubilización y fraccionamiento de las proteínas de sachá inchi permitieron obtener: 43,7% de albúminas, 31,9% de glutelinas, 27,3% de globulinas y prolaminas 3% del total de las proteínas acuosas **(Sathe et al., 2012)**.

**Sathe et al (2002)** mediante estudios realizados acerca de las propiedades bioquímicas de las proteínas de sachá inchi, determinaron que son proteínas 3S (diméricas) compuestas de 2 polipéptidos glucosídicos con estimaciones de pesos moleculares de 32.800–34.800 Da. **Arana (2010)** describe que estas proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales (leucina isoleucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano y valina), cuando se compara con los patrones de recomendación para adultos y niños de la FAO/OMS.

#### **2.1.4. Concentrados y aislados proteicos**

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada, se obtienen eliminando los polisacáridos, oligosacáridos y otros componentes ya sea por: hidrólisis y posterior precipitación, por adición de ácidos, controlando los diferentes parámetros como el pH, temperatura, solubilidad y otros, que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida. Los aislados proteicos se pueden conseguir a partir de un concentrado proteico, así como de la materia prima natural. Este tipo de producto posee 85-95% de proteína, debido a que es sometido a un proceso de cromatografía de intercambio iónico. Por otro lado, en los concentrados proteicos, puede variar considerablemente el contenido de proteína entre un 35 y 85%, por lo que existe una enorme diferencia en la calidad de este producto **(Rizo, 2012)**.

Una amplia variedad de herramientas de extracción y fraccionamiento de proteínas y péptidos se disponen en base a sus características fisicoquímicas y estructurales, tales como la solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular, punto isoeléctrico (pI) y así sucesivamente. Existe una visión integrada de técnicas de extracción, fraccionamiento de proteínas y péptidos utilizados en los alimentos, estudios de proteína basados en diferentes tecnologías sobre la ruptura celular, precipitación y los sistemas de solubilización son necesarios para obtener la fracción de proteína de interés como es el caso del aislamiento de proteínas mediante hidrólisis ácida **(Martínez et al., 2013)**.

#### **2.1.5. Métodos para cuantificar proteína**

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica, es una técnica básica cuando se trata de purificar una proteína concreta, conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos. Existen diferentes

métodos para la cuantificación de proteínas basándose en: la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en la zona ultravioleta (UV), formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes **(Reyes & Galván, 2001)**.

El método de Biuret comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y  $\text{Cu}^{+2}$ . El complejo presenta un color violeta característico, que se puede observar a 310 nanómetros o 540–560 nanómetros, el cual se da por la coordinación de un átomo de cobre con cuatro átomos de nitrógeno. El complejo se basa en la desprotonación de los grupos amida para formar el enlace con el  $\text{Cu}^{+2}$  o por el establecimiento de un enlace coordinado entre el metal y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno y de nitrógeno del péptido **(Nollet, 1996)**.

Es importante conocer el contenido de proteína de la muestra de estudio, es posible utilizar un método oficial de análisis de proteínas como el de Kjeldahl que determina el contenido de nitrógeno total en la muestra. A menudo es conveniente usar un análisis de proteínas espectroscópico rápido que requiera solamente una pequeña cantidad de muestra. El método de ensayo BCA ácido bicinconínico se utiliza cuando se necesitan resultados rápidos, confiables y sobre todo que sean reproducibles. El principio del método está basado en la reducción de los iones cúpricos en virtud de los iones cuprosos en condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el reactivo BCA para dar un color púrpura que se puede cuantificar espectrofotométricamente y puede relacionarse directamente con el contenido de proteína **(Nielsen, 2010)**.

### 2.1.6. Digestibilidad gastrointestinal

La digestibilidad es una manera de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestión que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino. Los ensayos de digestión *in vitro* con pepsina en un principio fueron desarrollados y utilizados para evaluar el valor nutricional de las proteínas como fuentes de aminoácidos viables y actualmente se usan para determinar el grado de alergenicidad **(Nielson, 1988; Budd et al., 1983)**.

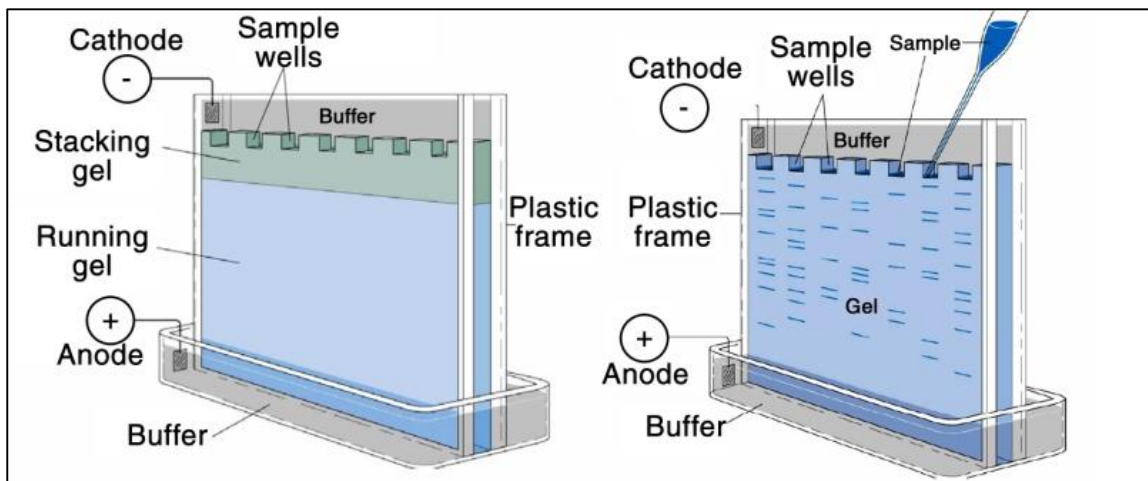
La combinación de conocimientos sobre la composición química y digestibilidad de un aislado proteico permite su uso en la formulación de un alimento y precisar cálculos sobre su contribución en términos de energía y nutrientes **(Sullivan & Reigh, 1995; Laining et al., 2003; Koprucu & Ozdemir, 2005; Guillaume et al., 2004)**. El conocimiento de la digestibilidad viabiliza la inclusión de una variedad de productos y subproductos de la agroindustria **(Pezzato et al., 2002)**.

El organismo humano ha desarrollado un sistema complejo para descomponer los alimentos y extraer los nutrientes que necesita para mantener la salud. Los estudios en sistemas animales son una alternativa eficaz para reemplazar los estudios en sistemas humanos, especialmente cuando se refiere al caso de las alergias. Los estudios en humanos se dificultan por consideraciones éticas y técnicas, especialmente por la cantidad y el número de individuos voluntarios que se necesitan. Por esta razón se ha desarrollado la aplicación de modelos *in vitro* que simulan condiciones que suceden en los procesos *in vivo* en el organismo humano **(Carrillo, 2014)**.

Muchos estudios se han llevado a cabo para determinar el potencial alergénico de las proteínas alimentarias utilizando ensayos de digestibilidad *in vitro* con pepsina en simuladores de fluidos gástricos (SGF). Estos estudios apoyan que la digestión puede ser utilizada como herramienta clave para predecir el potencial alergénico de las proteínas alimentarias (**Burks & Sampson, 1997; Fu TJ et al., 2002; Kenna & Evans, 2000**).

### 2.1.7. Electroforesis

La técnica de electroforesis es un método empleado para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico.



**Figura 2.** Proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

**Fuente:** Carrillo et al., 2013

Esta técnica fue empleada por primera vez por Tiselius (1937), quien descubrió que las proteínas se podían separar por acción de un campo eléctrico y fue el inventor de un equipo para la electroforesis. Por otro lado, **Laemmli (1970)** describió una nueva técnica que logra un incremento en la resolución por la

utilización de dodecil sulfato de sodio (SDS). En los años posteriores se comenzaron a emplear agentes reductores y SDS, para la determinación del peso molecular de las proteínas a lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE **(Carrillo et al., 2013)**.

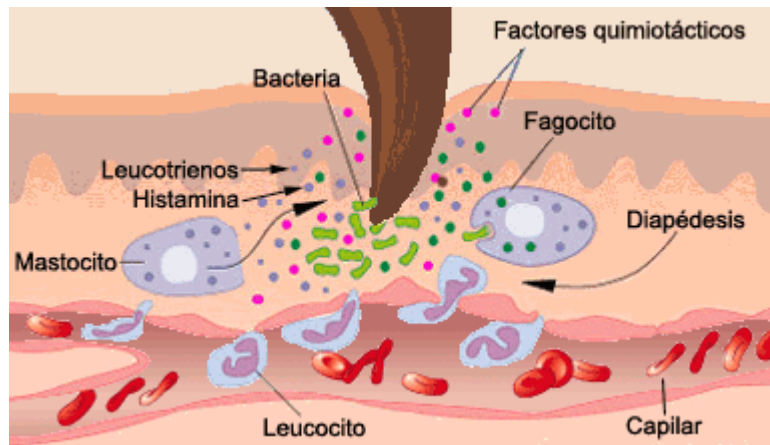
La electroforesis consiste en preparar un gel concentrador y separador, los geles de poro intermedio (10–12%) proveen una separación adecuada para proteínas de 10-90 kDa **(Martínez & Añon, 2001)**. El gel de concentración difiere del de separación en el tamaño de poro y en el pH, y tiene la función de concentrar las proteínas de forma que la resolución no dependa del volumen inicial de la muestra. El gel de separación presenta poros más pequeños y ayuda en la separación por tamaño molecular de las proteínas **(Hjemel & Chrambach, 1981)**

#### **2.1.8. Actividad Antiinflamatoria**

La inflamación es un síntoma muy común de muchas enfermedades crónicas, es una respuesta protectora normal a la lesión del tejido causada por un traumatismo físico, químico nocivo o agentes microbianos **(Ashley et al., 2012)**. Los fármacos no esteroides antiinflamatorios son comúnmente usados en la administración de efectos inflamatorios, pero estos están asociados con efectos no deseados tal como irritación gástrica, úlceras, etc **(Amir et al., 2010)**.

Las células que resultan dañadas por microbios o agentes físicos o químicos inician una respuesta defensiva llamada inflamación. Los egipcios describieron abscesos y úlceras en Código de Hammurabi (2000 AC) con detalladas instrucciones de cómo tratar los abscesos en el ojo **(Kashfi, 2009)**. El físico griego, Hipócrates pudo haber sido el primero en considerar la inflamación como un proceso benigno de la cicatrización introduciendo los términos de edema y erisipelas para describir sus síntomas. La primera descripción de los síntomas inflamatorios se establece como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor **(Lawrence et al., 2002)**.





**Figura 3.** Proceso de inflamación

**Fuente:** Carretero, M. 2003

Entre las sustancias que contribuyen a la vasodilatación, al aumento de la permeabilidad y otros aspectos de la respuesta inflamatoria, se encuentran los siguientes: histaminas, cininas, prostaglandinas, leucotrienos y el sistema de complemento. El dolor, ya sea inmediato o tardío, es síntoma de la inflamación y resulta del daño de fibras nerviosas o de irritación que causan sustancias tóxicas provenientes de microbios. Las cininas afectan ciertas terminaciones nerviosas y producen gran parte del dolor, mientras que las prostaglandinas lo intensifican y lo prolongan. El dolor también puede deberse al aumento de presión debido a la formación del edema (**Punchard et al., 2004**).

Todo ello supone un conjunto de defensa del organismo que, si bien es deseable para salvaguardar su integridad evitando en lo posible la entrada de agentes extraños, por su inespecificidad y persistencia puede llegar a construir un síntoma molesto, cuya duración puede prolongarse y, en ese caso, es necesario o conveniente controlarlo. Estos hechos justifican la necesidad de los antiinflamatorios. Los fármacos antiinflamatorios se pueden clasificar en dos grandes grupos: antiinflamatorios esteroides (corticosteroides) y los

antiinflamatorios no esteroides conocidos como (AINE). Los AINE son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa, de forma que inhiben directamente la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico **(Carrillo, 2010)**.

La enfermedad antiinflamatoria de intestino es una inflamación crónica del tracto intestinal y existe en dos formas colitis ulcerativa que afecta el intestino largo y enfermedad de Crohn's que puede afectar cualquier parte del intestino, tienen tratamientos farmacéuticos que son moderadamente efectivos y a largo plazo que resultan tóxicos, por ello se requieren nuevos tratamientos. Está bien caracterizado que la gastrolesividad por AINE deriva de efectos tóxicos directos sobre la mucosa gastrointestinal y de efectos sobre el reclutamiento leucocitario, pero fundamentalmente de la inhibición sistémica de las prostaglandinas endógenas. Este efecto inhibitor de las prostaglandinas, que es la diana del efecto terapéutico de los AINE al reducir los fenómenos inflamatorios y ciertos mecanismos del dolor en la mayoría de tejidos, resulta también ser el causante de las lesiones en el tubo digestivo, ya que la mucosa gastrointestinal posee un mecanismo de defensa ante distintas agresiones que es modulado por prostaglandinas endógenas. Por lo anterior existe un interés en encontrar antiinflamatorios potentes que no presenten efectos secundarios sobre la mucosa gástrica y duodena **(Carrillo, 2010)**.

Las proteínas funcionales como los péptidos bioactivos, además de su papel nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema cardiovascular, el sistema inmune o el tracto gastrointestinal **(Martínez & Martínez, 2006)**.

Varios péptidos y proteínas han sido propuestos para el tratamiento de enfermedades dentales, la diarrea, mala absorción de minerales, la hipertensión, la trombosis, o de inmunodeficiencias **(Rutherford & Moughan, 2005;**

**Vermeirssen et al., 2004**). La actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años interés científico en diferentes áreas, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (**Gómez et al., 2011**).

Existen varios trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria que se ha realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (**Newman et al., 2003; Setty & Sigal, 2005**).

#### **2.1.9. Toxicidad de proteínas vegetales**

El origen o presencia de los tóxicos en alimentos, se debe a cuatro fuentes: naturales, intencionales (como los aditivos), accidentales (como los contaminantes) y las generadas por proceso. La clasificación de este componente se complica, ya que variaciones pequeñas en su estructura lo puede hacer o no menos peligroso. Sin embargo, aunque a un tóxico se le asocie con un grupo de alimentos, no es posible tomar esto en cuenta para su clasificación, ya que, por ejemplo, los glucósidos cianogénicos pueden encontrarse en leguminosas, tubérculos, cereales, etc (**Badui, 2006**).

Los productos proteínicos vegetales (PPV) se han elaborado de manera que derive un significativo aumento del contenido proteínico en el producto final. Algunos PPV, especialmente los derivados obtenidos de la soja, han sido objetos de investigación sobre cómo analizar estos productos para determinar su inocuidad y calidad nutritiva. Las materias primas de las que se obtienen los PPV podrían contener componentes tóxicos o antinutritivos de origen natural como glucosinolatos en Brassica Spp., gossipol en la semilla de algodón, hemaglutininas e inhibidores de la tripsina en las legumbres (**Codex Alimentarius, 1995**).

La presencia de toxinas en los cereales, semillas de oleaginosas, leguminosas, frutas, etc destinadas al consumo humano y animal es un riesgo importante como lo reconocen los Codex Alimentarius. Una de las principales toxinas que producen efectos crónicos e inestabilidad durante los procesos de elaboración de los alimentos y piensos son las que producen las especies de *Fusarium*, estas toxinas se desarrollan especialmente en la fase de floración y formación de la semilla (**Nicholson et al., 2003; Jurado et al., 2004**).

**Badui (2006)** menciona que los péptidos, proteínas y aminoácidos tóxicos en muchos casos, su modo de acción varía, ya que pueden ser inhibidores de la actividad enzimática, o interferir en el funcionamiento normal del sistema nervioso o digestivo, sin descartar otro tipo de alteraciones, como la acumulación de selenio en aminoácidos, en donde se sustituye al azufre en cistina, glutatión, metionina, etc.

**Barrio (2015)** establece que los episodios tóxicos asociados al consumo de especies de origen vegetal y animal (mariscos) constituyen un problema para la seguridad alimentaria, debido a que en la mayoría de los casos causan la muerte. Por ello, es necesario contar con un método rápido, sensible y específico para determinar el contenido y la presencia de toxinas. Según **O'Brien (2000)** la evaluación de la citotoxicidad de un compuesto o mezcla de compuestos puede estudiarse mediante pruebas químicas, ensayos biológico *in vitro* e *in vivo* en humanos y animales tras la ingesta de los mismos. Existen varios métodos para poder detectar la presencia de toxinas en los alimentos, dentro de los métodos se destacan: el método de microtitulación, tratamiento con tripsina o pronasa de los glóbulos rojos, el método fotométrico, métodos aplicados en modelos *in vivo* como el bioensayo en ratón, modelo pez cebra (*Danio rerio*).

#### 2.1.10. Modelo pez cebra (*Danio rerio*)

Con el objetivo de mejorar la confiabilidad, precisión y especificidad, y disminuir los costos en los estudios acerca de la seguridad alimentaria, actualmente, se está trabajando en diferentes estrategias y modelos entre los que se incluyen ensayos farmacológicos, inmunoensayos, ensayos químicos o de separación y bioensayos alternativos (Barrio et al, 2015).



**Figura 4.** Pez cebra (*Danio rerio*)

**Fuente:** Barrio et al., 2015

El embrión del pez cebra (*Danio rerio*) es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento, el *screening*, la búsqueda de nuevas drogas y la toxicología (Nagel, 2002; Spitsbergen y Kent 2003; Hill et al., 2005), debido a su alto grado de similitud genética con los vertebrados superiores, compartiendo un 70% de genes con los humanos (Veciana et al., 2014). Las ventajas del modelo son la simplicidad, la economía de mantenimiento, la reproducción (se puede contar con 200 embriones semanales por hembra) y la facilidad de observar el desarrollo embrionario (durante las primeras 24 horas de desarrollo); los ensayos pueden realizarse en platos de 96 pocillos que requieren poca cantidad de muestra para el estudio. Además, es posible llevar a cabo ensayos rápidos en adultos utilizando diferentes vías de administración: oral, inyección intramuscular e intraperitoneal. Este sistema se aplica cada vez más para el estudio de toxinas microbianas y más

específicamente para investigar toxinas marinas (**Tiedeken, 2005; Wang et al., 2005; Lefebvre et al., 2004 & 2009; Purdie, 2009**).

Estas características convierten al pez cebra en un modelo vertebrado muy versátil y apto para estudios *in vivo* de toxicidad, cuya instalación en los laboratorios de toxicología permitiría, adicionalmente, la adopción de nuevas técnicas para la realización de ensayos en alimentos, aguas residuales y otras matrices (**Scholz et al., 2008**).

## **2.2. Hipótesis**

**Tema:** “Estudio de la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)”

**H<sub>1</sub>:** Las proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) son digeribles en el organismo humano.

**H<sub>2</sub>:** Las proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) presentan citotoxicidad en el modelo pez cebra.

**H<sub>3</sub>:** Las proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) poseen actividad antiinflamatoria.

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

*Variable independiente (1):* Proteínas extraídas de la torta de sachá inchi

*Variable dependiente (1):* Digestión gastrointestinal

*Variable independiente (2):* Proteínas extraídas de la torta de sachá inchi

*Variable dependiente (2):* Citotoxicidad

*Variable independiente (3):* Proteínas extraídas de la torta de sachá inchi

*Variable dependiente (3):* Actividad antiinflamatoria

### 3. CAPÍTULO

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

**Tabla 1.** Materiales de laboratorio (vidrio, plástico u otros) utilizados durante la investigación.

<b>Materiales de laboratorio</b>
Vasos de precipitación
Balones de aforo
Probetas
Varillas de agitación
Magneto
Espátula
Kit micropipetas
Tubos para centrifugar
Cajas Petri
Puntas para micropipetas
Tubos eppendorf
Envases herméticos
Tiras de pH
Goteros
Rotuladores
Guantes látex

**Tabla 2.** Equipos de laboratorio utilizados durante la investigación.

<b>Equipos</b>
Balanza
Agitador magnético
pHmetro
Centrifuga
Liofilizador
Espectrofotómetro
Agitador vortex
Agitador para microtubos
Equipo de electroforesis Bio-Rad
Esteromicroscopio



**Tabla 3.** Reactivos utilizados durante la investigación.

<b>Reactivos</b>
Hidróxido de sodio
Ácido clorhídrico
Cloruro de sodio
Bicarbonato de sodio
Enzimas
Sales biliares
$\beta$ -mercaptoetanol
Tris-Cl
Acrilamida
SDS (dodecil sulfato sódico)
Temed
PSA (persulfato de amonio)
Glicina
Glicerol
Azul de bromofenol
DMSO
Azul de coomassie
Agua desionizada
Reactivo de Biuret
Reactivo BSA

**Tabla 4.** Materiales de acuario utilizados durante la investigación.

<b>Acuario</b>
Peces cebra ( <i>Danio rerio</i> )
Comida para peces (artemia)
Peceras
Calentadores eléctricos
Termómetros
Filtros
Estantería
Tiras de nitritos
Solución azul de metileno

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Obtención de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

#### 3.2.1.1. Producción del aceite de sachá inchi

El proceso de extracción de aceite de sachá inchi se llevó a cabo con prensado en frío en la empresa SAMPI, utilizando semillas vírgenes seleccionadas de sachá inchi, esto significa que fue un prensado manual y mecánicamente, sin utilizar calor o solventes químicos para conservar todo su valor nutricional, una vez que se extrajo el aceite de las semillas se obtuvo como subproducto la torta de sachá inchi, materia prima que se empleó en todos los estudios realizados durante el proyecto de investigación.

