



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



Tema: Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, actividades antiinflamatoria y antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos extraídos de harina de gandul (*Cajanus cajan*)

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

Trabajo que forma parte del proyecto: “**VALORIZACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE ALIMENTOS TRADICIONALES DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA**” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución **0248-CU-P-2017**.

Autora: Katherine Narcisa López Yagual

Tutora: Mg. Cecilia Mercedes Carpio

AMBATO - ECUADOR

Enero - 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Cecilia Mercedes Carpio

CERTIFICO:

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, 02 de enero del 2019



Mg. Cecilia Mercedes Carpio

C.I. 170462765-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Katherine Narcisa López Yagual, manifiesto que los resultados obtenidos en el Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Katherine Narcisa López Yagual

C.I. 092917456-3

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



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



PhD. Dayana Cristina Morales Acosta
C.I. 180413557-0

Ambato, 23 de enero del 2019

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los derechos 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 esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Katherine Narcisa López Yagual

C.I. 092917456-3

AUTORA

DEDICATORIA

“El mundo está en manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños”

Paulo Coelho.

Siempre existe un motivo para levantarse y luchar día a día; en mi vida, mi motivo siempre has sido tú, *Rocío*, mamá, amiga, compañera, guerrera y mi más grande ejemplo a seguir. Sin tus palabras de aliento, amor y comprensión, llegar hasta aquí, habría sido imposible. Eres y serás el motor y la razón de mi vida.

A mi hombre ideal y amor de mi vida, papá, *Luis*, con tu perseverancia, esfuerzo, lucha constante y dedicación sin tener nada me lo diste TODO. Confiaste en mí, en mis anhelos y expectativas y así, logramos que este sueño se convierta en realidad, nuestra realidad.

A mis hermanas, *Ana* y *Gladys*, que con sus ocurrencias, mensajes de apoyo y sobretodo con su cariño me brindaron las fuerzas para no desfallecer. Juntas de la mano eternamente, logremos que nuestros padres se sientan orgullosos de tenernos.

A mi sobrina, *Charlotte*, el mejor regalo que pude recibir, con tu inocencia, ternura y amor llenaste de luz mis días e hiciste que la distancia se reduzca a nada con tan solo escuchar tu voz.

A mi abuelita *Gladys*, por el gran amor brindado, por ser mi segunda madre, por sus consejos y cuidados. A mi abuelito *Amador* (+), desde el cielo sé que te alegras y te sientes orgulloso de mí.

Wendy.

AGRADECIMIENTO

A mi familia, mi vida, MI TODO, por confiar en mi, por su apoyo, amor y dedicación para que mis metas se cumplan, muchas veces por encima de las suyas, este logro es más de uds que mío. Gracias por todo lo que me han brindado y perdón por si alguna vez les fallé.

A la Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por acogerme en sus aulas y contribuir en mi desarrollo profesional.

A la Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL) por facilitar la matriz, base de esta investigación.

A la Mg. Cecilia Carpio, tutora de este trabajo de investigación, por compartir su tiempo y conocimientos de manera desinteresada, por su guía y predisposición para resolver en cualquier momento las dudas e inconvenientes presentados durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por la paciencia.

A la Dra. Mayra Paredes responsable del proyecto del cual se derivó el presente trabajo, por permitirme colaborar en el mismo, por la confianza y por estar constantemente pendiente del desarrollo y culminación de la investigación.

A la Dra. Dayana Morales por la entrega y comprensión, constituyó una de las guías más importantes de este trabajo.

Al Dr. Jorge Briceño, por su preocupación, amistad sincera, palabras de aliento y por su extraordinaria forma de ser, en poco tiempo se convirtió en un gran apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal.

A la Ing. Tatiana Poveda, por ser el punto de partida y un pilar fundamental en el desarrollo de esta investigación, por sus consejos, paciencia y por siempre estar dispuesta a escuchar y resolver cualquier problema.

A mis compañeros Adolfo, Diego, Pedrito y Peque, por todas las aventuras. Aunque sigamos caminos distintos, siempre los recordaré compitas.

A Fernanda A, mi eterna y gran amiga, gracias por tus consejos, mensajes y llamadas de apoyo cuando veía mi mundo caer. Eres increíble y parte esencial en mi vida. Seguiremos en las buenas y en las malas pero sobre todo, seguiremos triunfando juntas.

¡GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
RESUMEN	xx
<i>ABSTRACT</i>	xxi
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3. Hipótesis.....	5
1.4. Señalamiento de las variables de las hipótesis	8
CAPÍTULO II.....	9
METODOLOGÍA.....	9
2.1. Materiales.....	9
2.1.1. Materia prima	9
2.1.2. Insumos y utensilios	9
2.1.3. Equipos	10
2.1.4. Reactivos.....	10
2.2. Métodos.....	11
2.2.1. Determinación del contenido de humedad.....	11
2.2.2. Desengrasado de la harina.....	12
2.2.3. Obtención de los concentrados proteicos.....	12
2.2.4. Caracterización del concentrado proteico	13
2.2.5. Obtención de los hidrolizados proteicos	17