#### 3.2.2. Análisis proximal de la torta de sachá inchi

El análisis proximal de la torta de sachá inchi se realizó en el laboratorio de control y análisis de alimentos (LACONAL) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos (UTA), este análisis proximal determinó el contenido de proteína, fibra, grasa, cenizas y humedad, de acuerdo con los métodos de la **AOAC (2012)**. La tabla 5 muestra los diferentes métodos analíticos

**Tabla 5.** Métodos analíticos utilizados en el análisis proximal de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.).

Ensayo	Método
Cenizas	PE01-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 923.03
Proteína	PE03-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2001.11
Humedad	PE02-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10
Grasa	PE08-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2003.06
Fibra cruda	INEN 522

Fuente: Laboratorio de control y análisis de alimentos "LACONAL"

### **3.2.3. Obtención de aislados y concentrados proteicos de la torta de sachá inchi**

Los concentrados y aislados proteicos de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) se obtuvieron según el método descrito por **Martínez & Añón (1996)** con modificaciones. La harina resultante de la extracción del aceite de sachá inchi conocida como torta fue suspendida en agua en una relación 1:3 respectivamente, se ajustó a pH 8,0 con la solución de NaOH 2 N, la mezcla fue llevada a centrifugación durante 30 minutos, 25 °C y 4.500 rpm, para lo cual se trabajó con una centrifuga marca Labnet. Se descartó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante, el mismo que fue ajustado a pH 4,0 con solución HCl 2 N. La precipitación ácida produjo un cambio en el punto isoeléctrico de las proteínas de manera que éstas precipitaron durante 24 horas de reposo a temperatura de refrigeración (4-8 °C), los precipitados fueron neutralizados con NaOH 0,1 M. En este proceso de ajustado de pH se utilizó un pHmetro marca Thermo scientific modelo X27681. Además, se reemplazó el agua por el solvente NaCl 1 M en la obtención de aislados y concentrados proteicos, siguiendo el método descrito anteriormente. Finalmente, los aislados y concentrados proteicos fueron llevados a -80 °C en un congelador marca Panasonic. Para el proceso de liofilización de las muestras se trabajó bajo condiciones estándares del equipo, para esta etapa se utilizó un liofilizador marca Vir Tis SP SCIENTIFIC.

#### **3.2.3.1. Determinación del rendimiento de los aislados y concentrados proteicos de sachá inchi**

Para la determinación del rendimiento de los aislados y concentrados proteicos de sachá inchi se aplicó un diseño experimental A\*B, donde el factor A estuvo determinado por el tipo de solvente a utilizarse, contando con 2 niveles; a<sub>0</sub>: Agua y a<sub>1</sub>: Cloruro de sodio, como factor B se estableció la variación de pHs, determinando 5 niveles; b<sub>0</sub>: pH 2,0; b<sub>1</sub>: pH 3,0; b<sub>2</sub>: pH 4,0; b<sub>3</sub>: pH 5,0; b<sub>4</sub>: pH 6,0. Para cada tratamiento se trabajó con tres réplicas de experimentación.

**Análisis estadístico:** Los resultados fueron expresados mediante el análisis de la tabla de ANOVA y se aplicó la prueba de comparación múltiple test tukey utilizando el programa estadístico INFOSAT.

### **3.2.4. Cuantificación de proteínas de sachá inchi**

#### **3.2.4.1. Cuantificación de proteínas por el método Biuret**

Se realizó la cuantificación de proteína de sachá inchi mediante el empleo del método Biuret, siguiendo la metodología descrita por **(Caprette, 2015)**. El principio estuvo basado en la formación de un complejo púrpura con sales de cobre que contiene el reactivo Biuret, el mismo que se preparó a base de tartrato de potasio-sodio, sulfato de cobre y yoduro de potasio, todos disueltos en 400 mL de solución NaOH 0,2 M en el orden respectivamente establecido. La muestra se preparó con el pesado de 8 mg de proteína de sachá inchi para lo cual se utilizó una balanza analítica marca VWR, esta cantidad de proteína pesada fue disuelta en 1 mL de agua y 75  $\mu$ L de NaOH 0,2 M. Finalmente, se mezclaron 1,25 mL de reactivo Biuret con 250  $\mu$ L de la muestra preparada anteriormente, una vez preparadas las diluciones correspondientes se llevaron a centrifugar durante 30 minutos, las muestras centrifugadas se las colocaron a 5 °C, posteriormente éstas se analizaron en un espectrofotómetro empleando una longitud de onda de 540 nanómetros, el equipo utilizado en la medición de la absorbancia fue un espectrofotómetro marca Hach modelo DR 5000 UV-Vis Para la interpretación de los resultados se trabajó con una curva de calibrado y se realizó dos mediciones a cada muestra con sus respectivas réplicas (2). Los resultados fueron expresados mediante el análisis estadístico arrojado por la tabla de ANOVA y test tukey, utilizando un  $P < 0,05$ .

#### **3.2.4.2. Cuantificación de proteínas por el método BCA**

Por otro lado, se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de BCA (ácido bicinconínico), para ellos se utilizó un kit comercial de la marca Thermo Scientific. El propósito se vió enfocado en la reducción de iones cúpricos

a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas de la proteína. Los iones cuprosos reaccionaron con el reactivo BCA proporcionando un color púrpura, que pudo cuantificarse espectrofotométricamente **(Nielsen, 2010)**.

#### - **Preparación de la muestra**

En un tubo eppendorft se pesaron 5 mg de muestra, 1 mL de agua y 75  $\mu$ L de NaOH, luego se le introdujó un magneto pequeño y se puso en la plancha de agitación durante 15 minutos, posteriormente se sacaron los magnetos y la muestra fue centrifugada por 15 minutos. Se tomó 0,1 mL de la muestra preparada anteriormente con 1,9 mL de agua ultra purificada (dilución 1:20).

#### - **Preparación de los estándares**

En un tubo eppendorft de 2 mL, se preparó la solución madre con 0,2 mL de la ampolleta BSA (albúmina de suero bovino) y 1,4 mL de agua ultra purificada (Milli-Q), el agua purificada se obtuvo mediante el empleo del equipo Thermo Scientific. Se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ L de la solución madre los que se diluyeron en 400, 300, 200 y 100  $\mu$ L de agua ultra purificada respectivamente. Todo lo anteriormente mencionado se realizó en base al peso obtenido en la balanza analítica marca VWR, con el objetivo de disminuir el grado de error en sus cálculos.

#### - **Preparación de la solución BCA**

Se realizó multiplicando el número de muestras finales por 1,4 mL de solución del reactivo (blanco y azul), luego se aplicó una regla de tres para el reactivo blanco y para el reactivo azul fue la diferencia.

## - **Análisis en el espectrofotómetro**

Se pesaron 70  $\mu$ L de las muestras y de los estándares respectivamente, se les añadió 1,4 mL de la solución del reactivo (blanco y azul) y se midió la absorbancia a 562 nm, utilizando un espectrofotómetro marca Hach. Se realizaron tres réplicas por muestra. Los resultados fueron expresados mediante el análisis estadístico arrojado por la tabla de ANOVA y test tukey, utilizando un  $P < 0,05$ .

### **3.2.5. Estudio de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de las proteínas de sachá inchi**

#### **3.2.5.1. Digestión gástrica *in vitro***

Para el proceso de la digestión gástrica *in vitro* se siguió la metodología descrita por **Jiménez et al (2012)** con modificaciones. Las proteínas fueron sometidas a un proceso de hidrólisis gástrica simulando las condiciones fisiológicas humanas del estómago. Para ello, se utilizó la enzima pepsina a dos concentraciones diferentes. Las digestiones se llevaron a cabo en fluido gástrico simulado de pH: 1,2; 2,0 y 3,2, simulando condiciones de niños, adultos y personas con trastornos gástricos. Para el proceso de la simulación digestiva de la proteína, se utilizó un agitador de tubos eppendorf (termostato) marca Esco.

La preparación de las muestras consistió en pesar 10 mg de proteína aislada a pH 4,0 para ser diluida con fluido gástrico simulado (SGF, NaCl 0,35 M) ajustados a diferentes pHs: 1,2; 2,0 y 3,2 a 37 °C durante 120 minutos con pepsina porcina a una concentración de 4.500 U/mg de proteína. Para la comparación del efecto de la enzima en la hidrólisis de la proteína, también se trabajó con una relación enzima/sustrato de 1:20, w/w (2.000 U/mg) (**Jiménez et al., 2012; Carrillo et al., 2014**). Una vez que se detuvo la hidrólisis, en cada muestra se colocaron 200  $\mu$ L de  $\text{NaHCO}_3$  1 M, deteniendo de esta manera la reacción enzimática. Se realizó cuatro réplicas por cada ensayo de digestión y

se comparó con la técnica de electroforesis SDS-PAGE para asegurar la repetitividad de los resultados.

### 3.2.5.2. Digestión duodenal *in vitro*

Para el proceso de digestión duodenal se siguió el método descrito por **Martos et al (2010)** con modificaciones. Los hidrolizados gástricos sometidos a 120 minutos de proceso de digestión fueron ajustados a pH 7,0 a los cuales se les añadieron los siguientes elementos:

- a. Una mezcla de sales biliares que contenían cantidades equimolares de glicodesoxicolato de sodio y taurocolato de sodio (Sigma-Aldrich) con una concentración final de cada sal de 6,15 mM.
- b.  $\text{CaCl}_2$  1 M con una concentración final de 6,125 mM.
- c. Pancreatina (100 U/mg) mezclada con Bis-Tris 20,3 mM

Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 120 minutos y se detuvieron por calentamiento a 80 °C durante 10 minutos, permitiendo de esta manera la desactivación de las enzimas. Los digeridos fueron analizados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

### **3.2.6. Caracterización de la proteína de sachá inchi mediante técnicas electroforéticas**

#### **3.2.6.1. Aplicación de la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Para la caracterización de la proteína de sachá inchi se empleó la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes utilizando el método descrito por **Laemmli (1970)** con modificaciones. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 200 V durante 30 minutos en un buffer Tris-HCl usando un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), los geles fueron teñidos durante la noche en azul de coomassie y luego fueron desteñidos en una mezcla de metanol, etanol y ácido acético. Una vez que se obtuvieron los geles, éstos fueron fotografiados digitalmente con un equipo Bio-Rad modelo ChemiDoc. Los geles se hicieron por duplicado para la interpretación de los resultados.

##### **- Preparación de la muestra**

Se pesaron 10 mg de proteína aislada a pH 4,0 se añadió 1 mL de agua cuya mezcla se la realizó en el vortex VWR, de la dilución obtenida se tomaron 200 µL y se mezclaron con 200 µL de buffer de muestra. Finalmente, la muestra se calentó a 80 °C durante 10 minutos utilizando un termostato Esco

##### **- Separación electroforética**

Se prepararon geles de 1 mm de espesor. El gel separador fue preparado al 12% de acrilamida. Una vez gelificado se procedió a colocar la solución de acrilamida al 4% para generar el gel concentrador. Seguidamente se colocó el peine para generar los pocillos. Una vez gelificado el gel se trasladó a la cámara



electroforética para colocar 10  $\mu$ L de la muestra y 10  $\mu$ L del estándar. La cámara fue llenada con la solución del buffer running, la separación electroforética se dió bajo la consideración de los parámetros de voltaje y tiempo mencionados anteriormente así como las condiciones en las cuales el gel debe permanecer.

### **3.2.6.2. Aplicación de la técnica analítica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE)**

Debido a la complejidad de los aislados y concentrados proteicos obtenidos de sachá inchi, la muestra fue analizada mediante la técnica de electroforesis bidimensional, la misma que permitió identificar isoformas de las proteínas a través de su punto isoeléctrico y peso molecular, siguiendo el método descrito por **(O'Farrell, 1975)**. Para ello, las tiras fueron equilibradas durante 16 horas en buffer comercial de Bio-Rad, al día siguiente se cargó la muestra de proteína aislada a pH 4,0 sobre la tira la misma que fue sometida a un campo eléctrico con un gradiente de voltaje 0–20 000 V durante 8 horas. Posteriormente, las tiras fueron puestas en la parte superior de un gel de poliacrilamida al 12% y fue separada por su peso molecular a 200 V durante 30 minutos.

### **3.2.7. Evaluación de las actividades biológicas**

#### **3.2.7.1. Actividad antiinflamatoria *in vitro***

La actividad antiinflamatoria de las proteínas de sachá inchi fueron evaluadas por el método de desnaturalización de proteína (albúmina de huevo), descrito por **Padmanabhan (2012)** con modificaciones. Se empleó un fármaco antiinflamatorio (diclofenaco de sodio) a dos concentraciones (100 y 200  $\mu$ g/mL) como modelo estándar para calcular la actividad. Las muestras se prepararon a diferentes concentraciones de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 (100, 200, 500 y 1.000  $\mu$ g/mL), se mezclaron 2 mL de la muestra con 2,8 mL de solución tampón fosfato ajustado a pH 6,4 y 2 mL de albúmina de huevo, esta

mezcla se llevó a incubación manteniendo la temperatura a 27 °C durante 15 minutos, para este proceso se empleó una incubadora VWR. La reacción de desnaturalización de la proteína se dio al someter la muestra a baño maria (70 °C por 10 minutos). Se utilizó el espectrofotómetro marca para medir la absorbancia de las muestras, usando una longitud de onda de 660 nanómetros. El porcentaje de inhibición de la proteína desnaturalizada fue calculada por la siguiente ecuación.

$$\%inhibición = \frac{At - Ac}{Ac} \times 100$$

**Ec. 1**

**Dónde:**  $A_t$  = Absorbancia de la muestra

$A_c$  = Absorbancia del control

Los resultados fueron analizados con un análisis estadístico de la tabla ANOVA y la aplicación del test tukey, empleando un nivel de significancia  $P < 0,05$ . Además se trabajó con tres réplicas por cada muestra de proteína liofilizada y patrón.

### **3.2.7.2. Citotoxicidad *in vivo* mediante el modelo pez cebra (*Danio rerio*)**

Las muestras de proteína de sachá inchi fueron sometidas a un estudio de citotoxicidad usando el ensayo OECD draft guideline on Fish Embryo Toxicity (FET) Test (OECD, 2012).

Peces cebra de la cepa AB (especie salvaje) fueron criados en un sistema de circulación de acuario. Peces cebra adultos se alimentaron a temperatura constante (26 °C) y fotoperíodo (16 horas luz: 8 horas oscuridad). Los machos y las hembras, en la proporción de 1:1, se colocaron en una caja de cultivo por separado con un plástico separador durante la noche del día anterior de la prueba. Al día siguiente, el apareamiento, desove y la fertilización se llevaron a

cabos dentro de 30 minutos después de que se retira el plástico separador. Los huevos recogidos se transfirieron a cajas de petri con una pipeta pasteur. Los huevos fertilizados en las etapas de cuatro a ocho células se colocaron en placas de 24 pocillos; cada pocillo contenía 2 mL de medio de ensayo con las muestra de proteína de sachá inchi aislada a pH 4 y 1 embrión por pocillo. Los huevos fueron incubados durante 24 horas, pasado este tiempo se evaluó la supervivencia de los embriones. Las concentraciones ensayadas para la muestra de sachá inchi fueron 5; 2,5; 1,25 y 0,625 mg/mL. Se tomaron imágenes de los embriones con la ayuda del estereoscopio de la marca Moticom con una cámara digital Moticom (5 MP), el aumento utilizado en la observación y captura de las imágenes fue de 40X, permitiendo obtener registros y evaluaciones de los efectos morfológicos que causan las muestras sobre la anatomía del embrión y comparar estos efectos con los controles (peces con agua destilada) **(Nagel, 2002; Spitsbergen y Kent, 2003)**.

## 4. CAPÍTULO

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

##### 4.1.1. Análisis proximal de la torta de sachá inchi

Los resultados de la composición proximal de la torta de sachá inchi en base seca, muestra como componente mayoritario el contenido de proteína y una fracción lipídica insignificante. La tabla 6 reportó que la torta de sachá inchi posee 57,6% de proteína y 11,2% de grasa lo que significa que puede constituir una excelente alternativa a la torta de soya. La composición proximal de la torta de sachá inchi se debe a las diferencias varietales y endofoclimáticas de la muestra de estudio, así como al procesado de la materia prima.

**Tabla 6.** Análisis proximal de la torta de sachá inchi

Ensayo	Porcentaje (%)
Proteína	57,60 ± 0,10
Grasa	11,20 ± 0,01
Humedad	4,08 ± 0,03
Fibra cruda	5,72 ± 0,10
Cenizas	5,78 ± 0,20
Carbohidratos	15,62 ± 0,20

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

**Fuente:** Laboratorio de control y análisis de alimentos (LACONAL) FCIAL-UTA.

Resultados reportados por **Pascual et al (2000)** determinaron un 59,13% de proteína, **Hurtado (2013)** obtuvo un valor de 51,23%, de igual manera **Ruiz et al (2013)** determinaron un 59% de la fracción proteica, al comparar los valores obtenidos de proteína en el presente estudio con respecto a los obtenidos bibliográficamente se confirma el alto contenido de proteína en la torta de sachá

inchi. Por otra parte, **Ruiz et al (2013)** reportaron valores de 4,8% para cenizas y 4,5% para fibra, al comparar con los valores reportados (tabla 6), se deduce una semejanza significativa. Sin embargo, los datos obtenidos permiten inducir que la composición proximal de la torta de sachu inchi se ven influenciados por parámetros como: condiciones endofoclimáticas, épocas de cosecha, condiciones de prensado, entre otras.

#### **4.1.2. Aislados y concentrados proteicos de la torta de sachu inchi**

Una vez que se obtuvieron los aislados y concentrados proteicos de sachu inchi por precipitación isoeléctrica, se determinó el porcentaje de rendimiento en la extracción. En la tabla 7, se observa los valores de porcentajes de rendimientos de cada una de las muestras, los aislados y concentrados proteicos obtenidos con agua y precipitados a diferentes pHs presentan diferencia estadísticamente significativa entre el pH 2,0 y pH 4,0; pH 3,0 y pH 4,0. Sin embargo, se optó por trabajar con el aislado precipitado a pH 4,0 donde la proteína no tiene carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico, por lo que no existe repulsión electrostática entre las moléculas de proteína vecinas y tendieron a precipitar, además el rendimiento y la concentración de proteína en este pH fue mayor a relación de los otros pHs ensayados.

Por otro lado, la proteína aislada con NaCl 1 M presentó diferencia significativa, ya que se logró obtener un rendimiento máximo por precipitación a pH 4,0 de 79,20% y un rendimiento mínimo a pH 6,0 de 11,54%. Por otro lado, las muestras aisladas con NaCl 1 M y posteriormente dializadas con la utilización de una membrana con poros de 5 000 Da, presentaron un porcentaje de rendimiento similar a los aislados y concentrados con el solvente agua tal como indica la tabla 7, si se relaciona los porcentajes obtenidos a los diferentes pHs de precipitación, no existe diferencia significativa entre las muestras excepto la del pH 6,0 que si tiene un rendimiento relativamente bajo.

**Tabla 7.** Determinación del porcentaje de rendimiento en los aislados y concentrados proteicos de sachá inchi a diferentes pHs.

Muestra	pH 2,0	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
Aislado con agua (%)	15,98 ± 0,03 <sup>c</sup>	16,33 ± 0,3 <sup>c</sup>	20,50 ± 0,35 <sup>a</sup>	18,42 ± 0,02 <sup>b</sup>	18,78 ± 0,47 <sup>b</sup>
Aislado con NaCl 1 M (%)	47,80 ± 0,18 <sup>b</sup>	48,05 ± 0,04 <sup>b</sup>	79,20 ± 0,69 <sup>a</sup>	45,11 ± 0,08 <sup>c</sup>	11,54 ± 0,06 <sup>d</sup>
Aislado dializado (%)	15,59 ± 0,14 <sup>c</sup>	17,99 ± 0,03 <sup>b</sup>	24,21 ± 0,48 <sup>a</sup>	13,20 ± 0,21 <sup>d</sup>	3,23 ± 0,24 <sup>e</sup>

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como P<0,05 usando un ANOVA y test tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

**Elaborado por:** Quinteros, MF. 2016

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

Resultados reportados por **Callisaya & Alvarado (2009)** determinaron que el rendimiento máximo de proteína en aislados de quinua se obtuvo al trabajar a un pH de 4,51, 3,02 y 5,52 sin tener mayor diferencia significativa, lo que permite establecer que los parámetros de pH empleados no influyeron significativamente en el rendimiento, sin embargo la apariencia física de la proteína cambia considerablemente.

Por otra parte, **Urrutia (2010)** mencionó que la extracción de proteína es directamente proporcional a la cantidad de solvente utilizado. Estudios realizados sobre el proceso de extracción de aislado proteico de la cañihua, utilizando una relación harina–solvente 1:20 permitieron obtener un 63,84% de proteína en el aislado (**Ramírez, 2004**). Al comparar este valor con el obtenido a pH 4,0 en el aislado de sachá inchi, se confirma que la cantidad de proteína extraída dependerá de la cantidad de solvente utilizado, puesto que durante la experimentación del presente estudio se empleó una relación de harina–solvente 1:3.

Sin embargo, no se pudo identificar claramente el punto isoeléctrico de precipitación de la proteína de sachá inchi debido a que la composición química de cada proteína es característica y presenta un número diferente de grupos ionizables que se neutralizan a diferente pH (**Segal & Ortega, 2005**). No existe un valor único de pH como punto isoeléctrico, ya que éste depende de la naturaleza de la proteína, es decir, de los aminoácidos y péptidos que la constituyen, al igual que de las interacciones que existan entre estas moléculas y el medio (**Serpa & Álvarez, 2014**).

Con la aplicación de un diseño experimental A\*B, cuyos factores de estudio fueron el tipo de solvente y pHs de precipitación respectivamente. Se obtuvo el mejor tratamiento basado en el porcentaje de rendimiento de concentrado/aislado. El mejor pH para obtener concentrados y aislados proteicos con agua fue el pH 4,0 (20,5%). El mejor pH para obtener concentrados y aislados proteicos con NaCl 1 M fue el pH 4,0 (79,2%). Éste alto rendimiento de proteína se debe a la acción del cloruro sódico en una solución de proteína, provocando un aumento de las interacciones hidrofóbicas en las macromoléculas favoreciendo su solubilidad, seguida de la agregación y precipitación de las proteínas (**Martínez et al., 2013**). Sin embargo, al poseer rendimientos de proteína considerables permite deducir que los métodos aplicados en la obtención de aislados y concentrados proteicos de sachá inchi fueron los adecuados.

#### **4.1.3. Cuantificación de las proteínas aisladas de sachá inchi por el método de Biuret y BCA**

Por otra parte, se determinó el contenido de proteína utilizando el método de Biuret, cuyos resultados registrados en la tabla 8 demuestran que se obtuvo un contenido alto de proteína a pH 4,0 con un 75,31%. Una alta concentración de proteína representa la presencia de compuestos formados por dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas, como los tripéptidos en adelante (**Cambell et al., 2006**).

**Tabla 8.** Determinación del porcentaje de concentración de la proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método de Biuret.

<b>Muestras</b>	<b>Concentración de proteína (%)</b>
pH 2,0	49,52 ± 4,55 <sup>c</sup>
pH 3,0	52,08 ± 1,54 <sup>c</sup>
pH 4,0	75,31 ± 1,95 <sup>b</sup>
pH 5,0	61,49 ± 0,14 <sup>b,c</sup>
pH 6,0	69,07 ± 2,26 <sup>a,b</sup>

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como  $P < 0,05$  usando un ANOVA y test tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

**Elaborado por:** Quinteros, MF. 2016

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

Además se demostró que el valor obtenido en la concentración de proteína y la observación de la intensidad de color durante la experimentación, fue proporcional al porcentaje de concentración de proteínas existente en el aislado de sachá inchi. La reacción al ser bastante específica y en este caso al ser positiva, permite deducir la inexistencia de azúcares reductores en el aislado proteico de sachá inchi (**Mendieta et al., 2014**).

El análisis de la concentración de proteína de sachá inchi en las muestras aisladas a pH 2,0; pH 3,0 y pH 5,0 no tienen diferencia significativa, al igual que los resultados a pH 4,0 y pH 6,0 que presentan valores de concentración casi similares. La turbidez observada empleando el método de Biuret es un inconveniente y puede limitar su aplicación **Mendes et al (2013)** lo que indica que el método tiene un rango de sensibilidad mínimo y no se podría tener reproducibilidad de datos.



**Tabla 9.** Determinación del porcentaje de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método BCA.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración de proteína (%)</b>
pH 2,0	62,80 ± 5,46 <sup>c</sup>
pH 3,0	84,10 ± 0,61 <sup>a,b</sup>
pH 4,0	93,10 ± 1,30 <sup>a</sup>
pH 5,0	83,60 ± 2,51 <sup>a,b</sup>
pH 6,0	70,40 ± 2,98 <sup>b,c</sup>

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como P<0,05 usando un ANOVA y test tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

**Elaborado por:** Quinteros, MF. 2016

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

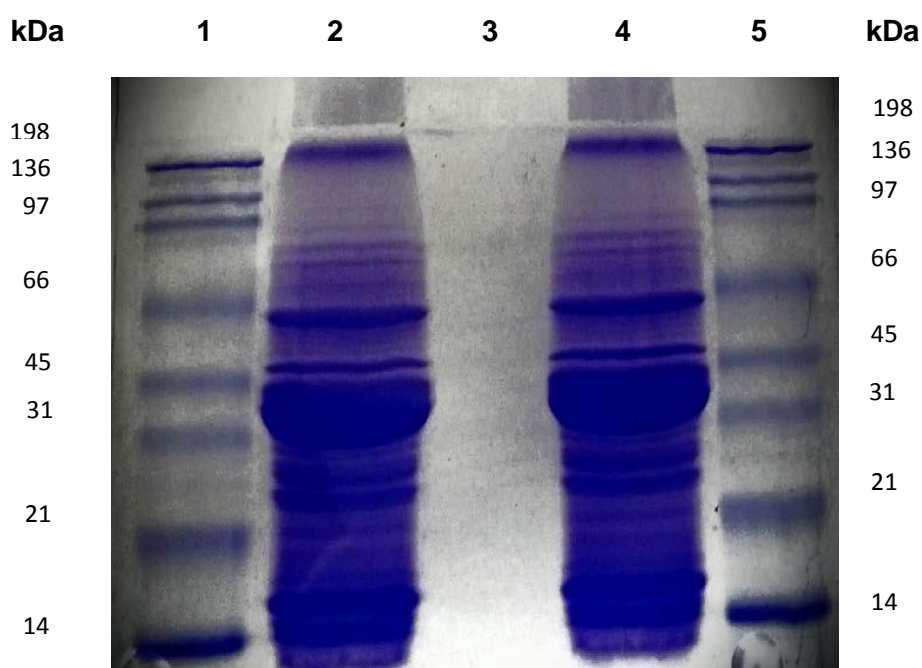
Para la determinación de la concentración de proteínas totales en una muestra se realizó una curva estándar, esto se logró con la aplicación de un ensayo de concentración creciente de proteína pura. Los cálculos realizados permitieron establecer el máximo de contenido de proteína a pH 4,0 con un 93,1% (tabla 9). Mediante el análisis de varianza de los resultados, se pudo determinar que el porcentaje de concentración de proteína a diferentes pHs presentan diferencia estadísticamente significativa, sin embargo a pH 3,0 y pH 5,0 la concentración de proteína es similar, reportando valores de 84,1% y 83,6% respectivamente. Este método también permite clasificar las muestras en aislados y concentrados proteicos, las muestras precipitadas a pH 2,0 y pH 6,0 se identifican como concentrados proteicos, mientras que las muestras precipitadas a pH 3,0; pH 4,0 y pH 5,0 corresponden a ser aislados proteicos.

**García & Vázquez (1998)** reportaron que la estructura macromolecular de la proteína y cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteína cuando son ensayadas con BCA lo que significa que el aislado proteico de sachá inchi contiene este tipo de péptidos. Los dos métodos espectrofotómetros de cuantificación de proteína arrojaron diferentes valores de proteína debido a las

características propias de la muestra, por lo que cada método tiende a identificar un enlace peptídico específico.

#### 4.1.4. Caracterización de la proteína mediante la aplicación de técnicas electroforéticas

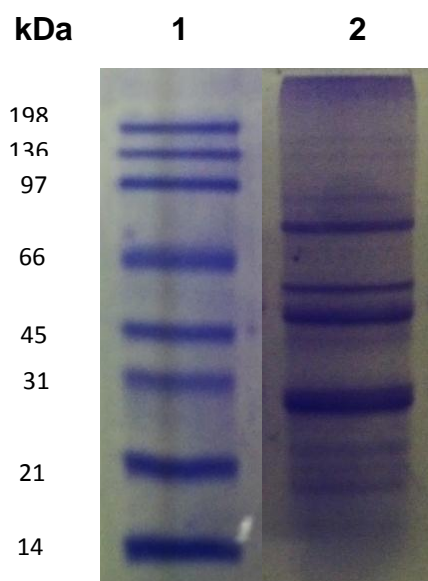
Los aislados proteicos de sachá inchi fueron analizados mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), el aislado de proteína a pH 4,0 fue analizado a una concentración de 40 mg/mL. Todas las bandas presentaron alta expresión y poca definición debido a la complejidad de la muestra (Figura 5).



**Figura 5.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2- $\beta$ -mercaptoetanol de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 y analizada a una concentración de 40 mg/mL. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: proteína aislada de sachá inchi a pH 4,0 (R1); pocillo 3: agua; pocillo 4: proteína aislada de sachá inchi a pH 4,0 (R2); pocillo 5: peso molecular.

Por esta razón fue necesario analizar los concentrados y aislados proteicos de sachá inchi a diferentes concentraciones para conocer la respuesta de separación de las proteínas en el equipo de electroforesis. Se ensayaron

distintas concentraciones de las muestras (20 mg/mL; 10 mg/mL; 5 mg/mL y 2,5 mg/mL). Se determinó que la concentración óptima de proteína fue de 10 mg/mL para cada pocillo. Ésta consideración se aplicó para todos los ensayos. Las bandas fueron observadas con suficiente resolución a la concentración final de 10 mg/mL (Figura 6). Por debajo de 2,5 mg/mL fue difícil visualizar las bandas usando azul de coomassie como solución de teñido.



**Figura 6.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 y analizada a la concentración de 10 mg/mL. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: muestra.

Por otro lado, las muestras aisladas de proteína a diferentes pHs también fueron analizadas por medio de la técnica de electroforesis en SDS-PAGE con 2-β mercaptoetanol. En la figura 7 se observa la presencia de bandas diferentes de proteínas en el gel. Estas bandas permiten deducir la existencia de proteínas solubles que se caracterizaron por presentar polipéptidos de peso molecular entre 16-70 kDa. Además, se pudo identificar la presencia de globulinas y albúminas tanto en los aislados con solventes de extracción agua y sal. **Sathe et al (2012)** encontraron que las proteínas de sachá inchi están compuestas de polipéptidos cuyo peso molecular están en un rango de 6–70 kDa.

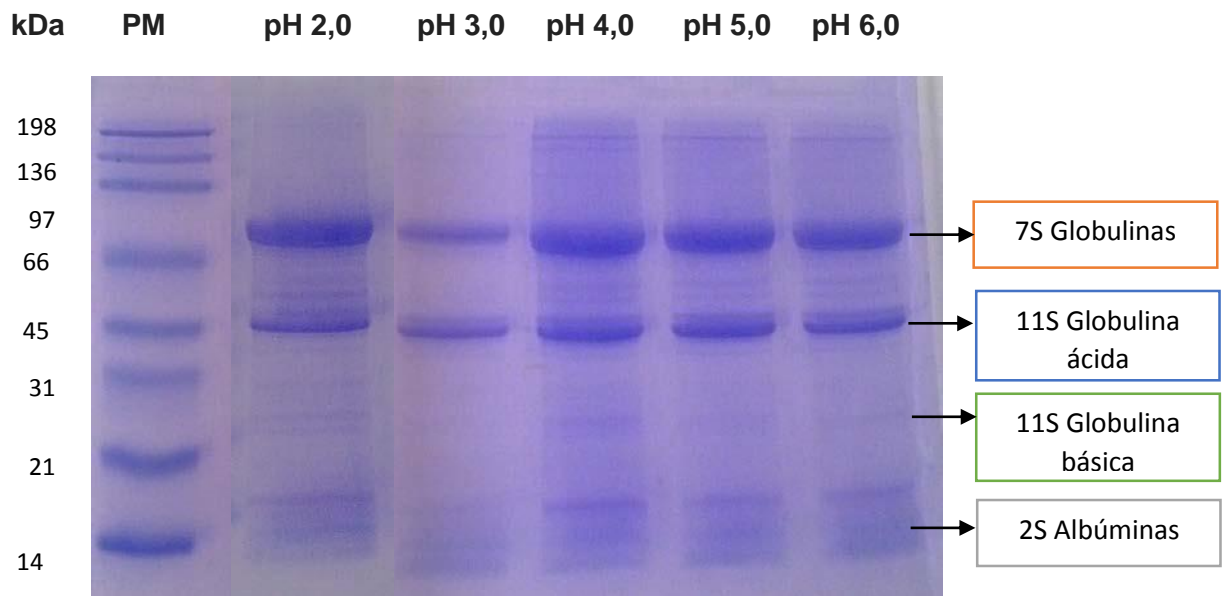
Estudios realizados sobre aislados de amaranto han determinado una cantidad importante de albúminas que se caracterizan por su solubilidad. Varios autores

coinciden que esta fracción está compuesta por polipéptidos de masa moleculares entre 10 a 40 kDa (**Gorinstein et al., 1991; Segura et al., 1992**).

Se sabe que las proteínas vegetales de leguminosas y no leguminosas tienen dos tipos de proteínas de reserva. Estas proteínas son llamadas 7S y 11S globulinas dependiendo del coeficiente de sedimentación. La fracción 11S contiene por lo general una fracción ácida (29-35 kDa) y una fracción básica (18-28 kDa), mientras que las 7S globulinas pertenecen al grupo de las glicoproteínas con pesos moleculares entre 150 hasta 200 kDa, estos pesos moleculares varían dependiendo del tipo de planta (**Romero & Paredes, 1996**).

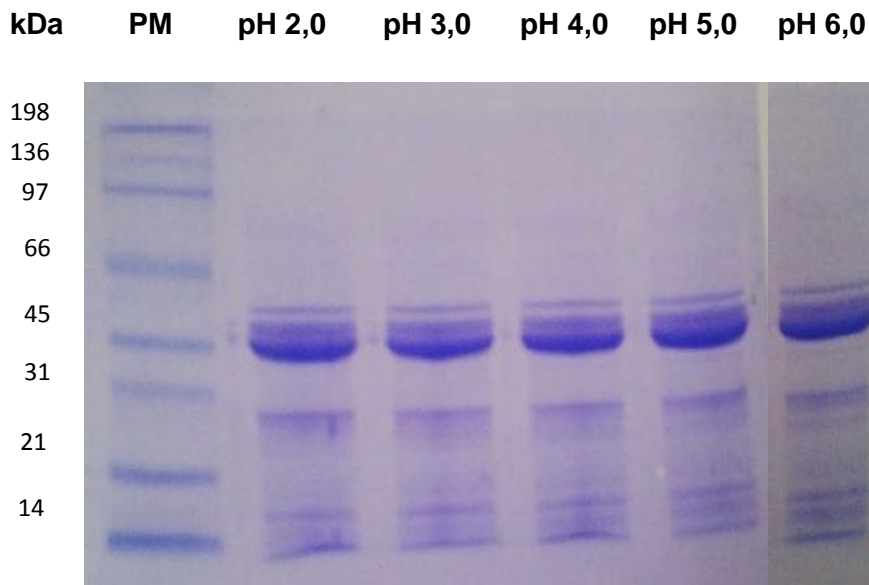
La presencia de 11S y 7S globulinas de tipo almacenamiento en las semillas de angiospermas han sido reconocidas y aceptadas (**Wolf, 1980; Srivastava & Bijoy, 2013**). Las 2S albúminas son características en diferentes proteínas vegetales, como en el caso de amaranto, quinua, semillas de altramuz, soja y sachá inchi, debido a que son considerados como alérgenos (**Czubinski, 2014; Brinegar & Nwokocha, 1996**).

En la figura 7 se observa la banda con 73 kDa que corresponde a la 7S globulina, por otro lado, la fracción 11S ácida fue identificada con la banda correspondiente al peso molecular de 45 kDa, esta banda fue identificada con alta expresión en todos los pHs ensayados. Pero la fracción 11S básica correspondiente a la banda con peso molecular de 25 kDa tiene baja expresión y por ello es difícil visualizar en el gel. Por último, se observó una banda con 16 kDa la misma que puede representar una prolamina de la familia de las albúminas. Según **Abugoch (2006)** establece que las prolaminas están compuestas por polipéptidos de baja masa molecular comprendidos entre 10–22 kDa.



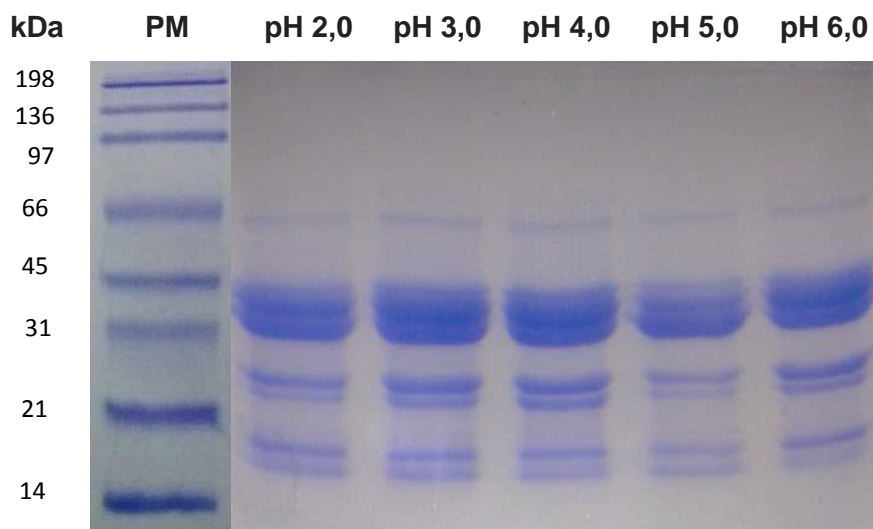
**Figura 7.** Técnica de Electroforesis SDS-PAGE con el análisis 2- $\beta$ -mercaptoetanol de aislados de proteína de sachá inchi a diferentes pHs.

En la figura 8 se observa concentrados de proteínas de sachá inchi analizados mediante el uso de electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. En esta figura se puede observar que el perfil de las proteínas ha cambiado al compararlo con el análisis en presencia del agente reductor 2- $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 7). Para el análisis de la proteína aislada con agua, esta figura muestra un polipéptido de peso molecular de 45 kDa con una alta expresión, además esta banda se encuentra presente en todos los pHs ensayados.



**Figura 8.-** Técnica de electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-β- mercaptoetanol en el análisis de aislados de proteína de sachá inchi a diferentes pHs.

Se obtuvieron concentrados y aislados proteicos a partir de la torta de sachá inchi usando cloruro de sodio (NaCl 1 M) como solvente a diferentes pHs. Todas estas muestras fueron analizadas mediante el uso de electroforesis SDS-PAGE. La banda de 45 kDa tiene una alta expresión ya que se observó un ancho de banda altamente formado por dímeros con pesos moleculares muy similares (figura 9). A esta banda de peso molecular de 45 kDa se le denomina 11S globulina ácida.

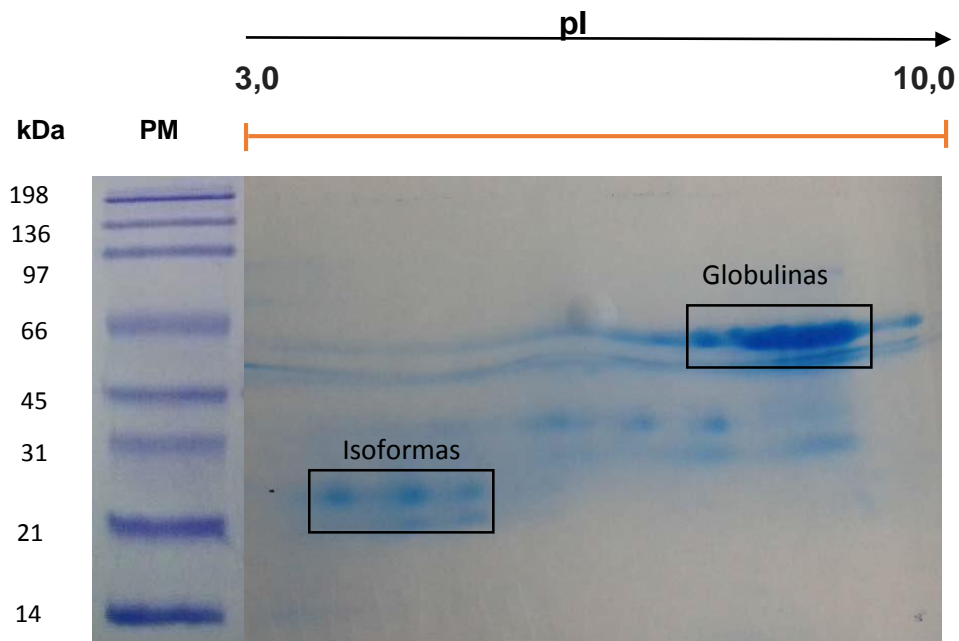


**Figura 9.** Técnica de electroforesis SDS -PAGE con presencia de 2-β -mercaptoetanol en el análisis de aislado de proteína de sachá inchi a diferentes pHs con el disolvente NaCl 1 M.