2.2.7. Actividades Biológicas	19
CAPÍTULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1. Análisis y discusión de los resultados.....	22
3.1.1. Análisis proximal de la harina de gandul (<i>Cajanus cajan</i>).....	22
3.1.2. Contenidos de grasa y humedad	23
3.1.3. Obtención de los concentrados proteicos.....	24
3.1.4. Caracterización del concentrado proteico	27
3.1.5. Obtención de hidrolizados proteicos	36
3.1.6. Simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal <i>in vitro</i> de los concentrados proteicos.....	37
3.1.7. Actividades Biológicas	40
3.2. Verificación de hipótesis	50
CAPÍTULO IV	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
4.1. Conclusiones	52
4.2. Recomendaciones	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Estándares de N preparados con la dilución 1/5 del digerido de (NH₄)₂SO₄</i>	15
Tabla 2. <i>Análisis proximal de la harina de gandul (Cajanus cajan) en base seca</i>	22
Tabla 3. <i>Contenido de grasa y humedad de la harina de gandul (Cajanus cajan)</i>	23
Tabla 4. <i>Rendimiento de los concentrados de gandul maduro preparados a diferentes valores de pH de precipitación</i>	26
Tabla 5. <i>Análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro; verificación de varianza</i>	27
Tabla 6. <i>Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método espectrofotométrico Biuret</i>	28
Tabla 7. <i>Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl</i>	29
Tabla 8. <i>Análisis estadístico del contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl; verificación de varianza</i>	29
Tabla 9. <i>Análisis estadístico del contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl; pruebas de múltiples rangos</i>	30
Tabla 10. <i>Actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0</i>	41
Tabla 11. <i>Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0; comparación múltiple</i>	41
Tabla 12. <i>Actividad antiinflamatoria del diclofenaco de sodio, 75mg/3mL, MK[®]</i>	42
Tabla 13. <i>Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico obtenido a partir del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0</i>	43
Tabla 14. <i>Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0; comparación múltiple</i>	44

Tabla 15. <i>Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0</i>	45
Tabla 16. <i>Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0: pruebas de múltiples rangos</i>	46
Tabla 17. <i>Actividad antioxidante del BHT</i>	47
Tabla 18. <i>Actividad antioxidante del hidrolizado proteico obtenido a partir del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0</i>	48
Tabla 19. <i>Actividad antioxidante del hidrolizado proteico de gandul maduro: pruebas de múltiples rangos</i>	48
Tabla 20. <i>Datos obtenidos para el cálculo del contenido de humedad en la harina de gandul verde</i>	68
Tabla 21. <i>Datos obtenidos para el cálculo del contenido de humedad en la harina de gandul maduro</i>	68
Tabla 22. <i>Datos obtenidos para el cálculo del contenido de grasa en la harina de gandul verde</i>	68
Tabla 23. <i>Datos obtenidos para el cálculo del contenido de grasa en la harina de gandul maduro</i>	69
Tabla 24. <i>Rendimiento proteico del gandul maduro con corrección del contenido de humedad y grasa</i>	70
Tabla 25. <i>Resumen del análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación</i>	70
Tabla 26. <i>Resumen del análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación</i>	70
Tabla 27. <i>ANOVA para el rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación</i>	70
Tabla 28. <i>Pruebas de múltiple rangos para el rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación</i>	71
Tabla 29. <i>Datos para la construcción de la curva estándar de pepsina</i>	72
Tabla 30. <i>Valores de absorbancia a 540 nm del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0</i>	73
Tabla 31. <i>Contenido proteico del concentrado de gandul maduro preparado a pH 4,0</i>	73
Tabla 32. <i>Datos de los estándares de N</i>	74

Tabla 33. <i>Datos de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	74
Tabla 34. <i>Valores de absorbancia (645 nm) de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	74
Tabla 35. <i>Concentración de N de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	75
Tabla 36. <i>Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	75
Tabla 37. <i>Resumen estadístico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	75
Tabla 38. <i>ANOVA para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación</i>	75
Tabla 39. <i>Medias para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación con intervalos de confianza del 95,0 %</i>	76
Tabla 40. <i>Verificación de Varianza para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro por valor de pH de precipitación</i>	76
Tabla 41. <i>Valores de absorbancia (660 nm) del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0</i>	77
Tabla 42. <i>Porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0</i>	77
Tabla 43. <i>Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0</i>	77
Tabla 44. <i>ANOVA para la actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0</i>	78
Tabla 45. <i>Medias para la actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %</i>	78
Tabla 46. <i>Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración</i>	79
Tabla 47. <i>Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración</i>	79

Tabla 48. Valores de absorbancia (660 nm) del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0.....	80
Tabla 49. Porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0.....	80
Tabla 50. Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0	80
Tabla 51. ANOVA para la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0.....	81
Tabla 52. Medias para la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %.....	81
Tabla 53. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 por concentración	81
Tabla 54. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 por concentración	82
Tabla 55. Valores de absorbancia (660 nm) del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL.....	83
Tabla 56. Porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL	83
Tabla 57. Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL.....	83
Tabla 58. ANOVA para actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL	83
Tabla 59. Medias para la actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL con intervalos de confianza del 95,0 %	84
Tabla 60. Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK [®] en ampolla de 75mg/3mL.....	84
Tabla 61. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del DICLOFENACO MK [®] en ampolla de 75mg/3mL por concentración	84
Tabla 62. Valores de absorbancia (532 nm) del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0.....	85

Tabla 63. <i>Porcentaje de actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0.</i>	85
Tabla 64. <i>Resumen estadístico de la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0</i>	85
Tabla 65. <i>ANOVA para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0.</i>	86
Tabla 66. <i>Medias para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %</i>	86
Tabla 67. <i>Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración.</i> ..	86
Tabla 68. <i>Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración.</i> ..	87
Tabla 69. <i>Valores de absorbancia (660 nm) del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0.</i>	88
Tabla 70. <i>Porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0</i>	88
Tabla 71. <i>Resumen estadístico de la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0</i>	88
Tabla 72. <i>ANOVA para la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0</i>	89
Tabla 73. <i>Medias para la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %</i>	89
Tabla 74. <i>Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 por concentración.</i>	89
Tabla 75. <i>Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 por concentración</i>	90
Tabla 76. <i>Valores de absorbancia (532 nm) del BHT</i>	91
Tabla 77. <i>Porcentaje de actividad antioxidante del BHT</i>	91
Tabla 78. <i>Resumen estadístico de la actividad antioxidante del BHT</i>	91
Tabla 79. <i>ANOVA para la actividad antioxidante del BHT</i>	91