Para caracterizar mejor las proteínas obtenidas de la torta de sachá inchi, los aislados proteicos fueron analizados mediante el uso de la técnica analítica de electroforesis bidimensional 2D-SDS-PAGE. Dicha técnica permite caracterizar las proteínas por su punto isoeléctrico, leyendo el gel de izquierda a derecha guiándose por el rango de pH que va de 3,0 a 10,0 y con su peso molecular leyendo el gel de arriba hacia abajo, comparando siempre la muestra con el estándar de proteínas empleado (figura 10).

Los resultados obtenidos en el gel, indican la presencia de globulinas que se encuentran aproximadamente en un peso molecular de 66 kDa, siendo su punto isoeléctrico a un pH entre 8,0 y 9,0. Por otro lado, se pueden observar isoformas en la figura, las mismas que se encuentran presentes en un rango de pH de 4,0-4,5 y presentando un peso molecular alrededor de 25 kDa.

..



**Figura 10.** Técnica de electroforesis 2D SDS -PAGE de proteína de sachá inchi a pH 4,0.

La caracterización de las proteínas mediante el empleo de la electroforesis en una dimensión (1D) permite distinguir las proteínas por diferencia en su peso

molecular. En este sentido, se debe tener en cuenta que un extracto, muchas proteínas pueden tener peso molecular idéntico o similar, por lo que la resolución de proceso limitada (**Witting & Schagger, 2008**).

Con la electroforesis 2D se llega a solucionar el problema de la limitada resolución de la electroforesis 1D. En razón a que las proteínas son separadas basadas en dos propiedades: su peso molecular (PM) y su punto isoeléctrico (pI). La combinación de las propiedades amplifica la capacidad de resolución del procedimiento. La principal aplicación de la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es resolver o diferenciar proteínas de la misma talla o peso, por los que se convierte en la herramienta más empleada en el análisis y separación de los componentes de la proteína. Con la "2D-PAGE" se pueden resolver cientos o miles de puntos (*spots*) de proteína en un solo gel (**Simula et al., 2012**).

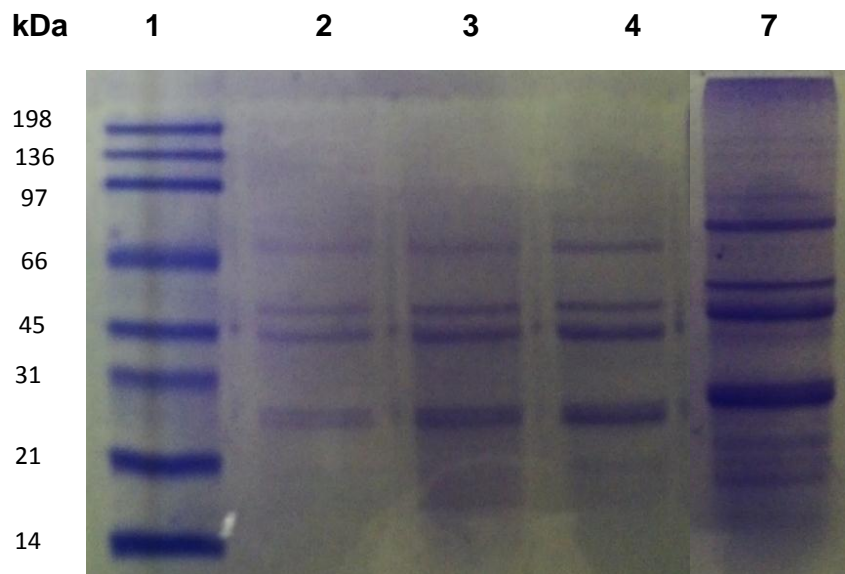
#### **4.1.5 Hidrolizados de sachá inchi llevados a digestión gástrica y duodenal *in vitro*, analizados por la técnica de electroforesis (SDS-PAGE)**

Las proteínas obtenidas de la torta de sachá inchi a pH 4,0 de precipitación fueron sometidas a un proceso de digestión *in vitro* simulando las condiciones fisiológicas humanas (enzimas, temperatura, relación enzima/sustrato, movimiento, sales biliares, etc). Para ello, las muestras fueron sometidas a una fase que simuló la digestión gástrica con pepsina (172 U/mg) incubándolo durante 120 minutos a 37 °C en agitación constante a diferentes pHs (1,2, 2,0 y 3,2). Dichos digeridos demostraron que las proteínas fueron resistentes a la digestión gástrica con pepsina usando baja concentración de enzima (172 U/mg). Las proteínas 7S y 11S globulinas así como las 2S albúmina fueron resistentes a la hidrólisis con pepsina (figura 11). Por esta razón, se decidió ensayar a una concentración mayor de pepsina (2 000 U/mg). Durante este proceso se determinó que 11S globulinas ácidas muestran una notable estabilidad a la hidrólisis con pepsina, mientras que 7S globulinas y 2S albúminas fueron susceptibles al proceso hidrolítico (Figura 12).

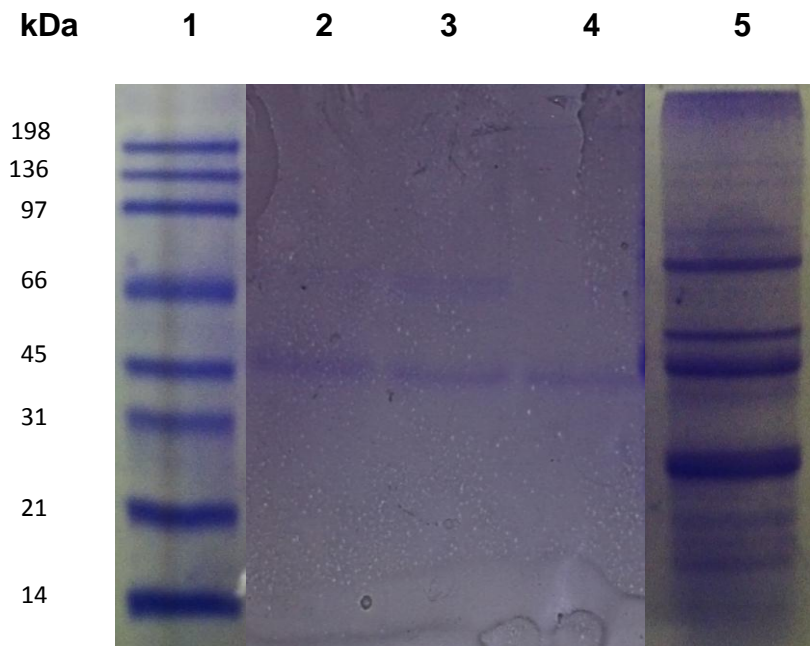


Un gran número de alérgenos alimenticios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre estas proteínas no hay características comunes, aunque se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesado sobre todo al tratamiento térmico. Muchas proteínas vegetales son alérgenos reconocidos, un claro ejemplo son las 2S albúminas de cacahuates, maníes, nueces, sésamo, etc (Carrillo, 2014).

Según Acuña & Caiza (2010), indicaron la determinación de los pesos moleculares de las proteínas del hidrolizado de chocho por electroforesis, demostrando la presencia de bandas proteicas con pesos moleculares que van desde 93,30 a 14,35 kDa comprobando que la hidrolisis de la proteína no se desarrolló por completo como en el caso del hidrolizado de sachá inchi.



**Figura 11.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-Mercaptoetanol de proteínas de sachá inchi e hidrolizados con pepsina relación enzima/sustrato 1/20 (172 U/mg). Pocillo 1: estándar de pesos moleculares, pocillo 2: hidrolizado de sachá inchi a pH 1,2, pocillo 3: hidrolizado de sachá inchi a pH 2,0, pocillo 4: hidrolizado de sachá inchi a pH 3,2, pocillo 5: aislado de sachá Inchi a pH 4,0

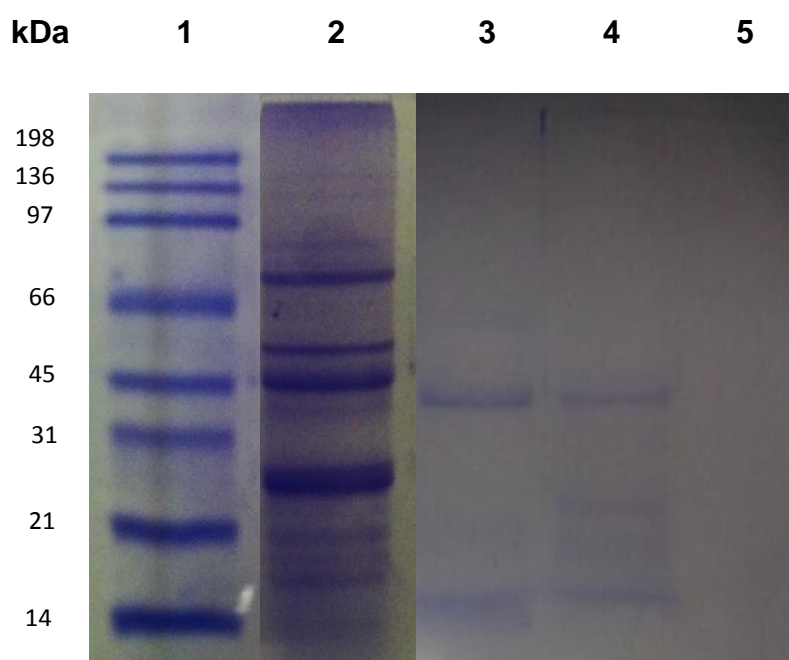


**Figura 12.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-Mercaptoetanol de proteínas de sachá inchi e hidrolizados con pepsina (2.000 U/mg). Pocillo 1: estándar de pesos moleculares, pocillo 2: hidrolizado de sachá inchi a pH 1,2, pocillo 3: hidrolizado de sachá inchi a pH 2,0, pocillo 4: hidrolizado de sachá inchi a pH 3,2, pocillo 5: aislado de sachá Inchi a pH 4,0.

El modelo de digestión duodenal se ensayó en dos etapas. La primera etapa se empleó la digestión gástrica con pepsina a 2.000 U/mg de proteína llevada a pH 3,2 durante 120 minutos a 37 °C. La segunda etapa se realizó mediante la adición de una solución de pancreatina a pH 7,0 durante 120 minutos a 37 °C. Los digeridos duodenales se analizaron por la técnica de electroforesis SDS-PAGE, donde se observó que 11S globulinas ácidas siguen siendo resistentes a la digestión proteolítica con pepsina y con la mezcla de pepsina y pancreatina. La identificación de estas bandas permiten creer que la proteína de sachá inchi podría ser un alérgeno (Figura 13).

Un gran número de alérgenos alimenticios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo* (Carrillo, 2014). Entre estas proteínas no existen características comunes, no obstante se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a tratamientos térmicos de procesado (Wickham et al., 2009). Razón por la cual la proteína de sachá inchi podrá formar parte de las proteínas alérgenas.

La fracción de proteína de alimentos de origen vegetal con un alto contenido de cisteína, según la clasificación Osborne, ha encontrado que son bastante resistentes a la desnaturalización por calor y digestión proteolítica, estabilidad que es conferida por la presencia de un alto número de enlaces disulfuro contenido en proteínas de bajo peso molecular, tales como BBI que son sustancias que interfieren en la utilización digestiva o metabólica de las proteínas (Faris et al., 2008; Carbonaro et al., 2015). A diferencia del inhibidor Kunitz de tripsina estrechamente relacionada, soja BBI es una pequeña molécula de 8 kDa y siete puentes disulfuro. Otros inhibidores muy estables y altamente activos de la clase BBI recientemente han sido aislados a partir de lenteja (*Lens culinaris L.*) y semillas de guisante (*Pisum sativum L.*) (Lee et al., 2007).



**Figura 13.** Técnica de electroforesis SDS-PAGE con 2-β-Mercaptoetanol de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0. Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: Aislado puro; pocillo 3: digerido gástrico; pocillo 4: digerido duodenal (hidrolizado con pepsina y pancreatina a pH 7); pocillo 5: agua.

#### 4.1.6 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* en los aislados y concentrados proteicos de sachá inchi

El efecto inhibitor del concentrado de sachá inchi obtenido a pH 4,0 fue determinado usando el método de desnaturalización de albúmina de huevo (Tabla 10). La actividad antiinflamatoria *in vitro* del aislado de sachá inchi fue siempre comparado con el diclofenaco de sodio, un fármaco antiinflamatorio ampliamente utilizado en medicina para tratar diferentes dolencias. En este trabajo se determinó que a la concentración de 200 µg/mL el porcentaje de inhibición para el control positivo (diclofenaco de sodio) fue de 76,20%. Mientras que en el aislado de sachá inchi ensayado a la concentración de 1000 µg/mL presentó un porcentaje de inhibición de 78,13% ± 0,32, observándose una ligera diferencia. La relación de concentración ensayada de proteína con respecto al porcentaje de inhibición es directamente. Al analizar mediante ANOVA y el test tukey se observó que no existe diferencia estadística a (P<0,05).

**Tabla 10.** Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* del aislado de la proteína de sachá inchi a pH 4,0.

Muestra	Concentración (µg/mL)	% de Inhibición
Diclofenaco de sodio	100	72,69 ± 0,04 <sup>a</sup>
	200	76,20 ± 1,83 <sup>a</sup>
Proteína de Sachá inchi	100	7,77 ± 0,28 <sup>d</sup>
	200	9,27 ± 0,25 <sup>c</sup>
	500	18,94 ± 0,77 <sup>b</sup>
	1000	78,13 ± 0,32 <sup>a</sup>

Cada valor representa la media ± de la desviación estándar (SD). Las diferencias estadísticas fueron expresadas como P<0,05 usando un ANOVA y test tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

**Elaborado por:** Quinteros, M.F 2016

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

**Fatma et al (2014)** han reportado el % de inhibición del diclofenaco de sodio a concentración de 200 µg/mL un valor de 120,12 %, al comparar este resultado con el obtenido en el estudio que fue 76,20 %, permite establecer una diferencia significativa son respecto a su principio activo. Esto podría deberse a que el diclofenaco ensayado no es un estándar puro, debido a que se utilizó una tableta farmacéutica distribuida en Ecuador.

En los últimos 10 años se ha reportado varios estudios sobre la actividad antiinflamatoria de productos naturales y plantas medicinales como: crotón malambo, cúrcuma, extractos de semillas y frutas. **Howell et al (2006)** demostraron que el extracto de jengibre presenta efectos analgésicos y antiinflamatorios significativos. Por otra parte, **Akmedir et al (2010)** encontraron que en el compuesto aislado de (*Verbascum macrocarpum B.*) posee una actividad significativa en la curación de heridas y presenta efectos anticonceptivo y antiinflamatorios, por vía oral, sin provocar ningún tipo de toxicidad aguda.

Otras sustancias de naturaleza flavonoide han mostrado tener importante actividad antiinflamatoria *in vitro*, como el caso de geraniina y corilagina, dos flavonoides aislados del extracto de té verde (**Bhattaram et al., 2002**). Ensayos realizados sobre los fitocompuestos, específicamente flavonoides en sachá inchi (*Plukenetia volubilis. L*) corroboraron a través de ensayos cromatográficos la presencia de flavonoides (**Murillo et al., 2011**). Diversas investigaciones se han realizado para probar los efectos de estos constituyentes como antiinflamatorios, antivirales y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (**Ortiz et al., 2009; Shyur et al., 2008**), lo cual induce a interpretar que las proteínas de sachá inchi poseen cierto contenido de flavonoides, responsables de la actividad antiinflamatoria.

#### 4.1.7 Evaluación de la citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi en el modelo pez cebra (*Danio rerio*)

La citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi fue determinada en larvas de cinco días post-fecundación del pez cebra (*Danio rerio*). Para ello, se ensayaron diferentes concentraciones del aislado de sachá inchi durante 24 horas. Las larvas fueron analizadas morfológicamente con un estereomicroscopio de la marca Motic y se determinó la supervivencia de las mismas. El modelo del pez cebra es ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad de compuestos químicos y nuevas drogas del mercado.

Las larvas del pez cebra tratadas con proteínas de sachá inchi y observadas después de 24 horas no mostraron anomalías en la morfología de su cuerpo, tal como se observa en la figura 14. La muestra al comparar con el control no exhibe ningún efecto significativo durante el crecimiento del cuerpo de las mismas. Ninguna larva de *Danio rerio* murieron durante el ensayo.



**Figura 14.** Morfología de la larva del pez cebra observada a las 24 horas de desarrollo en presencia de su medio natural y proteína de sachá inchi. A: control; B: Muestra

Por otro lado, también se evaluó la citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi en huevos fecundados de pez cebra. Una vez comprobado con la ayuda del esteromicroscopio que los huevos estaban fecundados, éstos fueron incubados en placas multipocillos con diferentes concentraciones del aislado proteico de sachá inchi. Durante el ensayo no se observaron anomalías morfológicas el desarrollo de los embriones, no hubo coagulación de los huevos, ni perturbación en la membrana protectora (cortón). El crecimiento de los embriones fue igual a los embriones sin muestras. Finalmente, a las 96 horas eclosionaron los huevos dando como resultados larvas de pez cebra con sus respectivas características morfológicas de movilidad, latido de corazón, etc.

Los resultados obtenidos de la evaluación en la citotoxicidad de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4 en los huevos del pez cebra, cuando fueron tratados a diferentes concentraciones de proteína, no presentaron efectos significantes, la tabla 11 muestra que tanto el control como las muestras estudiadas dieron resultados positivos, lo que significa que las proteínas de sachá inchi no son tóxicas debido a que durante su evaluación no se observó anomalías morfológicas, coagulación de los huevos, falta de desarrollo en su cuerpo, etc. El crecimiento de los embriones fue totalmente normal.

**Tabla 11.** Evaluación de la citotoxicidad de la proteína de sachá inchi *in vivo* aislada a pH 4,0.

<b>Concentraciones (mg/mL)</b>	<b>5000</b>	<b>2500</b>	<b>1250</b>	<b>625</b>
<b>Control</b>	-	-	-	-
<b>Proteína de sachá inchi</b>	-	-	-	-

**Elaborado por:** Quinteros, M.F 2016

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

#### **4.2. Verificación de la hipótesis**

- a)** Las proteínas 7S y 2S extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) son digeribles en el organismo humano, mientras que las 11S son resistente al proceso de digestión gastrointestinal.
  
- b)** Las proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) no presentan citotoxicidad en el modelo pez cebra.
  
- c)** Las proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) poseen una fuerte actividad antiinflamatoria.



## 5. CAPÍTULO

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Se estudió la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de las proteínas de la torta de sachá inchi, cuyos resultados determinaron la presencia de las 11S globulinas que fueron resistentes a la digestibilidad gastrointestinal, mientras que, la 7S globulina y 2S albúmina de sachá inchi fueron susceptibles a la hidrólisis gástrica y duodenal. La proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 no es tóxica y presentó una fuerte actividad antiinflamatoria.
- Fue posible obtener aislados de proteínas de la torta de sachá inchi con disolventes como agua y NaCl 1 M con altos rendimientos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas importantes en los rendimientos al utilizar ambos disolventes.
- Se caracterizó las proteínas de sachá inchi mediante la aplicación de técnicas electroforéticas, la electroforesis tradicional dió como resultado la presencia de 2S albúminas con un peso molecular de 16 kDa, 7S globulinas de 73 kDa, una fracción 11S globulina ácida de 45 kDa y 11S globulina básica con un peso molecular de 25 kDa. Por otro lado, la electroforesis 2D indicó que el aislado proteico tiene proteínas con isoformas.
- Se evaluó la citotoxicidad de la proteína de sachá inchi en el modelo pez cebra (*Danio rerio*) lo cual indica que éstas no son tóxicas.
- Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro* de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 dando como resultado un alto porcentaje de inhibición a concentración de 1000 µg/mL (78,13 %).

## 5.2 Recomendaciones

- ❖ En este estudio la proteína fue solubilizada a pH 8,0 por lo tanto se recomienda realizar ensayos con pHs superiores a éste, para determinar el pH óptimo de solubilización de las proteínas presentes en la torta de sachá inchi
- ❖ Se recomienda desengrasar la torta de sachá inchi antes de proceder a aislar la proteína con solventes como agua y NaCl 1 M, para este proceso de desengrasado se puede utilizar hexano, cloroformo, acetona, etc.
- ❖ Se recomienda realizar el estudio de citotoxicidad de las proteínas de sachá inchi en otros modelos *in vivo* para sustentar los resultados obtenidos en esta investigación.
- ❖ Se considera ampliar la investigación de este estudio en cuanto a los hidrolizados obtenidos mediante la digestión gástrica y duodenal para determinar el grado de alergenicidad, citotoxicidad y actividades biológicas con la finalidad de ser comparados con los resultados obtenidos en los aislados proteicos
- ❖ Se recomienda desarrollar un nuevo producto incorporando los aislados proteicos de la torta de sachá inchi, mejorando su valor nutricional y funcional debido a que en este estudio se determinó que las proteínas de esta oleaginosa poseen actividad antiinflamatoria.
- ❖ Se recomienda aplicar el test de Elisa a los aislados proteicos sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* para confirmar la alergenicidad que podrían presentar las proteínas resistentes a las enzimas digestivas.

## Referencias bibliográficas

1. Abugoch, L. (2006). *Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (Amaranthus hypochondriacus)*. Universidad Nacional de La Plata. La Plata
2. Acuña, O & Caiza, J. (2010). Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. *Revista Politécnica*, 29:70-77
3. Akdemir, Z.; Kahraman, C.; Tatl, I.; Akkol, E.; Süntar, I.; Keles, H. (2010). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. *Journal Ethnopharmacol*, 2:184-191
4. Amir, M.; Javed, S.; Kumar, H. (2010). Design and synthesis of 3-[3-(substituted phenyl)-4-piperidin-1-ylmethyl]-4-morpholin-4-ylmethyl-4,5-dihydro-isoxazol-5-yl]-1H indoles as potent antiinflammatory agents. *Medicinal Chemistry Research*, 19:299-310
5. AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis*, 19<sup>th</sup> Edition. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
6. Arana, J. (2010). *Monografía del cultivo de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Lima-Perú.
7. Ashley, N.; Weil, Z.; Nelson, R. (2012). Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 43:385-406.
8. Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Pearson Educación, México. Pp 116; 117; 565; 566; 579
9. Barrio, D.; Avila, A.; Solimano, P.; Piñuel, L.; Boeri, P.; Zubillaga, F.; Cantoni, G. (2015). El pez cebra (*Danio rerio*) como un sistema modelo para la valoración biológica de las toxinas producidas por la marea roja. *Senasa*, 8:1-9
10. Bhattaram, V.; Graefe, U.; Kohlert, C.; Veit, M.; Derendorf, H. (2002). Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine*, 9:1-33

11. Betancourth, C. (2013). *Aprovechamiento de la torta residual de sachu inchi (Plukenetia volubilis Linneo) mediante extracción por solventes de su aceite*. Manizales-Colombia. Pp 5
12. Brinegar, C.; Sine, B.; Nwokocha, L. (1996). High-Cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44:1621–1623
13. Budd, T.; Kuo, C.; Cazin, J.; Yoo, T. (1983). Allergens of *Altenaria*: further characterization of a basic allergen fraction. *International Archives of Allergy Applications Immunology*, 71:83-87.
14. Burks, A. & Sampson, H. (1997). *Anaphylaxis and food allergy*. In: *Metcalf, D.D., Sampson, H.A., Simon, R.A. (Eds.), Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*. Blackwell Science, Cambridge. Pp 25–245
15. Byong, H. (2000). *Fundamentos de la biotecnología en alimentos*. 1era Edición, Editorial Acribia. S.A, Zaragoza- España. Pp 26-25
16. Callisaya, J. & Alvarado, J. (2009). Aislados proteínicos de granos alto andinos Chenopodiaceas; quinua (*Chenopodium quinoa*) – Cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) por precipitación isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26:1-10
17. Cambell, P.; Smith, A.; Peters, T. (2006). *Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. Masson, España. Pp 33-35
18. Caprette, D. (2015). *Experimental Biosciences*. Houston, EU. Pp 40-41
19. Carretero, M. (2003). Medicamentos de Vanguardia. *OFFARM*, 22:168-170
20. Carbonaro, M.; Maselli, P.; Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76:19-30
21. Carrillo, W. (2010). *Actividades biológicas de la lisozima de huevo y proteínas lácteas modificadas utilizando distintos procesos tecnológicos*. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de ciencias, Departamento de Química-Física aplicada. Madrid. Pp 66-69
22. Carrillo, J.; Candia, M.; Lugo, R.; Espinoza, E.; Noriega, J. (2013). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*, 8:19-26

23. Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 2:109-122
24. Carrillo, W.; García, A.; Recio, I.; Moreno, M. (2014). Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 77:1732-1739
25. Codex Alimentarius. (1995). Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Cereales, legumbres, leguminosas, productos derivados y proteínas vegetales. Segunda edición. Vol 7. Roma. Pp 127-128
26. Coronado, M.; Vega, S.; Gutiérrez, R.; García, B.; Díaz, G. (2006). Los ácidos grasos omega-3 y omega-6. *Nutrición, bioquímica y salud*, 25:72-79
27. Czubinski, J.; Dwiecki, K.; Siger, A.; Neunert, G.; Lampart, E. (2014). Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. *Food Chemistry*, 143:418-426
28. Dostert, N.; Roque, J.; Brokamp, G.; Cano, A.; La Torre, M.; Weigend, M. (2009). *Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos: Hojas Botánicas: Sacha inchi – Plukenetia volubilis L.* Primera Edición. Lima- Perú. Pp. 3
29. FAO Statistical Yearbook (2010). Food and Agricultural Organization, FAOSTAT, Table D.2. Accessed January 14, 2012
30. Faris, R.; Wang, H.; Wang, T. (2008). Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bonds with thioredoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:7146–7150.
31. Fatma, A.; Sokindra, K.; Shah, A. (2013). Estimation of total phenolic content, in- vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleífera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 3:623-627
32. Fatma, A.; Sokindra, K.; Shah, A. (2013). Determination of total phenol, in- vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Zizyphus spina-christi* grown in Oman. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 3:623-627

33. Follegatti, P. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Journal of Supercritical Fluids*, 49:323-329.
34. Fu, T.; Abbott, U.; Hatzons, C. (2002). Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid- A comparative study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:7154-7160.
35. García, H. & Vázquez, R. (1998). *Cuantificación de proteínas: una revisión*. Instituto de Biotecnología UNAM. México. Pp 20-22
36. Gómez, J. (2005). *Monografía y cultivo de sachá inchi (Plukenetia volubilis): Oleaginosa promisoría para la diversificación productiva en el trópico*. (Corpoica-Pronatta, Ed.). Bogotá, Colombia. Pp 8
37. Gómez, H.; Gonzáles, K.; Medina, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10:182–217
38. Gorinstein, S.; Moshe, R.; Greene, L.; Arruda, P. (1991). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:851-854.
39. Guillaume, J.; Kaushik, S.; Bergot, P.; Métailler, R. (2004). *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*. Mundi-Prensa. Madrid. Pp 475
40. Gutiérrez, L. (2011). Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites*, 62:76-83.
41. Hazen & Stoewesand. (1980). *Resultados de análisis del aceite y proteína del cultivo de sachá inchi*. Universidad de Cornell. USA. Pp 3
42. Hemalatha, M.; Thirumalia, T.; Saranya, R.; Elumalai, E.; David, E. (2013). Rreview on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu. *Journal of Acute Disease*, 2:99-105
43. Hill, A.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity, *Toxicological Sciences*, 86:6-19.
44. Howell, L.; Kochhar, K.; Saywell, R.; Zollinger, T.; Koehler, J.; Mandzuk, C.; Sutton, B.; Sevilla, J.; Allen, D. (2006). Use of herbal remedies by

- hispanic patients: Do they inform their physician. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 19:566-578
45. Huamán, J.; Chávez, K.; Castañeda, E.; Carranza, S.; Chávez, T.; Beltrán, Y. (2008). *Efecto de la Plukenetia volubilis Linneo (sacha inchi) en la trigliceridemia posprandial Anales de la Facultad de Medicina*. México. Pp 50
46. Hurtado, Z. (2013). *Análisis composicional de la torta de aceite de semillas de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis) cultivadas en Colombia*. Palmira-Colombia. Pp 26
47. INEN, 522. (1980). Harinas de origen vegetal; Determinación de la fibra cruda. Quito-Ecuador.
48. Jiménez, R.; Martos, G.; Carrillo, W.; López, R.; Molina, E. (2012). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127:1719-1726
49. Jurado, M.; Vázquez, C; López, E.; Patino, B.; Gonzales, M. (2004). *Analysis of the occurrence of Fusarium species in Spanish cereals by PCR assays. Proc. 2nc\* Int. Symp. On Fusarium Head Blight*. Orlando, FL (U.S.A.). Pp 460-464.
50. Kenna, J. & Evans, R. (2000). Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist*, 54:141-146
51. Köprüçü, K. & Özdemir, Y. (2005). Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 250:308-316
52. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685
53. Laining, A.; Rachmansya, H.; Ahmad, T.; Williams, K. (2003). Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 218:529-538
54. Lawrence, T.; Willoughby, D.; Gilroy, D. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2:787-795
55. Lee, H.; Keum, E.; Lee, S.; Sung, D.; Chung, D.; Lee, S.; Oh, S. (2007). Allergenicity of Proteolytic Hydrolysates of the Soybean 11S Globulin.

- Journal of Food Science*, 72:168-172
56. Lefebvre, K.; Trainer, V.; Scholz, N. (2004). Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquatic Toxicology*, 66:159-170
57. Lefebvre, K.; Tilton, S.; Bammler, T.; Beyer, R.; Srinouanprachan, S.; Stapleton, P.; Farin, F.; Gallagher, E. (2009). Gene Expression Profiles in Zebrafish Brain after Acute Exposure to Domoic Acid at Symptomatic and Asymptomatic Doses. *Toxicological Sciences*, 107:65-77.
58. Manco, E. (2006). *Cultivo de Sacha Inchi*. San Martín- Perú. pp 2-3
59. Martínez, D.; Hernández, B.; Amigo, L.; Miralles, B.; Gómez, J. (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. *Proteomics in Foods: Principles and Applications, Food Microbiology and Food Safety* 2, 2:21-50
60. Martinez, E. & Añón, M. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:2523-2530.
61. Martos, G.; Contreras, P.; Molina, E.; López, R. (2010). Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:5640–5648.
62. Maurer, N.; Hatta, B.; Pascual, G.; Rodriguez, L. (2012). Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega–3 fatty acids, Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*, 134:1173–1180.
63. Mendes, V.; Gouvea, M.; Carvalho, F.; Duarte, A. (2013). Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 141:3649-3655
64. Mendieta, O.; Guerra, J.; García, N.; Ramirez, J. (2014). *Diseño de producción de películas biodegradables empleando torta de sachá inchi y glicerol*. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto. Perú. Pp 5
65. Murillo, E.; Lombo, O.; Méndez, J. (2011). Química y Funcionalidad Biológica de *Mollinedia racemosa* (Monimiaceae). *Información Tecnológica*, 22:3-14



66. Nagel, R.; Dar, T. (2002). The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19:38-48
67. Newman, D.; Cragg, G.; Snader, K. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products*, 66:1022–1037
68. Nicholson, P.; Chandler, E.; Draeger, R.; Gosman, N.; Simpson, D.; Thomsett, M.; Wilson, A. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109:691-703.
69. Nielsen, S. (2010). Food Analysis Laboratory Manual: Fish Muscle Proteins: Extraction, Quantitation, and Electrophoresis. *Food Science Texts Series*, 14:115 -121
70. Nielson, S. (1988). Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteasas a review. *Cereal Chemistry*, 65:435-442
71. Nollet, L. (1996). Handbook of Food Analysis; M. Dekker, Nueva York, USA. Pp 16-17
72. O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250:4007-4021
73. O'Brien, N.; Woods, J.; Aheme, S.; O'Callaghan, Y. (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions*, 28:22-6
74. Ortiz, H.; Sánchez, W.; Murillo, E.; Méndez, J. (2009). Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* harms contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Tumbaga*, 1:43-58.
75. Padmanabhan, P. & Jangle, S. (2012). Evaluation of in-vitro antiinflammatory activity of herbal preparation, a combination of four herbal plants. *International Journal of Basic and Applied Science*, 2:109-116.
76. Palanca, V. (2006). Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. *Nutrición hospitalaria*, 21:102-114
77. Pascual, G. & Mejía, M. (2000). Extracción y caracterización de aceite de sacha inchi. Anales Científicos. *UNAM-Perú. Tecnología*, 42:146

78. Peña, A. (2004). Bioquímica, 2da edición. Editorial Limusa S.A., México. Pp 47
79. Pezzato, L.; Miranda, E.; Barros, M.; Quintero, L.; Furuya, W.; Pezzato, A. (2002). Digestibilidad aparente de ingredientes pela tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31:1595-1604
80. Punchard, N.; Whelan, C.; Adcock, I. (2004). Inflammation. *Journal of inflammation*, 1:1-4
81. Purdie, E.; Samsudin, S.; Eddy, F.; Codd, G. (2009). Effects of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 95:279–284.
82. Quinteros, M.; Carpio, C.; Vilcacundo, R.; Carrillo, W. (2016). “Insolation of proteins from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) in presence of water and salt”. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3:193-196
83. Ramírez, M. (2004). *Obtención del aislado proteico de la Cañihua (Chenopodium Pallidicaul e Aellen), mediante el proceso químico y evaluación de sus propiedades funcionales*. Universidad Nacional del Altiplano, Tesis de pregrado de la Facultad de Ingeniería Química, Perú. Pp 55
84. Reyes, E. & Galván, A. (2001). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de rabanales, Córdoba – España. Pp 1-7
85. Rizo, G. (2012). *Diferencia entre: proteína concentrada, aislada e hidrolizada*. Nutrición-Salud. USA. Pp 2
86. Romero, H. & Paredes, O. (1996). Isolation and characterizaton of 283 amaranthin. The 11S amaranth seed globulin. *Journal of Food Chemistry*, 19:329-339
87. Rutherford, K. & Moughan, P. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal AOAC*, 88:955-966
88. Ruiz, C.; Díaz, C.; Anaya, J.; Rojas, R. (2013). Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y torta de 2 especies de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *CIED-Perú*, 79:1-8.

89. Sathe, S.; Hamaker, B.; Sze-Tao, K.; Venkatachalam, M. (2002). Insolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4906-4908.
90. Sathe, S.; Kshirsagar, H.; Sharma, G. (2012). Solubilization, fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 67:247-255
91. Segal, C. & Ortega, G. (2005). *Manual de prácticas Biología Molecular de la célula I.*, Facultad de Ciencias de la UNAM, Mexico. Pp 23-25
92. Segura, M., Vazquez, N.; Rubio, H.; Olguin, L.; Rodriguez, E.; Herrera, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:1553-1558.
93. Serpa, A.; Hincapié, G.; Álvarez, C. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect*, 12:1-10
94. Scholz, S.; Fischer, S.; Gündel, U.; Küster, E.; Luckenbach, T.; Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing, *Environmental Science and Pollution Research*, 15:394-404.
95. Shyur, L.; Huang, C.; Lo, C.; Chiu, C.; Chen, Y.; Wang, S.; Chang, S. (2008). Hepato protective phytochemicals from *Cryptomeria japonica* are potent modulators of inflammatory mediators. *Phytochem*, 69:1348-58
96. Sigal, A. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars Arthritis Rheum*, 34:773-784.
97. Simula, M.; Notarpietro, A.; Toffoli, G.; Re, V. (2012). 2-D gel electrophoresis: constructing 2D-gel proteome reference maps. *Methods Mol Biol*, 815:73-163
98. Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B.; Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85

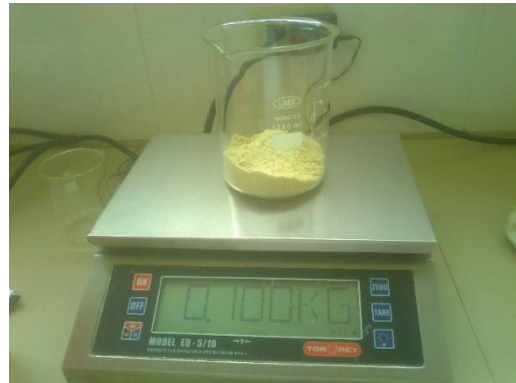
99. Spitsbergen, J. & Kent, M. (2003). The State of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research- advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology*, 31:63-87
100. Srivastava, R. & Bijoy, R. (2013). Proteomic analysis of different extracts from amaranth (*Amaranthus tricolor*) grains. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6:37-39.
101. Sullivan, J. & Reigh, R. (1995). Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* ♀ x *Morone chrysops* ♂). *Aquaculture*, 138:313-322
102. Tiedeken, J.; Ramsdell, J.; Ramsdell, A. (2005). Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*, 27:711-717
103. Urrutia, G. (2010). *Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi (Lupinus mutabilis)*. Tesis de Pregrado Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú. Pp 74-76
104. Vaclavik, V. (2002). *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos*. 1era edición, Editorial Acribia. S.A. Zaragoza-España. Pp 133-147
105. Valadeau, C. (2010). The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*, 127:175–192
106. Veciana, C.; Cortés, E.; Torro, L.; Sirvent, E.; Rizo, M.; Gil, V. (2014). Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas. *Nutrición Hospitalaria*, 29:1388-1393
107. Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92:357-366.
108. Vioque, J. & Millan, F. (2002). *Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional*. Consejo superior de investigaciones científicas. Instituto de la grasa. España-Sevilla. Pp 1-7
109. Wang, P.; Chien, M.; Wu, F.; Chou, H.; Lee, S. (2005). Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio rerio*, *Toxicon*, 45:303-308

110. Wickham, M.; Faulks, R.; Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53:952-958
111. Witting, I. Schagger, H. (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8:90-3974
112. Wolf, W. (1980). Purification and properties of the proteins. In Soybean. Proteins. (A.K. Smith and S.J. Circle, eds.). *Chemistry and Technology*, 1:93-115.

**ANEXO A**  
**FOTOGRAFÍAS DE LA PARTE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO**



**Figura 15.** Torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)



**Figura 16.** Pesado de la torta de sachá inchi.



**Figura 17.** Proceso de agitación de la torta de sachá inchi suspendida con agua.



**Figura 18.** Ajustado a pH 8,0 de la torta de sachá inchi suspendida con agua.



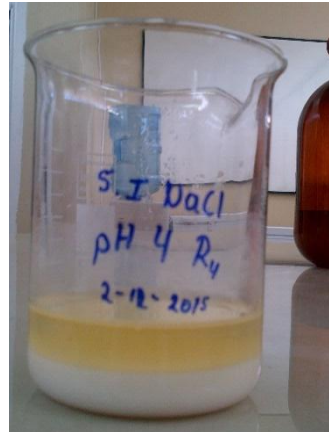
**Figura 19.** Proteína de sachá inchi centrifugada a pH 8,0.



**Figura 20.** Proteína de sachá inchi ajustada a pH 4,0.



**Figura 21.** Precipitación de la proteína de sachá inchi a pH 4,0 (H<sub>2</sub>O).



**Figura 22.** Precipitación de la proteína de sachá inchi a pH 4,0 (NaCl).



**Figura 23.** Precipitación de la proteína de sachá inchi por su punto isoeléctrico.

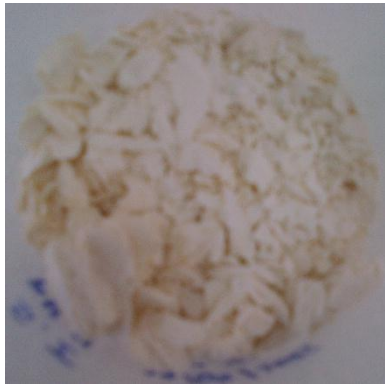


**Figura 24.** Proceso de liofilización de la proteína de sachá inchi.



**Figura 25.** Proteína de sachá inchi liofilizada y aislada a pH 4,0.





**Figura 26.** Proteína de sachá inchi liofilizada y aislada con NaCl 1M.



**Figura 27.** Proteína de sachá inchi aislada con NaCl 1M dializándose.



**Figura 28.** Equipo de electroforesis tradicional, corrida del gel.



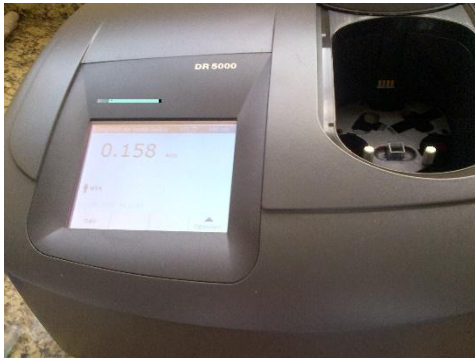
**Figura 29.** Equipo de Electroforesis Bidimensional.