Tabla 80. <i>Medias para la actividad antioxidante del BHT</i>	92
Tabla 81. <i>Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del BHT por concentración</i>	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Precipitación isoelectrica de la proteína del gandul verde: A a pH 6,0; B a pH 5,0; C a pH 4,0 y D a pH 3,0	25
Figura 2. Perfil electroforético de los concentrados de gandul verde en SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i>	31
Figura 3. Perfil electroforético de los concentrados proteicos de gandul verde en SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i> . ..	32
Figura 4. Perfil electroforético de las proteínas del gandul maduro en SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i>	33
Figura 5. Perfil electroforético de los concentrados proteicos de gandul maduro en SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i> . ..	34
Figura 6. Electroforesis nativa (NATIVE-PAGE) de los concentrados proteicos de gandul verde precipitados a diferentes valores de pH. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i>	35
Figura 7. Electroforesis nativa (NATIVE-PAGE) de los concentrados proteicos de gandul maduro precipitados a diferentes valores de pH. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM)</i>	36
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol del concentrado proteico y de los productos de la simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal <i>in vitro</i> del concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM), concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0 (CP)</i>	38
Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol del concentrado proteico y de los productos de la simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal <i>in vitro</i> del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0. <i>Estándar preteñido de pesos moleculares (PM), concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0 (CP)</i>	39
Figura 10. Comparación de medias para la actividad antiinflamatoria en el concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0.	42
Figura 11. Actividad antiinflamatoria del concentrado e hidrolizado de gandul maduro (GM) y del diclofenaco MK® en ampolla de 75mg/3mL.	44

Figura 12. Comparación de medias para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0.....	46
Figura 13. Actividad antioxidante del concentrado e hidrolizado proteico de gandul maduro (GM) y del BHT.....	49
Figura 14. Curva estándar de pepsina.....	72
Figura 15. Curva estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	73
Figura 16. Medias para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %	82
Figura 17. Medias para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %	90
Figura 18. Medias para el porcentaje de actividad antioxidante del BHT con intervalos de confianza del 95,0 %.....	92
Figura 19. Harina de gandul verde y harina de gandul maduro procedentes de la ESPOL	93
Figura 20. Solubilización de la proteína del gandul verde.....	93
Figura 21. Solubilización de la proteína del gandul maduro.....	93
Figura 22. Precipitación isoeléctrica de la proteína del gandul verde	94
Figura 23. Precipitación isoeléctrica de la proteína del gandul maduro	94
Figura 24. Proteína del gandul verde precipitada a pH 3,0.....	94
Figura 25. Proteína del gandul maduro precipitada a pH 4,0.....	94
Figura 26. Liofilización de la proteína precipitada del gandul verde (pH 3,0) y del gandul maduro (pH 4,0)	95
Figura 27. Cuantificación proteica de la proteína del gandul maduro	95
Figura 28. Concentrados proteicos de gandul maduro obtenidos a los diferentes valores de pH de precipitación	96
Figura 29. Digestión por MicroKjeldahl de los concentrados proteicos de gandul maduro	96
Figura 30. Digestión en MicroKjeldahl de los concentrados proteicos de gandul maduro preparados a diferentes valores de pH.....	96
Figura 31. Actividad Antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0 (desnaturalización de la proteína)	97

Figura 32. Actividad Antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0. A Preparación de la muestra B Incubación de la muestra.....97

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT	Butil-hidroxitolueno
Cl	Cloro
CuSO₄·5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
C₂H₅OH	Etanol
C₄H₄KNaO₆·4H₂O	Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado
C₆H₁₄	Hexano
C₇H₅NaO₃	Salicilato de sodio
C₇H₅NaO₃-Na₂[Fe(CN)₅NO]	Salicilato de sodio-nitroprusiato
E:S	Enzima:Sustrato
FGS	Fluido gástrico simulado
HCl	Ácido clorhídrico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
kDa	KiloDalton
KI	Yoduro de potasio
K₂SO₄	Sulfato de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
Na₂[Fe(CN)₅NO]	Nitroprusiato
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na₂HPO₄	Hidrógenofosfato disódico anhidro
NaH₂PO₄·H₂O	Dihidrógenofosfato de sodio monohidratado
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
PSA	Persulfato de amonio
p/v	Peso/volumen
Rpm	Revoluciones por minuto
Se	Selenio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEMED	Tetrametiletildiamina

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, las actividades antiinflamatoria y antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos extraídos de la harina de gandul (*Cajanus cajan*) producida en Ecuador. Se trabajó con harina de gandul verde y harina de gandul maduro. Los concentrados proteicos se obtuvieron por precipitación isoeléctrica a diferentes valores de pH (6,0; 5,0; 4,0; 3,0) luego de solubilizar la proteína a pH 8,0. En el gandul verde se obtuvo el mayor porcentaje de precipitación isoeléctrica (0,62 %) a pH 3,0 mientras que para el gandul maduro la máxima precipitación (11,35 %) se alcanzó a pH 4,0.