**Figura 30.** Incubador y agitador para microtubos. Proceso de digestión.



**Figura 31.** Liofilizador



**Figura 32.** Espectrofotómetro



**Figura 33.** Medición de la absorbancia de la proteína de Sacha Inchi. Método Biuret.



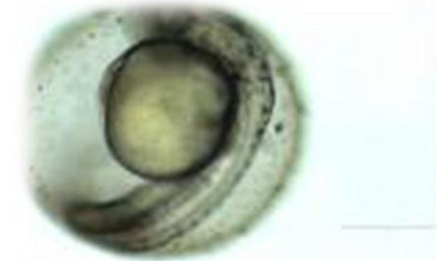
**Figura 34.** Preparación de la muestra para determinar la actividad antiinflamatoria de la proteína de Sacha Inchi.



**Figura 35.** Muestras de la proteína de Sacha Inchi y patrón para la determinación de la actividad antiinflamatoria.



**Figura 36.** Pez cebrá (*Danio rerio*)



**Figura 37.** Desarrollo del pez cebrá en medio de proteína de Sacha Inchi.

**ANEXO B**

**RESPUESTAS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS  
AISLADOS PROTEICOS DE SACHA INCHI**

**Tabla 12.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

Muestra	pH	Pesos (g)		
		R1	R2	R3
1	2	15,963	15,963	16,012
2	3	16,000	16,500	16,500
3	4	20,100	20,700	20,700
4	5	18,405	18,405	18,438
5	6	19,050	18,230	19,050

**Tabla 13.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

Muestra	pH	% Rendimientos		
		R1	R2	R3
1	2	15,963	15,963	16,012
2	3	16,000	16,500	16,500
3	4	20,100	20,700	20,700
4	5	18,405	18,405	18,438
5	6	19,050	18,230	19,050

**Tabla 14.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

Muestra	pH	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
1	2	15,98	0,0008	0,0283	0,0018
2	3	16,33	0,0833	0,2887	0,0177
3	4	20,50	0,1200	0,3464	0,0169
4	5	18,42	0,0004	0,0195	0,0011
5	6	18,78	0,2241	0,4734	0,0252

**Tabla 15.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con agua.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	41,6614	4	10,4153	121,4958	2,0E-8	3,4780
Dentro de los grupos	0,8573	10	0,0857			
Total	42,5187	14				

**Tabla 16.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras aisladas con el solvente agua en el análisis del mejor rendimiento.

pH	Medias	n	E.E.	
4,00	20,50	3	0,17	A
6,00	18,78	3	0,17	B
5,00	18,41	3	0,17	B
3,00	16,33	3	0,17	C
2,00	15,98	3	0,17	C

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,83608  
 Error: 0,0879 gl: 8  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Tabla 17.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	Pesos (g)		
		R1	R2	R3
1	2	47,696	48,000	47,696
2	3	48,070	48,070	48,000
3	4	78,800	80,000	78,800
4	5	45,068	45,200	45,068
5	6	11,505	11,505	11,600

**Tabla 18.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína liofilizada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	% Rendimientos		
		R1	R2	R3
1	2	47,696	48,000	47,696
2	3	48,070	48,070	48,000
3	4	78,800	80,000	78,800
4	5	45,068	45,200	45,068
5	6	11,505	11,505	11,600

**Tabla 19.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
1	2	47,80	0,0307	0,1753	0,0037
2	3	48,05	0,0017	0,0406	0,0008
3	4	79,20	0,4800	0,6928	0,0087
4	5	45,11	0,0058	0,0764	0,0017
5	6	11,54	0,0030	0,0550	0,0048

**Tabla 20.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6892,8232	4	1723,2058	16529,8489	4,74377E-19	3,4780
Dentro de los grupos	1,0425	10	0,1042			
Total	6893,8657	14				

**Tabla 21.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras aisladas con el solvente cloruro de sodio 1 M en el análisis del mejor rendimiento.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,83043						
Error: 0,0867 gl: 8						
pH	Medias	n	E.E.			
4,00	79,20	3	0,17	A		
3,00	48,05	3	0,17	B		
2,00	47,80	3	0,17	B		
5,00	45,11	3	0,17	C		
6,00	11,53	3	0,17	D		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

**Tabla 22.** Datos obtenidos de los pesos por cada 100 g de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	Pesos (g)	
		R1	R2
1	2	15,486	15,690
2	3	17,970	18,010
3	4	24,552	23,870
4	5	13,353	13,050
5	6	3,057	3,400

**Tabla 23.** Porcentaje de rendimiento por cada 100 g de proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	Rendimientos (%)	
		R1	R2
1	2	15,486	15,690
2	3	17,970	18,010
3	4	24,552	23,870
4	5	13,353	13,050
5	6	3,057	3,400

**Tabla 24.** Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Muestra	pH	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
1	2	15,59	0,0207	0,1440	0,0092
2	3	17,99	0,0008	0,0286	0,0016
3	4	24,21	0,2326	0,4822	0,0199
4	5	13,20	0,0459	0,2143	0,0162
5	6	3,23	0,0588	0,2424	0,0751

**Tabla 25.** Análisis de varianza del rendimiento obtenido de la proteína dializada de sachá inchi precipitada a diferentes pHs y aislada con NaCl 1M.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,8817	4	1,4704	39,8043	0,0006	5,1922
Dentro de los grupos	0,1847	5	0,0369			
Total	6,0664	9				

**Tabla 26.** Prueba de comparación múltiple test tukey entre las muestras de los aislados dializados en el análisis del mejor rendimiento.

<b>Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,29381</b>						
Error: 0,0847 gl: 4						
pH	Medias	n	E.E.			
4,00	24,21	2	0,21	A		
3,00	17,99	2	0,21		B	
2,00	15,59	2	0,21			C
5,00	13,20	2	0,21			D
6,00	3,23	2	0,21			E
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						

# APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL A\*B PARA LA DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE SACHA INCHI EN BASE A SU RENDIMIENTO.

**Mod. Mat:**  $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + R_k + E_{ijk}$

## HIPÓTESIS

**Ho:**  $A_i = 0$

**Ha:**  $A_i \neq 0$

**Ho:**  $B_j = 0$

**Ha:**  $B_j \neq 0$

**Ho:**  $(A*B)_{ij} = 0$

**Ha:**  $(A*B)_{ij} \neq 0$

## Factores de estudio

### Factor A: Tipo de solvente

**Niveles:** a1: Agua  
a2: NaCl 1M

### Factor B: pHs

**Niveles:** b1: 2  
b2: 3  
b3: 4  
b4: 5  
b5: 6



**Tabla 27.** Cálculos del diseño experimental A\*B para la determinación del mejor tratamiento.

Muestra	Tratamientos	% Rendimientos			Yij.	prom Yij
		R1	R2	R3		
Agua;pH2	aobo	15,963	15,963	16,012	47,938	15,979
Agua;pH3	aob1	16,000	16,500	16,500	49,000	16,333
Agua;pH4	aob2	20,100	20,700	20,700	61,500	20,500
Agua;pH5	aob3	18,405	18,405	18,438	55,247	18,416
Agua;pH6	aob4	19,050	18,230	19,050	56,330	18,777
NaCl;pH2	a1bo	47,696	48,000	47,696	143,393	47,798
NaCl;pH3	a1b1	48,070	48,070	48,000	144,141	48,047
NaCl;pH4	a1b2	78,800	80,000	78,800	237,600	79,200
NaCl;pH5	a1b3	45,068	45,200	45,068	135,335	45,112
NaCl;pH6	a1b4	11,505	11,505	11,600	34,610	11,537
	<b>Y..k</b>	320,657	322,573	321,864	965,094	<b>Y...</b>

**SUMA Yijk<sup>2</sup>** 44005,87267  
**SUMA Yij.<sup>2</sup>** 132011,9187  
**SUMA Y..k<sup>2</sup>** 310470,6223

**SCT=**  $\sum\sum\sum Yijk^2 - Y...^2/(a*b*r)$   
**SCT=** 12958,99815

**SCTr=**  $1/r\sum\sum Yij.^2 - Y...^2/(a*b*r)$   
**SCTr=** 12957,09837

**SCR=**  $1/(a*b)\sum Y..k^2 - Y...^2/(a*b*r)$   
**SCR=** 0,1877

**SCE=** SCT - SCTr - SCR  
**SCE=** 1,71207

**Tabla 28.** Tabla de doble entrada del diseño experimental A\*B.

	b0	b1	b2	b3	b4	Yi..	prom Yi..
a0	47,938	49,000	61,500	55,247	56,330	270,016	54,003
a1	143,393	144,141	237,600	135,335	34,610	695,078	139,016
Y.j.	191,331	193,141	299,100	190,582	90,940	965,094	<b>Y..</b>
prom Y.j.	95,666	96,570	149,550	95,291	45,470		

suma  $Y_{i..}^2$  556042,3524  
 suma  $Y_{.j.}^2$  207963,4305

SCA=  $1/(b*r)\sum Y_{i..}^2 - Y_{...}^2/a*b*r$   
 SCA= 6022,615632

SCB=  $1/(a*r)\sum Y_{.j.}^2 - Y_{...}^2/a*b*r$   
 SCB= 3613,697221

SC(A\*B)= SCTr - SCA - SCB  
 SC(A\*B)= 3320,785521

**Tabla 29.** Análisis de varianza del diseño experimental A\*B.

FV	GI	SC	CM	Fc	Ft
R	2	0,188	0,09	1,04	3,52
A	1	6022,62	6022,61563	66837,1	4,38
B	4	3613,70	903,42	10025,91	2,89
A*B	4	3320,78552	830,19638	9213,25	2,89
Error	19	1,71	0,09		
Total	29	12959,00			

**PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY**

**SIGNIFICATIVO PARA A**

Tukey=  $q_{max} * \text{raiz}(CME/n)$   
 $\text{raiz}(CME/n) = 0,095$   
 $q_{max} = 2,96$   
**Tukey = 0,28**

		a0	a1	
		54,003	139,016	
a0	54,003	0,000	<b>85,013</b>	*
a1	139,016		0,000	
		a	b	

El factor a1 (solvente NaCl 1M) es significativo para el factor a0 (solvente agua).

### SIGNIFICATIVO PARA B

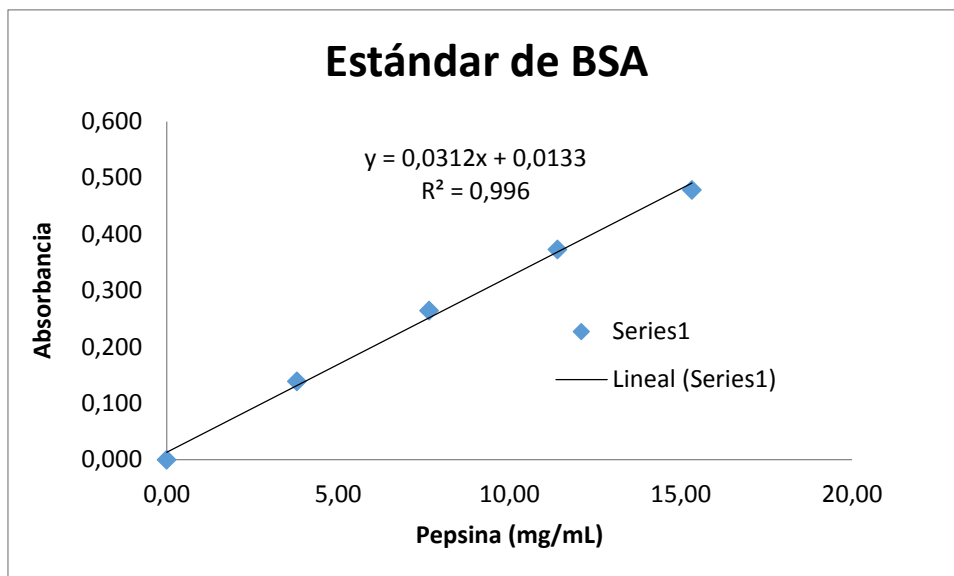
**Tukey=**  $q_{max} \cdot \sqrt{CME/n}$   
 $\sqrt{CME/n} =$  0,095  
 $q_{max} =$  4,25  
**Tukey=** **0,40**

	<b>b0</b>	<b>b1</b>	<b>b2</b>	<b>b3</b>	<b>b4</b>	
	<b>95,666</b>	<b>96,570</b>	<b>149,550</b>	<b>95,291</b>	<b>45,470</b>	
<b>b0</b>	<b>95,666</b>	0,000	0,905	53,884	-0,374	-50,196
<b>b1</b>	<b>96,570</b>		0,000	52,980	-1,279	-51,101
<b>b2</b>	<b>149,550</b>			0,000	-54,259	-104,080
<b>b3</b>	<b>95,291</b>				0,000	-49,821
<b>b4</b>	<b>45,470</b>					0,000

El factor b2 (pH 4) es significativo para los factores b0, b1, b3 y b4 (pH 2, 3,5 Y 6).

## **ANEXO C**

### **RESPUESTAS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SACHA INCHI**



**Gráfico 1.** Curva de estándar de BSA para la determinación de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método Biuret.

**Tabla 30.** Absorbancias de las muestras de proteína de sachá inchi en la aplicación del método Biuret.

Proteína de sachá inchi	Mediciones	Absorbancia		
		R1	R2	R3
pH 2	M1	0,138	0,122	0,108
	M2	0,157	0,139	0,118
pH 3	M1	0,141	0,128	0,128
	M2	0,131	0,128	0,130
pH 4	M1	0,202	0,184	0,190
	M2	0,190	0,183	0,185
pH 5	M1	0,165	0,160	0,171
	M2	0,168	0,158	0,163
pH 6	M1	0,187	0,184	0,175
	M2	0,174	0,172	0,177

**Tabla 31.** Análisis estadístico de la concentración de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

Muestras	R1 (mg/mL)	R2 (mg/mL)	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
pH 2,0	3,53	4,02	3,77	0,1202	0,3467	0,0919
pH 3,0	3,90	3,74	3,82	0,0128	0,1130	0,0296
pH 4,0	5,77	5,57	5,67	0,0216	0,1469	0,0259
pH 5,0	4,80	4,82	4,81	0,0001	0,0113	0,0024
pH 6,0	5,42	5,18	5,30	0,0300	0,1733	0,0327

**Tabla 32.** Análisis de varianza de la concentración de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,8817	4	1,4704	39,8043	0,0006	5,1922
Dentro de los grupos	0,1847	5	0,0369			
Total	6,0664	9				

**Tabla 33.** Análisis estadístico de la concentración de pureza de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

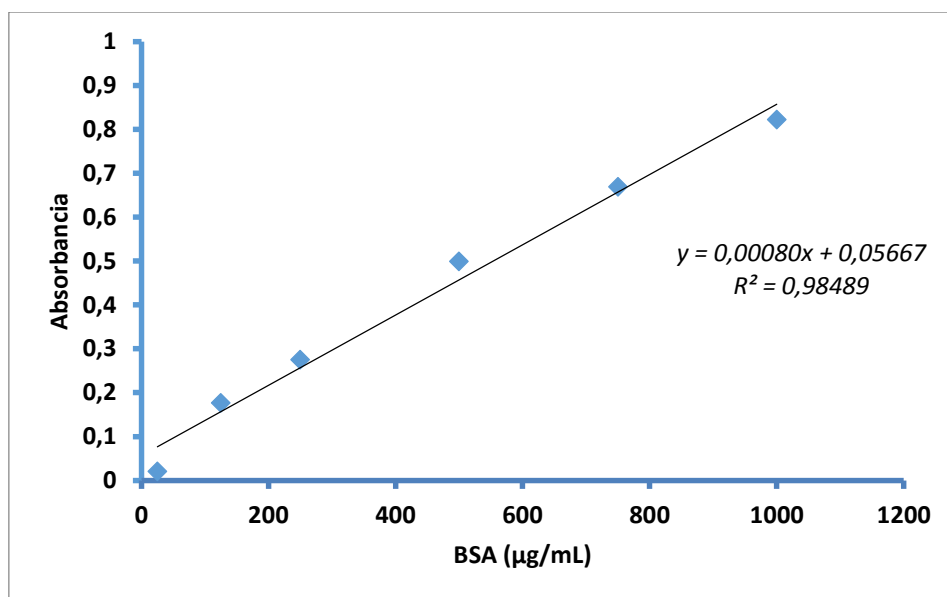
<b>Muestras</b>	<b>R1 (mg/mL)</b>	<b>R2 (mg/mL)</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b><math>\sigma^2</math></b>	<b><math>\sigma</math></b>	<b>CV</b>
pH 2,0	46,30	52,74	49,52	20,7255	4,5525	0,0919
pH 3,0	53,17	51,00	52,08	2,3703	1,5396	0,0296
pH 4,0	76,69	73,93	75,31	3,8093	1,9517	0,0259
pH 5,0	61,39	61,60	61,49	0,0209	0,1446	0,0024
pH 6,0	70,67	67,47	69,07	5,1015	2,2587	0,0327

**Tabla 34.** Análisis de varianza de la concentración de pureza de la proteína de sachá inchi determinada por el método Biuret.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	960,4475	4	240,1119	37,4852	0,0006	5,1922
Dentro de los grupos	32,0276	5	6,4055			
Total	992,4750	9				

**Tabla 35.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el mejor tratamiento con respecto a la concentración de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método Biuret.

<b>Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,53924</b>						
Error: 7,9558 gl: 4						
pH	Medias	n	E.E.			
4,00	75,31	2	1,99	A		
6,00	69,07	2	1,99	A	B	
5,00	61,50	2	1,99	B	C	
3,00	52,09	2	1,99		C	
2,00	49,52	2	1,99		C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )						



**Gráfico 2.** Curva de calibrado para la determinación de concentración de proteína de sachá inchi mediante la aplicación del método BCA.

**Tabla 36.** Absorbancias de las muestras de proteína de sachá inchi en la aplicación del método BCA.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Absorbancia	
		R1	R2
pH 2	1000	0,5907	0,5289
	500	0,3298	0,3009
	250	0,1444	0,1505
pH 3	1000	0,7272	0,7341
	500	0,3644	0,3764
	250	0,2183	0,1961
pH 4	1000	0,7950	0,8097
	500	0,4154	0,4194
	250	0,2403	0,2504
pH 5	1000	0,7123	0,7407
	500	0,3733	0,3819
	250	0,2217	0,2198
pH 6	1000	0,6371	0,6033
	500	0,3460	0,3300
	250	0,1847	0,1971

**Tabla 37.** Determinación de la concentración de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Absorbancia		$\bar{X}$	[BSA] (µg/mL)	% Proteína
		R1	R2			
pH 2	1000	0,591	0,529	0,56	628,165	62,816
	500	0,330	0,301	0,32	322,963	64,593
	250	0,144	0,151	0,15	113,336	45,335
pH 3	1000	0,727	0,734	0,73	841,475	84,148
	500	0,364	0,376	0,37	391,695	78,339
	250	0,218	0,196	0,21	187,936	75,174
pH 4	1000	0,795	0,810	0,80	930,994	93,099
	500	0,415	0,419	0,42	450,375	90,075
	250	0,240	0,250	0,25	235,567	94,227
pH 5	1000	0,712	0,741	0,73	836,294	83,629
	500	0,373	0,382	0,38	400,684	80,137
	250	0,222	0,220	0,22	204,853	81,941
pH 6	1000	0,637	0,603	0,62	703,576	70,358
	500	0,346	0,330	0,34	351,242	70,248
	250	0,185	0,197	0,19	167,585	67,034

**Tabla 38.** Análisis estadístico de la concentración (1000 µg/mL) de la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

pH	R1	R2	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
2	66,67	58,96	62,82	29,7674	5,4559	0,0869
3	83,72	84,58	84,15	0,3711	0,6092	0,0072
4	92,18	94,02	93,10	1,6842	1,2978	0,0139
5	81,86	85,40	83,63	6,2864	2,5073	0,0300
6	72,47	68,25	70,36	8,9042	2,9840	0,0424

**Tabla 39.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el mejor tratamiento con respecto a la concentración de proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 por el método BCA.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14,69690						
Error: 10,9293 gl: 4						
pH	Medias	n	E.E.			
4,00	93,10	2	2,34	A		
3,00	84,15	2	2,34	A	B	
5,00	83,63	2	2,34	A	B	
6,00	70,36	2	2,34	B	C	
2,00	62,82	2	2,34		C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)						



## **ANEXO D**

### **RESPUESTAS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA PROTEÍNA DE SACHA INCHI**

**Tabla 40.** Absorbancia medida en el espectrofotómetro de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

Muestras	Concentración (µg/mL)	Absorbancia		
		R1	R2	R3
Patrón	100	2,092	2,093	2,092
	200	2,052	2,000	2,052
Sachá inchi proteína	100	3,154	3,162	3,162
	200	3,130	3,137	3,137
	500	2,983	2,983	2,961
	1000	2,009	2,000	2,000

**Tabla 41.** Porcentaje de la actividad antiinflamatoria (inhibición) de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

Muestras	Concentración (µg/mL)	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 3
Patrón	100	72,711	72,650	72,711
	200	75,145	78,308	75,145
Sachá inchi proteína	100	8,092	7,606	7,606
	200	9,553	9,127	9,127
	500	18,497	18,497	19,836
	1000	77,761	78,308	78,308

**Tabla 42.** Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria de la proteína de sachá inchi aislada con agua y precipitada a pH 4,0 y de las muestras del patrón de estudio.