La caracterización proteica se realizó mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, identificándose en los concentrados globulinas 7S y 11S. En el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* se observó que las fracciones proteicas tanto de gandul verde como de gandul maduro presentan resistencia a la acción enzimática.

Finalmente, se determinó la actividad antiinflamatoria y antioxidante en el concentrado e hidrolizado de gandul maduro, encontrando mayor actividad en el hidrolizado proteico con valores de 66,0 % y 57,47 %, respectivamente.

Palabras clave: actividades biológicas, *Cajanus cajan*, digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, hidrolizados proteicos, leguminosas.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the of *in vitro* gastrointestinal digestibility, anti-inflammatory and antioxidant activities in protein concentrates and hydrolyzates extracted from pigeon pea (*Cajanus cajan*) meal produced in Ecuador. Experimental work was done with green and mature pigeon pea meal. The protein concentrates were obtained by isoelectric precipitation at different pH values (6.0, 5.0, 4.0, 3.0) after protein solubilization at pH 8.0. In green pigeon pea the highest percentage of isoelectric precipitation (0.62 %) was obtained at pH 3.0 while it was produced at pH 4.0 in mature pigeon pea (11.35 %).

Protein characterization was carried out using the SDS-PAGE electrophoresis technique, 7S and 11S globulins were identified in these concentrates. At the end of *in vitro* gastrointestinal digestion, it was observed that the protein fractions of both green pigeon pea and mature pigeon pea show resistance to enzymatic action.

Finally, the anti-inflammatory and antioxidant activities in the concentrate and hydrolyzates of mature pigeon pea were determined, it was found greater activities in the protein hydrolyzate with 66.0 % and 57.47 % values, respectively.

Keywords: biological activities, *Cajanus cajan*, *in vitro* gastrointestinal digestibility, protein hydrolyzates, legumes.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Las leguminosas son plantas que contienen frutos o semillas que son comestibles, pertenecen a la familia *Leguminosae*, constituyen una fuente relevante de carbohidratos como el almidón (50,0-65,0 %) y de fibra dietética (10,0-20,0 %), presentan contenidos bajos de lípidos (0,8 a 2,0 %) y poseen una cantidad y calidad proteica que complementa a los cereales, aportan vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, niacina y folacina) y minerales (hierro y calcio) (**Granito et al., 2010; Lqari et al., 2002**).

Dentro de este grupo de leguminosas se encuentra el gandul (*Cajanus cajan*) conocido también como guandú o quinchoncho (**FAO, 2007a**), es una leguminosa de grano con elevado valor nutritivo, procedente de la India, considerada como una planta forrajera y un arbusto perenne que crece de 1-3 metros de altura, además representa una fuente importante de proteína (18,0-25,0 %) (**Torres et al., 2006; Torres & Guerra, 2003**). **Pal et al. (2011)** mencionan que las funciones farmacológicas que posee son diversas, destacándose el efecto antimicrobiano, la actividad hipocolesterolemica, la actividad antidiabética, las propiedades neuroactivas y antioxidantes; su actuación como anticancerígeno, hepatoprotector y antihelmíntico.

Por otra parte, en la investigación realizada por **Drago et al. (2007)** establecieron que 100 g de grano seco de gandul contiene 15,2 % de humedad; 22,3 % de proteína; 1,7 % de grasa; 3,6 % de cenizas; 57,2 % de carbohidratos; caroteno evaluado como vitamina A 220 UI y vitamina B1 0,72 mg; constituyéndose la harina de gandul como una opción para la elaboración de productos con alto contenido de proteína que conlleve al aumento del valor nutricional de los mismos.

Ruiz et al. (2014) consideran que las proteínas, hidrolizados y péptidos de origen vegetal podrían llegar a ser utilizados como nutracéuticos, como parte de la

formulación de alimentos funcionales o en la producción de medicamentos de origen natural, debido a los efectos benéficos que ejercen sobre la salud. Por otro lado, el interés en los aislados y concentrados proteicos para la fabricación de alimentos funcionales sigue vigente (**Granado & Hernández, 2016**).

En cuanto a esto, **Abugoch et al. (2008)** mencionan que para la obtención de los concentrados proteicos se deben considerar dos parámetros, la solubilidad de la proteína, la misma que se realiza en medio básico (pH 11,0-8,0) y la precipitación isoelectrica que se lleva a cabo en medio ácido (pH 6,0-4,0). Respecto a este tema, **Betancur et al. (2004)** y **Morales et al. (2007)** definen a la precipitación isoelectrica como un proceso que permite el fraccionamiento en húmedo de los diferentes componentes de la harina, mediante la solubilización de las proteínas en un medio alcalino y su posterior precipitación en medio ácido y que a causa del bajo costo y la simplicidad de los equipos requeridos, es el método de aislamiento más comúnmente empleado en la producción comercial de proteínas a partir de leguminosas.

En el estudio de las propiedades funcionales de la harina y del concentrado de gandul realizado por **Mizubuti et al. (2000)** se reportan datos de solubilidad del 80,0 % a pH 9,0; 25,62 % a pH 4,5 y 60 % a pH 2,5 para la harina y de >90,0 % a pH 9,0; 27,82 % a pH 4,5 y >90,0 % a pH 2,5 para el concentrado; así mismo, **Torres (2001)** empleando agua como solvente evaluó la solubilidad proteica de la harina de gandul y determinó que los valores máximos y mínimos se encontraban cercanos al pH 8,0 y pH 4,0 respectivamente, debido a que las proteínas de los alimentos exhiben una solubilidad mínima a pH 4,0-5,0 (pH isoelectrico) y máxima a pH alcalino (**Damodaran, 2010**), además el mismo autor hace referencia que como la mayor parte de las proteínas son solubles a pH alcalino (8,0-9,0), la extracción de las proteínas de fuentes vegetales, se lleva a cabo a estos valores de pH para posteriormente recuperar la proteína del extracto por precipitación isoelectrica a pH 4,5-4,8.

Herrera et al. (2003) y **Segal & Ortega (2010)** mencionan que para continuar con estudios como la caracterización, propiedades funcionales y digestibilidad de las proteínas es necesario realizar la cuantificación proteica, para esto existen varios métodos colorimétricos como Biuret, Lowry, Bradford y BCA, siendo Biuret el método más simple y económico. La reacción en este método se caracteriza por una

coloración púrpura formada cuando los iones cúpricos se unen a los enlaces peptídicos a pH alcalino, la reacción es bastante específica, por lo tanto se prevé exista poca interferencia de sustancias no proteicas, el matiz del color y su intensidad dependen del contenido y tipo de proteína presente. **Sangronis et al. (2004)** y **Oshodi et al. (2009)** realizaron por dicho método la cuantificación del contenido proteico presente en la harina de gandul reportando los valores de 21,7 % y 22,4 % respectivamente.

La electroforesis es igualmente una técnica empleada para la caracterización de proteínas, mediante la cual es posible separar moléculas biológicas basándose en la carga y peso molecular, forzándolas a penetrar por una matriz porosa bajo la acción de un campo eléctrico. En la SDS-PAGE, la separación ocurre en función del tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas (**Córsico et al., 2013; Maldonado & Jorrín, 2001; Rivera, 2006**).

Betancur et al. (2009) recomiendan realizar la hidrólisis enzimática a los concentrados obtenidos con el fin de mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las proteínas, logrando mejorar la solubilidad, absorción y biodisponibilidad, sin afectar el valor nutrimental. La hidrólisis enzimática se ha propuesto como un método prometedor para aumentar la digestibilidad de las proteínas y para obtener hidrolizados con propiedades nutricionales y funcionales mejoradas (**Korhonen & Pihlanto, 2006; Morris et al., 2009**).

La obtención de péptidos bioactivos debe cumplir dos criterios: añadir valor a proteínas abundantes (poco convencionales) y emplear proteínas con secuencias aminoacídicas de interés farmacológico (**Udenigwe & Aluko, 2012**). Se han revelado estudios que destacan las múltiples bioactividades en hidrolizados de proteínas vegetales las mismas que ocurren por la liberación enzimática de compuestos fenólicos y péptidos bioactivos; **Kong et al. (2010)** y **Oseguera (2009)** señalan que el gandul es una fuente rica de dichos compuestos y péptidos, que se obtienen en el proceso gastrointestinal como consecuencia de la digestión mediante hidrólisis enzimática (proteasas y sales biliares) de la proteína.

Kong et al. (2010) y **Wu et al. (2009)** reportan estudios que demuestran la existencia de actividades antioxidante y antiinflamatoria en el gandul atribuyéndolas a la

presencia de componentes bioactivos como saponinas, taninos, azúcares reductores, resinas, pinostrobinina y terpenoides; adicionalmente **Zhang et al. (2010)** y **Pal et al. (2011)** en sus estudios químicos encontraron que el gandum contiene dos isoflavonoides (genisteína y genistina) que poseen actividad antioxidante, los cuales pueden ser excelentes antioxidantes naturales potencialmente aplicables a la medicina y a la industria alimenticia; **Wu et al. (2009)** y **Muñoz (2008)** reportaron valores de $94,13 \% \pm 3,41$ y $88,43 \% \pm 3,74$ respectivamente como la máxima capacidad de inhibición; en lo referente a la actividad antiinflamatoria, **Nicholson et al. (2010)** aislaron una flavanona (pinostrobinina,) que posee propiedades antiinflamatorias significativas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar el grado de digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, actividades antiinflamatoria y antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos extraídos de harina de gandum (*Cajanus cajan*)

1.2.2. Objetivos Específicos

- Aislar las proteínas presentes en harinas de gandum (*Cajanus cajan*) mediante precipitación isoeléctrica a diferentes valores de pH.
- Caracterizar las proteínas aisladas de harina de gandum (*Cajanus cajan*) mediante electroforesis SDS-PAGE.
- Cuantificar mediante el método espectrofotométrico de Biuret el contenido proteico de las proteínas aisladas de harina de gandum (*Cajanus cajan*)
- Simular condiciones fisiológicas para la hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de gandum (*Cajanus cajan*)
- Determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* (método de desnaturalización de proteína) y actividad antioxidante (método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS)

1.3.Hipótesis

Tema: Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, actividades antiinflamatoria y antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos extraídos de harina de gandul (*Cajanus cajan*)

1.3.1. Rendimiento de las proteínas presentes en harinas de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro aisladas mediante precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH.

Hipótesis Nula

La precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) no influye en el rendimiento y caracterización de las proteínas presentes en harinas de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro.

Hipótesis Alternativa

La precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) influye en el rendimiento y caracterización de las proteínas presentes en harinas de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro.

1.3.2. Contenido proteico de las proteínas aisladas de harina de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro

Hipótesis Nula

Los precipitados de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro obtenidos a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) mediante precipitación isoelectrica no varían en cuanto a su contenido proteico.

Hipótesis Alternativa

Los precipitados de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro obtenidos a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) mediante precipitación isoelectrica varían en cuanto a su contenido proteico.