Muestras	Concentración (µg/mL)	$\bar{x}$	$\sigma^2$	$\sigma$	CV
Patrón	100	72,69	0,0012	0,0351	0,0005
	200	76,20	3,3369	1,8267	0,0240
Sachá inchi proteína	100	7,77	0,0790	0,2810	0,0362
	200	9,27	0,0605	0,2459	0,0265
	500	18,94	0,5973	0,7728	0,0408
	1000	78,13	0,1000	0,3162	0,0040

**Tabla 43.** Prueba de comparación múltiple test tukey en el porcentaje de inhibición en la proteína de sachá inchi aislada a pH 4,0 a distintas concentraciones.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,37910				
Error: 0,2381 gl: 6				
Concentración (µg/mL)	Medias	n	E.E.	
1000,00	78,13	3	0,28	A
500,00	18,95	3	0,28	B
200,00	9,27	3	0,28	C
100,00	7,77	3	0,28	D

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

**Tabla 44.-**Prueba de comparación múltiple test Tukey en el porcentaje de inhibición en el patrón de estudio (diclofenaco de sodio) a distintas concentraciones.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,62854				
Error: 1,7388 gl: 2				
Concentración (µg/mL)	Medias	n	E.E.	
200,00	76,20	3	0,76	A
100,00	72,69	3	0,76	A

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

**ANEXO E**

**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN LA REVISTA ASIAN  
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH**

## ISOLATION OF PROTEINS FROM SACHA INCHI (*PLUKENETIA VOLUBILIS* L.) IN PRESENCE OF WATER AND SALT

QUINTEROS MF, VILCACUNDO R, CARPIO C, CARRILLO W\*

**1** Department of ???, Laboratorio de Alimentos Funcionales, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Av. Los Chasquis y Río Payamino, Campus Huachi, CP 1801334, Ambato, Ecuador. Email: wi.carrillo@uta.edu.ec

Received: 01 February 2016, Revised and Accepted: 10 February 2016

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to obtain protein isolate from sacha inchi using alkaline pH at different pHs of precipitation with water and salt and to analyze protein isolate with electrophoresis.

**Methods:** Sacha inchi protein isolates were obtained using isoelectric precipitation method at different pHs. Proteins were analyzed using electrophoresis native-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), one-dimensional, two-dimensional-sodium dodecyl sulfate-PAGE.

**Results:** A yield of 20.88% of protein isolate of defatted sacha inchi flour at pH 4.0 with a 75.31% of protein was obtained. The yield of protein isolate using water and salt was similar. Polypeptides profile is between 14 and 70 kDa.

**Conclusions:** Sacha inchi seed is a good source of proteins. Globulins and albumins were identified in the sacha inchi protein isolate in the presence of water and salt.

**Keywords:** Albumins, Globulins, Proteins, Protein isolate, Sacha inchi.

### INTRODUCTION

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L), also named as Inca peanut, is a plant that grows in the wild and is native to the rain forests of the Andean region of South America. This plant belongs to the *Euphorbiaceae* family and is composed of nineteen species [1]. Food proteins from plants are important for human and animal nutrition, particularly in developing countries where average protein intake is less than required [2]. The production of plant protein isolates is of growing interest to the food industry because of the increasing applications of plant proteins in food markets, nutraceutical products, and functional foods. Presently, it is possible to find products derived from plant proteins isolate such as soybean, quinoa, amaranth lupin seed, and walnuts [3,4]. It is known that sacha inchi seeds have a high content of oil (54%) and protein (27%) [5]. Sacha inchi seed proteins are soluble in aqueous buffers, and a water-soluble albumin has been reported to constitute 31 % of total proteins in the seed. A sub-product named tort or flour with high content of protein reported between 50% and 70% is obtained, during the production of sacha inchi oil. Sacha inchi proteins are soluble in 2 M NaCl at pH 4.0 [6]. In this study, we reported sacha inchi protein isolates with water and salt at different pHs of precipitation.

### METHODS

#### Sacha inchi flour and proximate analysis

Sacha inchi flour was defatted through extraction with hexane (1:10 w/v) at room temperature during 24 hrs, under continuous stirring during the first 5 hrs. After drying at room temperature, the flour was stored at 4°C until used. Analytical methods such as moisture, fat, total fiber, and soluble solids content were determined according to the methods of AOAC [7], numbers 9250.10, 930.09, 985.29, and 923.03, respectively. The protein content of the samples was determined by the Micro-Kjeldahl method AOAC number 920.152, % (N × 6.25). Carbohydrates percentage was calculated with the formulas: % Carbohydrates = 100 - (% moisture + % proteins + % fat + % soluble solids + % total fiber). Contents were expressed on a dry weight basis.

#### Protein isolate from sacha inchi

Sacha inchi isolate was prepared according to Martinez and Añón (1996) [8] with modifications. The defatted flour was suspended in water in a 1:10 w/v, and the suspension was adjusted to pH 8.0 by adding 2 M NaOH. The suspension was stirred during 1 hr and then centrifuged at 4500 g for 30 minutes at 25°C. The supernatant was adjusted to pHs 2.0; 3.0; 4.0; 5.0, and 6.0 with 2 N HCl and centrifuged for 20 minutes at 4500 g. The pellet was suspended in a small volume of water, neutralized with 0.1 M NaOH, and lyophilized and then frozen at -20°C. The content of protein isolate was determined using the method Biuret [9].

#### Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Native-PAGE and SDS-PAGE electrophoresis of sacha inchi protein isolate was carried out according to the method proposed by Laemmli (1970) [10] using 4-8% and 4-12% polyacrylamide gel in a mini-protean electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Polypeptide bands were stained in Coomassie Brilliant Blue G-250 for 12 hrs. Relative molecular masses of protein were determined by a comparison to molecular weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and software Quantity One of Chemidoc (Bio-Rad).

#### Two-dimensional (2D) electrophoresis (isoelectric focusing [IEF]-SDS-PAGE)

Samples were analyzed by 2D electrophoresis as described by Quiroga *et al.*, (2015) [11]. IEF was run using 7 cm linear immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3-10) in the PROTEAN i12 IEF Cell system (Bio-Rad). Samples were dissolved in the rehydration buffer, and the IPG strips were rehydrated with these samples. Following IEF, the gel strips were incubated with equilibration buffer and were placed onto 12 g acrylamide/100 ml of resolving gels and were run in mini slabs (Bio-Rad). All gels were fixed and stained with Coomassie Brilliant Blue.

#### Statistical analysis

Results are presented as means ± standard deviation from three replicates of each experiment. Differences between mean values were

determined by the analysis of variance. The *post-hoc* analysis was performed by the Tukey test. All tests were considered significant at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the software package Prism 4 for Windows, version 4.3 (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

**RESULTS AND DISCUSSION**

The defatted sacha inchi flour (DSF) (n=3) was analyzed for proximate analysis. Table 1 shows the results of this analysis. The content of protein was high with a 57.6%. This result is comparable with similar results reported in the bibliography between a 53% and 59% [7,13] while the carbohydrates content was 15.2%.

Sacha inchi protein isolates were obtained using the isoelectric precipitation method with water and NaCl 1 M as solvents. Using water as solvent, the highest yield was obtained at pH 4.0 with a 20.88% of protein isolate content, whereas using NaCl 1 M as solvent, the highest yield at pH 4 was 77.90%. NaCl was apparently effective for solubilizing protein from sacha inchi flour. However, samples using NaCl as solvent were dialyzed with a membrane with porous of 5000 Da to eliminate the content of salt. Yield after dialysis has not statistical differences with respect to use only water as solvent. Yield results using water as solvent or dialyzed NaCl solution were similar in all pHs assayed. Moreover, the content of protein was determined using Biuret method registering a high content of protein at pH 4.0 with a 75.31% (Table 2).

All protein isolate from DSF were analyzed by electrophoresis native-PAGE, one-dimensional-SDS-PAGE, and 2D-SDS-PAGE. Protein isolate at pH 4 was analyzed with SDS-PAGE at a concentration of 5 mg/ml. Bands between 14 and 200 kDa were found. Bands of 16 and 43 kDa have strong expression (Fig. 1). The profile of protein is complex with bad resolution as protein loaded in each well was 5 mg/ml. It was determined that the optimum concentration of protein was 20 µg/ml for each well of the gel for all assays.

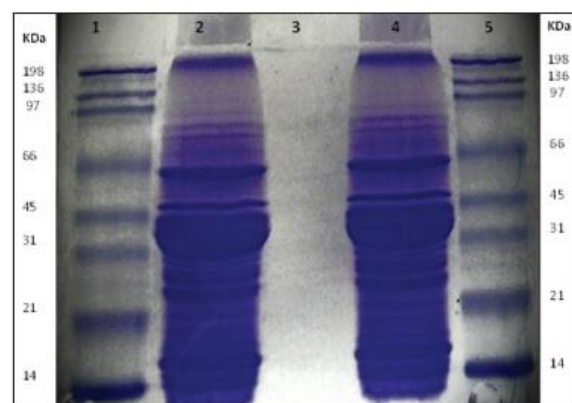
Electrophoresis native-PAGE was assayed to analyze protein isolate obtained with water at different pHs of precipitation. Bands of 14-97 kDa were found. Bands with molecular weight corresponding to 14, 30, 60, and 97 kDa presented high expression (Fig. 2).

On the other hand, the samples were analyzed with electrophoresis SDS-PAGE with 2-β-mercaptoethanol. Soluble proteins were characterized by polypeptides 16-70 kDa range. These results are in accordance to other authors. Bands of 45 and 73 kDa were found in all pHs assayed. The 45 kDa band corresponds to 11S globulin and the band with 73 kDa corresponds to 7S globulin. 11S and 7S fractions are more abundant. Finally, a band with 16 kDa can be 2S albumin (Fig. 3).

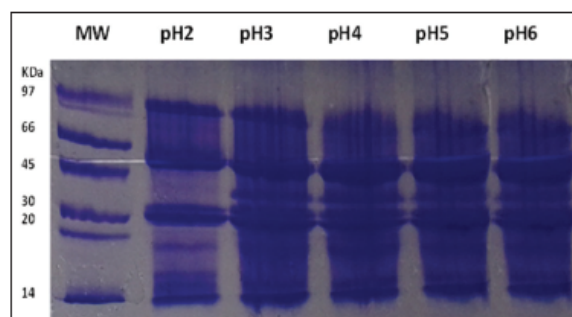
Electrophoresis SDS-PAGE without 2-β-mercaptoethanol was used to analyze protein isolate obtained with water. Fig. 4 shows one polypeptide of 45 kDa with high expression and present in all pHs assayed.

Protein isolates obtained with NaCl 1 M at different pHs were analyzed by electrophoresis SDS-PAGE. Fig. 4 shows a band of 66 kDa and one dimer of 45 kDa, other dimer of 28 kDa and other dimer of 16 kDa. All bands have high expression because those bands are more soluble in this solvent (Fig. 5).

Electrophoresis 2D-SDS-PAGE indicates that protein isolate contains a high content of globulins. Moreover, these proteins have the same molecular weight but the different isoelectric point, for these reasons these proteins maybe isoforms (Fig. 6).



**Fig. 1:** Electrophoresis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with 2-β-mercaptoethanol of sacha inchi protein isolate at pH 4.0. (5 mg/ml) (20 µl of sample for well), Lane 1: Molecular weight; Lane 2: Sacha inchi isolate at pH 4.0; Lane 3: Water; Lane 4: Sacha inchi isolate at pH 4.0 replicate; Lane 5: Molecular weight



**Fig. 2:** Electrophoresis native-polyacrylamide gel electrophoresis of sacha inchi protein isolate precipitated at different pHs

**Table 1:** Proximate analysis of DSF

%	Protein	Fat	Moisture	Total fiber	Soluble Solids	Carbohydrates
DSF	57.60±0.1	11.2±0.01	4.08±0.03	5.72±0.1	5.78±0.2	15.62±0.2

Results represent the average of three determinations±SD. DSF: Defatted sacha inchi flour; SD: Standard deviation

**Table 2:** Content of sacha inchi protein isolate obtained at different pHs

Sample (%)	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0
Isolate with water	15.65±0.8 <sup>a</sup>	16.73±1.2 <sup>a</sup>	20.88±1.3 <sup>a</sup>	18.53±0.2 <sup>a</sup>	19.10±0.2 <sup>a</sup>
Isolate with NaCl	49.47±2.5 <sup>a</sup>	48.73±2.5 <sup>a</sup>	77.90±3.4 <sup>b</sup>	46.41±1.9 <sup>a</sup>	10.03±2.0 <sup>c</sup>
Isolate after dialysis	15.98±2.5 <sup>a</sup>	16.93±2.5 <sup>a</sup>	20.50±2.5 <sup>a</sup>	18.42±2.5 <sup>a</sup>	10.0±2.5 <sup>a</sup>
Protein biuret	49.52±1.5 <sup>a</sup>	52.08±1.5 <sup>a</sup>	75.31±1.9 <sup>b</sup>	61.49±0.1 <sup>a</sup>	69.29±1.2 <sup>b</sup>

Values are expressed in grams per 100 g of protein. Values are means±SD of three determinations. Different letters show a statistical difference between the groups (<0.05) analysis of variance and Turkey's test. SD: Standard deviation



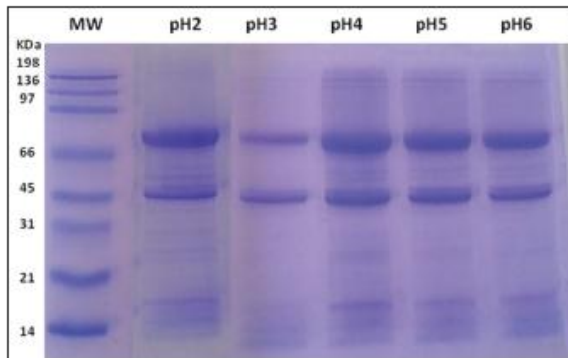


Fig. 3: Electrophoresis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with 2- $\beta$ -mercaptoethanol analysis of sacha inchi protein isolate obtained at different pHs

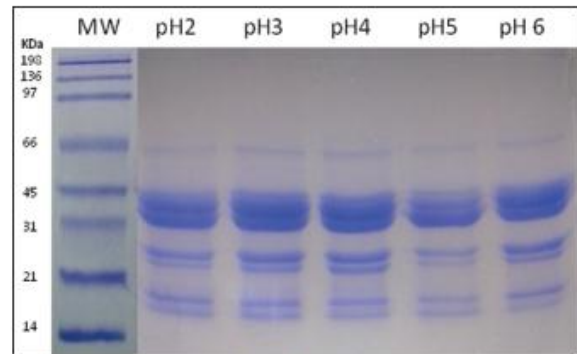


Fig. 5: Electrophoresis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with 2- $\beta$ -mercaptoethanol analysis of sacha inchi protein isolate obtained with NaCl 1 M at different pHs

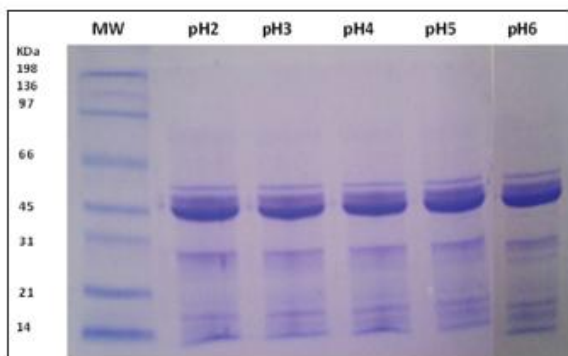


Fig. 4: Electrophoresis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis without 2- $\beta$ -mercaptoethanol analysis of sacha inchi protein isolate obtained at different pHs

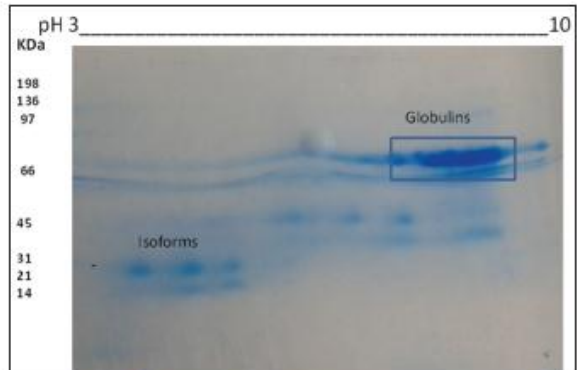


Fig. 6: Electrophoresis two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of sacha inchi isolate at pH 4.0

## DISCUSSION

It is known that plant protein from legume and non-legume plants have two of the main classes of storage proteins. These proteins are named 7S and 11S depending on their sedimentation coefficients. 11S globulins are hexamers with molecular weights between 300 and 400 kDa, consisting of two opposed hexagonal rings, each containing three hydrophobically associated pairs of disulfide-linked acidic (29-35 kDa) and basic (18-28 kDa) subunits. 7S globulins are glycoproteins with molecular weights between 150 and 200 kDa [14]. The occurrence of 11S and 7S type storage globulins in angiosperm seeds has been recognized and accepted [15-18]. 2S albumins have been characterized in different plant proteins for example amaranth, quinoa, lupin seed, soybean, and sacha inchi, as they are considered as allergens [19,20]. In this study, globulins and albumins proteins were obtained from sacha inchi protein isolates at different pHs with water and salt as solvent for extraction. Shridhar *et al.*, 2012 reported that they obtained polypeptides with molecular weight between 6 and 70 kDa, although with high expression of polypeptides with mass of 20-40 kDa. In this study, similar results have been obtained with polypeptides between 14 and 70 kDa, polypeptides with the highest expression were 20-70 kDa.

## CONCLUSIONS

It was possible to obtain protein isolates from sacha inchi flour with solvents as water and NaCl 1 M with high yields. No major differences were found in yields when using water or NaCl as solvent. Electrophoresis 2D indicate that protein isolates have proteins with isoforms. Sacha inchi flour is a good source of proteins to be used for animal and human nutrition.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Universidad Técnica de Ambato, Ecuador (Project CPU-1373-2014-UTA). This work has been reviewed in the English edition by Emilio Labrador. Carrillo W thanks to Sandra Chavez of AMTECLAB by the advice with instruments of Bio-Rad, Dr. Carlos Rodríguez director (DIDE), and Dra. Jacqueline Ortiz Doyenne (FCIAL) for support and encouragement.

## REFERENCES

1. Sathe SK, Hamaker BR, Sze-Tao KW, Venkatachalam M. Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *J Agric Food Chem* 2002;50(17):4906-8.
2. Mao X, Hua Y, Chen G. Amino acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and protein fractionations. *Int J Mol Sci* 2014;15(2):2003-14.
3. Mao XY, Hua YF. Chemical composition, molecular weight distribution, secondary structure and effect of NaCl on functional properties of walnut (*Juglans regia* L.) protein isolates and concentrates. *J Food Sci Technol* 2014;51(8):1473-82.
4. Czubinski J, Dwiecki K, Siger A, Kachlicki P, Neunert G, Lampart-Szczapa E, *et al.* Release of flavonoids from lupin globulin proteins during digestion in a model system. *J Agric Food Chem* 2012;60(7):1830-6.
5. Czubinski J, Dwiecki K, Siger A, Lampart-Szczapa E, Nogala-Kalucka M. Interactions between *Lupinus angustifolius* seeds lipoxigenase and native phenolic compounds in the model system. *Eur Food Res Technol* 2012;235:67-73.
6. Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, *et al.* Chemical characterization of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil.

- J Agric Food Chem 2011;59(24):13043-9.
7. Sathe SK, Kshirsagar HH, Sharma GM. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. Plant Foods Hum Nutr 2012;67(3):247-55.
  8. AOAC. Official Methods of Analysis. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists; 2012.
  9. Martínez NE, Añón MC. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. J Agric Food Chem 1996;44:2523-30.
  10. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 1949;177:751-66.
  11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680-5.
  12. Quiroga AV, Barrio DA, Añón MC. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. LWT Food Sci Technol 2015;60:478-85.
  13. Hamaker BR, Valles C, Gilman R, Hardmeier RM, Clark D, Garcia HH, et al. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut (*Plukenetia volubilis*). Cereal Chem 1992;69:461-3.
  14. Romero-Zepeda H, Paredes-Lopez O. Isolation and characterization of amaranthine. The 11S amaranth seed globulin. J Food Chem 1996;19:329-39.
  15. Wolf WJ. Purification and properties of the proteins. In: Smith AK, Circle SJ, editors. Soybean: Chemistry and Technology. Proteins. Vol. 1. New York: Van Nostrand Reinhold; 1980. p. 93-115.
  16. Brinegar C, Goundan S. Isolation and characterization of chenopod in, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). J Agric Food Chem 1993;41:182-5.
  17. Brinegar C, Goundan S. Isolation and characterization of chenopod in, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). J Agric Food Chem 1993;41:182-5.
  18. Srivastava R, Roy B. Proteomic analysis of different extracts from amaranth (*Amaranthus tricolor*) grains. Asian J Pharm Clin Res 2013;6:37-9.
  19. Czubinski J, Dwiecki K, Siger A, Neunert G, Lampart-Szczapa E. Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. Food Chem 2014;143:418-26.
  20. Brinegar C, Sine B, Nwokocha L. High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). J Agric Food Chem 1996;44:1621-3.