1.3.3. Hidrólisis enzimática del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro

Hipótesis Nula

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro no es digerido en su totalidad durante la simulación *in vitro* de la digestión gástrica y duodenal.

Hipótesis Alternativa

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro es digerido en su totalidad durante la simulación *in vitro* de la digestión gástrica y duodenal.

1.3.4. Actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*)

Hipótesis Nula

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) no presenta actividad antiinflamatoria comparable con el antiinflamatorio comercial diclofenaco de sodio, 75mg/3mL, MK[®].

Hipótesis Alternativa

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) presenta actividad antiinflamatoria comparable con el antiinflamatorio comercial diclofenaco de sodio, 75mg/3mL, MK[®].

1.3.5. Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*)

Hipótesis Nula

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) no presenta

actividad antioxidante comparable con el antioxidante comercial BHT.

Hipótesis Alternativa

El concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) presenta actividad antioxidante comparable con el antioxidante comercial BHT.

1.3.6. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*)

Hipótesis Nula

El hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) no presenta actividad antiinflamatoria comparable con el antiinflamatorio comercial diclofenaco de sodio, 75 mg/3 mL, MK[®].

Hipótesis Alternativa

El hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) presenta actividad antiinflamatoria comparable con el antiinflamatorio comercial diclofenaco de sodio, 75 mg/3 mL, MK[®].

1.3.7. Actividad antioxidante del hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*)

Hipótesis Nula

El hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) no presenta actividad antioxidante comparable con el antioxidante comercial BHT.

Hipótesis Alternativa

El hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro evaluado a diferentes concentraciones (1000; 500; 200 y 100 µg/mL) presenta actividad antioxidante comparable con el antioxidante comercial BHT.

1.4. Señalamiento de las variables de las hipótesis

1.4.1. Variable Independiente

Diferentes valores de pH de precipitación (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0)

Diferentes valores de concentración (1000; 500; 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$) del concentrado e hidrolizado proteico.

1.4.2. Variable Dependiente

Rendimiento proteico

Contenido proteico

Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Actividad antiinflamatoria

Actividad antioxidante

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Las pruebas experimentales fueron realizadas en el laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Todos los reactivos utilizados en los ensayos fueron de grado analítico.

2.1. Materiales

2.1.1. Materia prima

La harina necesaria para la ejecución de este trabajo de investigación fue proporcionada por el proyecto REDU-Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.1.2. Insumos y utensilios

Balones de aforo (10 mL, 250 mL, 1000 mL)	Propipetas
Balones para MicroKjeldahl (100 mL)	Puntas para Micropipetas
Cajas petri	Tiras medidoras de pH
Envases de plástico	Tubos de centrifuga FALCON (15 mL, 50 mL)
Micropipetas (10 uL, 20 uL, 100 uL, 1000 uL)	Tubos de ensayo con tapa rosca (20 mL, 30 mL)
Pipetas graduadas (5 mL, 10 mL)	Tubos Eppendorf (1,5 mL, 2 mL)
Probetas graduadas (10 mL, 50 mL, 500 mL, 1000 mL)	Vasos de precipitación (100 mL, 200 mL, 250 mL, 400 mL, 500 mL, 1000 mL)

2.1.3. Equipos

Balanza analítica, VWR, 224AC	Estufa, VWR
Centrífuga, EPPENDORF, 5702	Incubadora, VWR
Congelador, MABE -20 °C	Liofilizador, BENCH TOP PRO WITH OMNITRONICS, BTP-3ES0VW
Congelador Ultra-Low Temperature Freezer MDF-U33V, PANASONIC -80 °C	Microcentrífuga, LABNET, C2400-B
Desecador	Microincubador, ESCO, PROVOCELL® SHAKING
Equipo de electroforesis, MINI-PROTEAN® TETRA SYSTEM BIO-RAD	pH-metro, METTLER TOLEDO y Thermo SCIENTIFIC™
Equipo Soxhlet	Plancha de calentamiento con agitación magnética, VWR
Espectrofotómetro convencional de haz simple HACH, DR-500	Refrigerador, INDURAMA, RI-470 -4 °C
Espectrofotómetro, Thermo SCIENTIFIC™, UV-Visible, EVOLUTION 201	Vórtex, VWR

2.1.4. Reactivos

Aceite de oliva, ARBOLITO	Hidróxido de sodio, MERCK
Ácido acético glacial 100 %, MERCK	Metanol, MERCK
Ácido clorhídrico fumante 37 %, MERCK	Nitroprusiato, MERCK
Ácido tiobarbitúrico, PANREAC	Pancreatina, SIGMA
Acrilamida, INVITROGEN	Pepsina gástrica porcina, SIGMA
Azul de Coomassie R-250, BP101-25, FISHER SCIENTIFIC	Persulfato de amonio, # 161-0716, BIO-RAD
Bicarbonato de sodio, J.T. BAKER	Sales biliares, SIGMA
Butil hidroxi tolueno, VULKANOX	Salicilato de sodio, MERCK

Cloruro de sodio, MERCK	Selenio, MERCK
Diclofenaco de sodio, 75 mg/3 mL, MK [®]	Soluciones buffer para medidor de pH (10,0; 7,0 y 4,0), THERMO SCIENTIFIC [™]
Dodecil sulfato de sodio, # 161-0302, BIO-RAD	Sulfato de amonio, MERCK
Etanol 96 %, MERCK	Sulfato de potasio, MERCK
Enzimas proteolíticas para digestión <i>in vitro</i> , SIGMA	Sulfato de cobre, MERCK
Estándar de proteínas preteñido, #161-0377, BIO-RAD	Tartrato de sodio y potasio, MERCK
Glicerol, # 15514-011, INVITROGEN	Tetrametiletilendiamina, INVITROGEN
Glicina, # 161-0724, BIO-RAD	Yoduro de potasio, MERCK
Hexano 96 %, MERCK	2-mercaptoetanol, # 161-0710, BIO-RAD

2.2. Métodos

2.2.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo al Método Oficial de Análisis de la Organización Americana de Químicos Analíticos (AOAC, 2012). Se pesaron las cajas petri limpias y secas, las mismas que contenían 3 g de la harina, posteriormente se colocaron en la estufa VWR a 58 °C durante 4 días. Finalmente se realizó el cálculo del porcentaje de humedad en base seca aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hbs} = \frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_s} * 100 \quad [Ec1]$$

Siendo:

%Hbs: Humedad en base seca

m_{H2O}: Peso del agua presente en la harina

m_s: Peso final de la harina de gandul secada en la estufa

2.2.2. Desengrasado de la harina

Para el desengrasado de la harina se utilizó el método de Soxhlet descrito por **Wayne (2017)**. Se pesó por diferencia y por triplicado 2 g de la harina seca de gandul, se colocó en el equipo Soxhlet, y se realizó la extracción con hexano (C₆H₁₄) durante 6 h. Finalmente se recuperó el solvente en el mismo Soxhlet, y se eliminaron los residuos del solvente del material graso y de la harina en una estufa VWR a 58 °C.

2.2.3. Obtención de los concentrados proteicos

La harina de gandul (*Cajanus cajan*) seca y desengrasada fue empleada para la obtención de los concentrados proteicos mediante precipitación isoeléctrica, de acuerdo al protocolo descrito por **Martínez & Añón (1996)** empleando una hora de agitación en lugar de 15 minutos. El proceso se realizó con 10 g de la harina que fue suspendida en 100 mL de agua destilada relación 1:10 (p/v). Se ajustó al pH de solubilización (pH 8,0) con adición de NaOH 1 M y se mantuvo en agitación (300 rpm) durante una hora controlando regularmente que el pH se mantenga en el valor fijado. Posteriormente se centrifugó la suspensión durante 1 h (4400 rpm) y se descartó el precipitado, los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a pH de precipitación (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) con adición de HCl 1 M permaneciendo 5 minutos en agitación (200 rpm). El resultante fue almacenado a 4 °C durante 24 h para lograr la precipitación de la proteína, se eliminaron los sobrenadantes por centrifugación y los precipitados obtenidos fueron almacenados bajo ultracongelación a -80 °C en frascos de plástico estériles para finalmente ser liofilizados bajo condiciones estándares del equipo Bench Top Pro, BTP-3ES0VW. El protocolo

se realizó por triplicado tanto en la harina de gandul verde como en la harina de gandul maduro.

Una vez liofilizada la muestra se realizó el cálculo del porcentaje de rendimiento de la proteína en relación a la harina inicial aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \mathbf{R} = \frac{\mathbf{Pf}}{\mathbf{P0}} * 100 * 1 - \frac{\% \mathbf{Grasa}}{100} * 1 - \frac{\% \mathbf{Humedad}}{100} \quad [\text{Ec2}]$$

Siendo:

%R: Rendimiento de extracción de la proteína de gandul

Pf: Peso final del precipitado después del proceso de liofilización

P0: Peso inicial de la harina de gandul seca y desengrasada

2.2.4. Caracterización del concentrado proteico

2.2.4.1. Cuantificación proteica

MÉTODO 1: Se aplicó el método espectrofotométrico de Biuret, de acuerdo al protocolo descrito por **Chang (2010)**, para lo cual se pesaron por duplicado, en tubos eppendorf, 10 mg de la proteína liofilizada obtenida a pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0; se añadió 1 mL de agua destilada y 200 µL de NaOH 0,2 M; la mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos (400 rpm); se tomaron de cada réplica dos alícuotas de 250 µL de dicha mezcla y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, a continuación se añadió 1,25 mL del reactivo de Biuret (relación 1:5 v/v) y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Por último, se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro convencional de haz simple HACH, DR 5000 frente a un blanco preparado con 1 mL de agua destilada y 200 µL de NaOH 0,2 M.

Preparación del reactivo de Biuret: se preparó con 9 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 5 g de KI, disueltos en ese orden en 400 mL de NaOH 0,2 M, aforándose a 1000 mL con agua destilada.

MÉTODO 2: se aplicó el método de digestión en microKjeldahl, de acuerdo al protocolo descrito por **Nkonge & Ballance (1982)** con ligeras modificaciones.

Digestión en microKjeldahl: se pesó por diferencia, 50 mg del concentrado proteico y se registró el peso; se añadió el catalizador y 3,5 mL de H₂SO₄ concentrado. La digestión de la muestra se realizó mediante calentamiento de la mezcla en balones para microKjeldahl de 100 mL, una vez que la solución se aclaró, se calentó el digerido por 20 minutos más, se mezcló el contenido del balón y se repitió el proceso hasta digestión completa. Posteriormente, se enfrió el balón y su contenido se diluyó a 100 mL con agua destilada en balones aforados.