#### Author Queries???

- AQ1: Kindly provide Author department and also provide English language
- AQ2: Please note reference 12 is not cited in text and also duplicate references are found (16 and 17 highlighted). Please check and cite all references



## DIGESTIBILITY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY *IN VITRO* OF SACHA INCHI (*PLUKENETIA VOLUBILIS* L.) PROTEINS

QUINTEROS MF, VILCACUNDO R, CARPIO C, CARRILLO W\*

Laboratory of Functional Foods, Faculty of Foods Science and Engineering, Technical University of Ambato, Av. Los Chasquis y Rio Payamino, Campus Huachi, CP 1801334, Ambato, Ecuador. Email: wi.carrillo@uta.edu.ec

Received: 21 February 2016, Revised and Accepted: 27 February 2016

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the digestibility and anti-inflammatory activity *in vitro* of sacha inchi protein isolate.

**Methods:** Proteins were analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Gastric digestibility was evaluated with pepsin at different pHs and at different relation enzyme/substrate. Anti-inflammatory activity *in vitro* of sacha inchi protein isolate was evaluated using denatured protein method with egg albumin.

**Results:** A yield of 20.88% of protein isolate of defatted sacha inchi flour at pH 4.0 with a 93.1% of protein was obtained. 11S globulins were resistant to gastric and duodenal digestion. Sacha inchi protein isolate at pH 4.0 (1000 µg/ml) presents 78.13% of anti-inflammatory activity *in vitro*.

**Conclusions:** Sacha inchi seed is a good source of proteins. 11S globulins are resistant to pepsin and pancreatin hydrolysis. Sacha inchi protein isolate has high anti-inflammatory activity *in vitro*.

**Keywords:** Sacha inchi, Gastric digestion, Duodenal digestion, Globulins and albumins.

### INTRODUCTION

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), also named as Inca peanut, is a plant that grows in the wild and is native to the rain forests of the Andean region of South America. This plant belongs to the *Euphorbiaceae* family and is composed of 19 species [1]. Food proteins extracted from plants are important for human and animal nutrition particularly in developing countries where average protein intake is less than required [2]. The production of plant protein isolates is of growing interest to food industry because of the increasing applications of plant proteins in food markets, nutraceutical products, and functional foods [3,4]. It is known that sacha inchi seeds have a high content of oil (54%) and protein (27%) [5,6]. Medicinal plants are considered a rich source of pharmaceutical components for the prevention and treatment of diseases and ailments. Inflammation process is the defense mechanism of the body to eliminate or limit the spread of injurious stimuli and heal the injury, excessive inflammation is associated with onset of diseases such as rheumatoid arthritis, asthma, periodontitis, inflammatory bowel disease, atherosclerosis, Alzheimer's disease, and even cancer such as gallbladder carcinoma [7,8]. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are widely used in the treatment of acute and chronic inflammation, pain, and fever. Their use is associated with adverse effects such as severe gastritis, peptic ulcer, nausea, vomiting, salt and water retention, worsening of renal function in renal or cardiac and cirrhotic patients, and hypersensitivity [9,10]. Therefore, the development of new, economic, potent and safe anti-inflammatory drugs from natural sources is needed, especially for developing countries. The aim of this study is to evaluate the gastrointestinal digestibility and anti-inflammatory activity *in vitro* of sacha inchi proteins (*Plukenetia volubilis* L.).

### METHODS

#### Protein isolate from sacha inchi

Sacha inchi isolate was prepared according to Martínez and Añón [11] with modifications. The defatted flour was suspended in water in a 1:10 w/v. The suspension was adjusted to pH 8.0 by adding 2 M NaOH. The

suspension was stirred during 1 hr and then centrifuged at 4500 g for 30 minutes at 25°C. The supernatant was adjusted to pHs 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0 with 2 N HCl and centrifuged for 20 minutes at 4500 g. The pellet was suspended in a small volume of water, neutralized with 0.1 M NaOH, and lyophilized and then frozen at -20°C. The content of protein isolate was determined using the bicinchoninic acid (BCA) method.

#### Gastric digestion

Sacha inchi protein isolate at pH 4.0 was subject to *in vitro* gastric digestions at 5 mg/mL final concentration. The digestions were performed in simulated gastric fluid (0.35 M NaCl) at different pHs: 1.2, 2.0 and 3.2 at 37°C for 120 minutes, with porcine pepsin (EC 3.4.23.1, 4,500 U/mg protein, Sigma-Aldrich), with an enzyme/substrate ratio of 1:20, wt/wt (2000 U/mg) [12,13]. At least four replicates of each digestion assay were performed and compared with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method to ensure the repeatability of the results. Aliquots were taken at 120 minutes for analysis. The digestions were stopped by mixing with the SDS-sample buffer for SDS-PAGE, and subsequently, pH was raised to 7.0 with ammonium bicarbonate to irreversibly inactivate pepsin after 10 minutes of equilibration. The protein concentration of the supernatants was determined by the BCA method.

#### Duodenal digestion

Duodenal digestions were performed as previously described [14] referenced to a 120 minutes gastric digests re-adjusted at pH 7.0. The following elements were added:

- 0.125 M bile salt mixture containing equimolar quantities of sodium glycodeoxycholate and sodium taurocholate (Sigma-Aldrich) (6.15 mM final concentration of each salt)
- 1 M CaCl<sub>2</sub> (7.6 mM final concentration)
- Pancreatine (100 U/mg) mixed with 20.3 mM Bis-Tris.

Reactions were carried out at 37°C during 120 minutes and stopped by heating at 80°C during 5 minutes. Hydrolysates were analyzed using SDS-PAGE.

**SDS-PAGE**

SDS-PAGE of sacha inchi protein isolate was carried out according to the method proposed by Laemmli (1970) [15] using 4-8% and 4-12% polyacrylamide gel in a Mini-Protean electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Polypeptide bands were stained in Coomassie Brilliant Blue G-250 for 12 hrs. Relative molecular masses of protein were determined by a comparison to molecular weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and software Quantity One of Chemidoc (Bio-Rad).

**Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity**

Anti-inflammatory activity of sacha inchi protein isolate at pH 4.0 was evaluated with the protein denaturation method [16,17]. Diclofenac sodium, a powerful nonsteroidal anti-inflammatory drug was used as a standard drug. The reaction mixture consisting of 2 mL of different concentrations of protein isolate (100-1000 µg/mL) or standard diclofenac sodium (100 and 200 µg/mL) and 2.8 mL of phosphate buffered saline (pH 6.4) was mixed with 2 mL of egg albumin (from fresh hen egg) and incubated at 27°C for 15 minutes. Denaturation was induced by keeping the reaction mixture at 70°C in a water bath for 10 minutes. After cooling, the absorbance was measured at 660 nm using double distilled water as blank. Each experiment was done in triplicate and the average was taken. The percentage inhibition of protein denaturation was calculated using the following formula:  
% Inhibition:  $(At-Ac/Ac) \times 100$

**Statistical analysis**

Results are presented as mean±standard deviation from three replicates of each experiment. Differences between mean values were determined by the analysis of variance. The *post hoc* analysis was performed by the Tukey's test. All tests were considered significant at  $p < 0.05$ . A statistical analysis was performed using the software package Prism 4 for Windows, version 4.3 (GraphPad Software Inc., www.graphpad.com).

**RESULTS**

Sacha inchi protein isolates were obtained using the isoelectric precipitation method with water as solvent. Using water as solvent, the highest yield was obtained at pH 4.0 with a 20.88% of protein isolate content (Table 1). The content of protein in the protein isolate was determined using the BCA method. Table 2 shows the results of BCA method. The content of protein was extremely high (93.1%) in sacha inchi protein isolate at pH 4. This treatment of precipitation at pH 4 was chosen as the optimum to evaluate digestibility and anti-inflammatory *in vitro* activity.

**Gastrointestinal simulation**

Sacha inchi protein isolate at pH 4.0 was hydrolyzed with pepsin at 172 U/mg of protein during 60 minutes at 37°C, at pH 1.2, 2.0 and 3.2. It was observed that the isolate of sacha inchi was resistant to the hydrolysis with pepsin at low concentration of enzyme. 7S, 11S, and 2S albumins were resistant to proteolytic digestion (Fig. 1). With regards to the isolate of sacha inchi when assayed with a higher concentration of enzyme (2000 U/mg of protein), it was determined that 11S globulins show a remarkable stability to hydrolysis with pepsin as shown in Fig. 2 and Fig. 3.

7S globulins and 2S albumins were susceptible to pepsin hydrolysis at 2000 U/mg of protein.

On the other hand, a digestion model was assayed in two steps; the first step was named gastric digestion with pepsin at 2000 U/mg of protein at pH 3.0 during 120 minutes at 37°C. The second step was performed by adding a pancreatin solution at pH 7.0 during 120 minutes at 37°C. Using SDS-PAGE method, we observed that 11S globulins continue being resistant to hydrolysis with enzymes. 11S globulins from sacha inchi are resistant to proteolytic digestion with pepsin and with the mix of pepsin and pancreatin.

The reason for choosing sacha inchi protein isolate at pH 4.0 was due to the fact that this treatment presents a higher yield in this study with a higher content of protein. The inhibitory effects of different concentrations of Sacha inchi protein isolate at pH 4.0 were determined using the protein denatured method described by Padmanabhan *et al.*, 2012. The results are shown in Table 2. Sacha inchi protein isolate (100-1000 µg/ml) showed a significant inhibition of egg albumin denaturation in a dose-dependent form. The *in vitro* anti-inflammatory

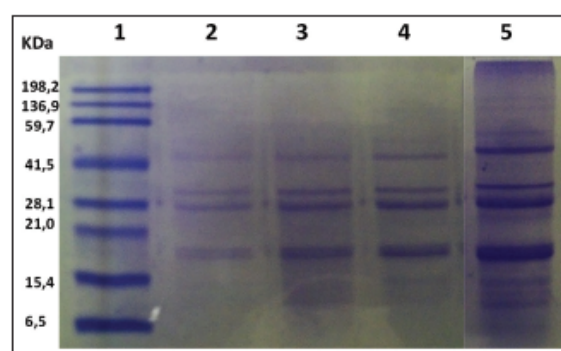


Fig. 1: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of sacha inchi protein isolate of pH 4.0 hydrolyzed with pepsin at pH 1.2; 2.0 and 3.2 (gastric digestion with pepsin at 172 U/M of protein)

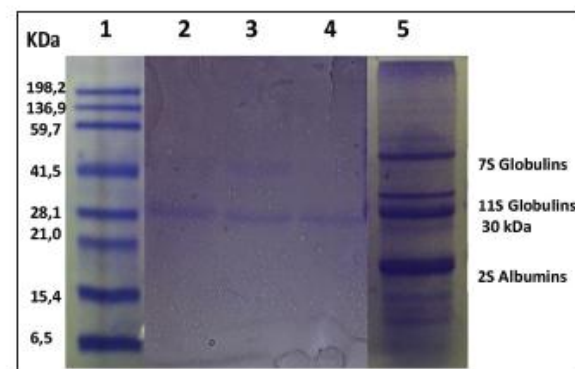


Fig. 2: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of sacha inchi protein isolate of pH 4.0 hydrolyzed with pepsin at pH 1.2; 2.0 and 3.2 (gastric digestion with pepsin at 2000 U/M of protein)

Table 1: Sacha inchi isolate protein yield obtained at different pHs and content of protein in the sacha inchi isolate

Sample	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0
% Isolate with water	15.65±0.8 <sup>a</sup>	16.73±1.2 <sup>a</sup>	20.88±1.3 <sup>a</sup>	18.53±0.2 <sup>a</sup>	19.10±0.2 <sup>a</sup>
% Protein by BCA	62.8±0.04 <sup>a</sup>	89.1±0.004 <sup>d</sup>	93.1±0.01 <sup>e</sup>	83.6±0.02 <sup>c</sup>	70.4±0.02 <sup>b</sup>

BCA: Bicinchoninic acid, SD: Standard deviation, results represent the average of three determinations ±SD. Different letters show statistical difference from the control group ( $p < 0.05$ ) ANOVA and Turkey's test



Table 2: *In vitro* anti-inflammatory activity of sachachi protein isolate

Treatment	Concentration $\mu\text{g/ml}$	% Inhibition of denaturation
Protein isolate	100	7.77 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
	200	9.27 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
	500	18.94 $\pm$ 1.09 <sup>b</sup>
	1000	78.13 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>
Diclofenac	100	72.69 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
Sodium	200	76.20 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>

SD: Standard deviation, results represent the average of three determinations  $\pm$ SD. Different letters show statistical difference from the control group ( $p < 0.05$ ) ANOVA and Turkey's test

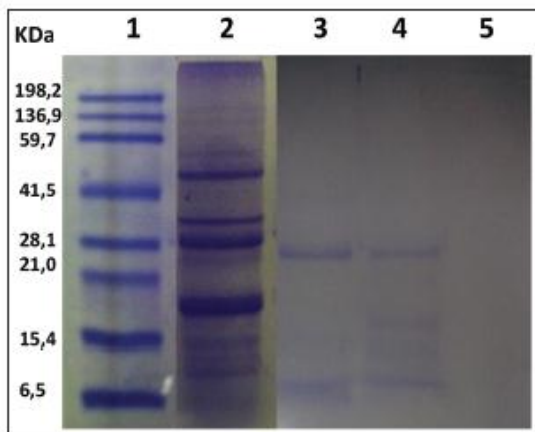


Fig. 3: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of sachachi protein isolate of pH 4.0 hydrolyzed with pepsin more pancreatin at pH 7.0 (duodenal digestion)

activity of sachachi protein isolate at pH 4.0 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) was comparable to the one of the positive control (diclofenac sodium and anti-inflammatory drug) with 78, 13% of inhibition.

#### DISCUSSION

It is known that plant proteins from legume and nonlegume plants have two of the main classes of storage proteins. These proteins are named 7S and 11S depending on their sedimentation coefficients. 11S globulins are hexamers with molecular weights between 300 and 400 kDa, consisting of two opposed hexagonal rings, each containing three hydrophobically associated pairs of disulfide-linked acidic (29-35 kDa) and basic (18-28 kDa) subunits. 7S globulins are glycoproteins with molecular weights between 150 and 200 kDa [18]. The occurrence of 11S and 7S type storage globulins in angiosperm seeds has been recognized and accepted [19]. 2S albumins have been characterized in different plant proteins for example amaranth, quinoa, lupin seed, soybean and sachachi, as they are considered as allergens [20,21]. The water-insoluble 7-11S globulin and the soluble 2S albumin are the two major storage proteins of many plants. A number of plant proteins have been found to present a high resistance to proteolysis in the gastrointestinal tract because of specific structural properties. Major proteins structural properties of legume and other plant proteins that have been reported to affect *in vivo* digestibility such as soybean, cereals, lupin, nuts and wheat proteins. The protein fraction of plant foods with high cysteine content, the albumin fraction, according to classical Osborne classification methodology, has been found to be quite resistant to heat denaturation and proteolytic digestion. Stability is conferred by the presence of a high number of disulfide bonds contained in low molecular weight proteins, such as Bowman-Birk inhibitor (BBI) [22-25]. Unlike the closely related Kunitz trypsin inhibitor, soybean BBI is a small molecule of 8 kDa and

seven disulfide bridges. Other very stable and highly active inhibitors of the BBI class have recently been isolated from lentil (*Lens culinaris* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) seeds. Lee et al. [26] have reported that primary allergen of soybean 11S basic polypeptide presented resistance to hydrolysis with pepsin at pH 2.0. In this study, 11S globulin is resistant to hydrolysis with pepsin and pepsin/pancreatin; this can be due to the high content of cysteine.

#### CONCLUSIONS

Sachachi seeds are an excellent source to obtain proteins isolate. 7S globulin and 2S albumin of sachachi were susceptible to gastric and duodenal hydrolysis. 11S globulins were resistant to gastric and duodenal digestion. Sachachi protein isolate at pH 4.0 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) presents 78.13% of anti-inflammatory activity *in vitro*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Universidad Técnica de Ambato, Ecuador (Project CPU-1373-2014-UTA). We thanks to Mr. Abraham Rodolfo Sánchez Piñuela for facility sachachi flour. This work has been reviewed in the English edition by Emilio Labrador Carrillo W, thanks to Sandra Chavez of AMTECLAB by the advice with instruments of Bio-Rad, Dr. Carlos Rodríguez director (DIDE) and Dra. Jacqueline Ortiz Doyenne (FCIAL) for support and encouragement.

#### REFERENCES

- Sathe SK, Hamaker BR, Sze-Tao KW, Venkatchalam M. Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *J Agric Food Chem* 2002;50(17):4906-8.
- Mao X, Hua Y, Chen G. Amino acid composition, molecular weight distribution and gel electrophoresis of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and protein fractionations. *Int J Mol Sci* 2014;15(2):2003-14.
- Mao XY, Hua YF. Chemical composition, molecular weight distribution, secondary structure and effect of NaCl on functional properties of walnut (*Juglans regia* L.) protein isolates and concentrates. *J Food Sci Technol* 2014;51(8):1473-82.
- Czubinski J, Dwiecki K, Siger A, Kachlicki P, Neunert G, Lampart-Szczapa E, et al. Release of flavonoids from lupin globulin proteins during digestion in a model system. *J Agric Food Chem* 2012;60(7):1830-6.
- Sathe SK, Kshirsagar HH, Sharma GM. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. *Plant Foods Hum Nutr* 2012;67(3):247-55.
- Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, et al. Chemical characterization of Sachachi Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *J Agric Food Chem* 2011;59(24):13043-9.
- Alhakmani F, Kumar S, Khan SA. Estimation of total phenolic content, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3:623-7.
- Padmanabhan P, Jangle S.N. Evaluation of *in-vitro* anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *Int J Basic App Med Scie* 2012;1:109-16.
- Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2:5178-80.
- Sabina EP, Rasool M. An *in vivo* and *in vitro* potential of Indian ayurvedic herbal formulation Triphala on experimental gouty arthritis in mice. *Vascul Pharm* 2008;48:14-20.
- Martínez NE, Añón MC. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J Agric Food Chem* 1996;44:2523-30.
- Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas MV. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *J Food Prot* 2014;77(10):1732-9.
- Jiménez-Saiz R, Martos G, Carrillo W, López-Fandiño R, Molina E. Susceptibility of lysozyme to *in-vitro* digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chem* 2011;127:1719-26.
- Martos G, Contreras P, Molina E, López-Fandiño R. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2010;58(9):5640-8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of

- the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
16. Padmanabhan P, Jangle SN. Evaluation of *in-vitro* anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *Int J Basic Appl Med Sci* 2012;2:109-16.
  17. Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2012:S178-80.
  18. Romero-Zepeda H, Paredes-Lopez O. Isolation and characterization of amaranthin. The 11S amaranth seed globulin. *J Food Chem* 1996;19:329-39.
  19. Wolf WJ. Purification and properties of the proteins. In: Smith AK, Circle SJ, editors. *Soybean: Chemistry and Technology. Proteins. Vol. 1.* New York: Van Nostrand Reinhold AVI; 1980. p. 93-115.
  20. Czubinski J, Dwiecki K, Siger A, Neunert G, Lampart-Szczapa E. Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. *Food Chem* 2014;143:418-26.
  21. Brinegar C, Sine B, Nwokocha L. High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J Agric Food Chem* 1996;44:1621-3.
  22. Carbonaro M, Maselli P, Nucara A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Res Int* 2015;76:19-30.
  23. Carbonaro M. 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspect on the nutritional quality. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:2620-6.
  24. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M. Heat-induced denaturation impairs digestibility of legume (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vicia faba* L.) 11S and 7S globulins in the small intestine of rat. *J Sci Food Agric* 2005;85:65-72.
  25. Faris RJ, Wang H, Wang T. Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bonds with thioredoxin. *J Agric Food Chem* 2008;56:7146-50.
  26. Lee HW, Keum EH, Lee SJ, Sung DE, Chung DH, Lee SI, et al. Allergenicity of proteolytic hydrolysates of the soybean 11S globulin. *J Food Sci* 2007;72(3):C168-72.