Cuantificación de amonio: en tubos con tapa rosca de 15 mL, se mezclaron 250 µL del digerido con 750 µL del tampón (mezcla 1:1 de las soluciones A y B) y 200 µL de la solución de C₇H₅NaO₃-Na₂[Fe(CN)₅NO], agitando la mezcla en un vórtex luego de cada adición. A continuación, se incubó la mezcla por 10 min a 40 °C en un baño con agitación, seguidamente se añadieron 100 µL de la solución de hipoclorito de sodio que contiene 0,6 % de cloro disponible y después de 30 minutos de reacción (con agitación continua) se adicionaron 5 mL de agua destilada, se agitó en un vórtex y se enfriaron los tubos a temperatura ambiente (20 °C). La lectura de las absorbancias se realizó a 645 nm en el espectrofotómetro convencional de haz simple HACH, DR-500 frente a un blanco preparado de igual manera con el digerido que contiene solo los catalizadores y el ácido sulfúrico concentrado.

Preparación de soluciones y reactivos para la cuantificación de proteínas

Catalizador: 1,25 g de K₂SO₄; 75 mg de CuSO₄·5H₂O, y una grajea de Se, por cada muestra.

Solución A: compuesta por Na₂HPO₄ (0,2 M); NaOH (0,2 M); C₄H₄KNaO₆·4H₂O (0,36 M).

Solución B: NaOH (2,5 M).

Solución de C₇H₅NaO₃-Na₂[Fe(CN)₅NO]: se disolvieron en agua destilada 20 g de C₇H₅NaO₃ , 30 mg de Na₂[Fe(CN)₅NO] y se aforó a 100 mL. La solución se mantiene en frasco ámbar.

Solución de cloro: se determinó previamente el contenido de cloro disponible (Norma NTE INEN 1565:2013) y se preparó una solución que contenga 0,6 % de cloro disponible a partir de blanqueador comercial, en el presente caso, mediante la mezcla con agua destilada en relación 1:10, con 0,5 mL de Cl aforados a 5 mL con agua destilada.

Blanco: digerido de la mezcla de catalizadores (1,25 g de K₂SO₄; 75 mg de CuSO₄·5H₂O, una gragea de Se) y 3,5 mL de H₂SO₄ concentrado.

Preparación de los estándares: las soluciones estándar de N se prepararon a partir del digerido de 47,2 mg de (NH₄)₂SO₄ secados previamente en una estufa por 3 h a 103 °C y diluido 1/5 luego de aforar a 100 mL.

Tabla 1. Estándares de N preparados con la dilución 1/5 del digerido de (NH₄)₂SO₄

Estándar	(NH ₄) ₂ SO ₄ (μL)	Blanco (μL)
STD-1	100	400
STD-2	200	300
STD-3	300	200
STD-4	400	100
STD-5	480	20

Registrar el peso de la cantidad añadida de (NH₄)₂SO₄ y el peso final [(NH₄)₂SO₄+Blanco]. Para los estándares se duplicó la cantidad de reactivos utilizados para cuantificar NH₄⁺

2.2.4.2. Electroforesis (SDS-PAGE y NATIVE PAGE)

Los pesos moleculares aproximados de las proteínas de los concentrados, se determinaron por electroforesis SDS-PAGE según la técnica descrita por **Laemmli (1970)** con modificaciones, usando la cámara de electroforesis Bio-Rad[®], modelo Mini PROTEAN[®] Tetra System (Bio-Rad Life Science, USA) en gel de poliacrilamida con SDS 1D, utilizando un voltaje constante de 200 V. Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron mediante comparación con un estándar de pesos moleculares (10-250 kDa) de la marca Bio-Rad[®] #161-0377, Hercules, CA, EE.UU.

2.2.4.2.1. SDS-PAGE

Preparación de la muestra: se pesó 10 mg del concentrado proteico obtenido de cada pH de precipitación, se adicionó 1 mL de agua destilada y se agitó en un vórtex Mixer, VWR. De esta mezcla se tomaron 200 µL y se adicionaron a 200 µL del tampón de muestra (SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol), el resultante fue colocado en el microincubador Esco, Provolcell Shaking a 80 °C durante 10 minutos con agitación constante de 450 rpm. Se cargó 30 µL de la muestra en cada pocillo, se añadió la solución tampón SDS y se analizó en el equipo de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra System BIO-RAD a 200 V durante 30 minutos. Una vez terminado el corrido de la muestra, los geles fueron teñidos con una solución de Azul de Coomassie R-250 durante 24 h, luego se destiñeron para finalmente realizar el lavado de los geles con agua destilada.

De igual manera se procedió con el segundo tampón de muestra (SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol).

2.2.4.2.2. NATIVE PAGE

Preparación de la muestra: se pesó 10 mg del concentrado proteico obtenido de cada pH de precipitación, se adicionó 600 µl del tampón de muestra y se repitió el procedimiento descrito anteriormente.

Tampón de muestra con agente reductor (SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol): agua destilada (4,8 mL); Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (2 mL); glicerol puro (1 mL); SDS al 10 % (2 mL); 2-mercaptoetanol (0,6 mL); azul de bromofenol (~20 mg).

Tampón de muestra sin agente reductor (SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol): agua destilada (4,8 mL); Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (2 mL); glicerol puro (1 mL); SDS al 10 % (2 mL); azul de bromofenol (~20 mg).

Tampón de muestra (NATIVE PAGE): agua destilada (4,8 mL); Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (2 mL); glicerol puro (1 mL); azul de bromofenol (~20 mg).

Preparación de los geles de poliacrilamida

Gel inferior al 12 % (separador): agua destilada (1,425 mL); Tris-HCl 1 M pH 8,8 (3 mL); acrilamida al 30 % (3 mL); SDS de 10 % (75 µL); TEMED (9 µL); PSA al 10 % (30 µL).

Gel superior al 4 % (concentrador): agua destilada (2,2 mL); Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 (0,42 mL); acrilamida al 30 % (0,7 mL); SDS de 10 % (3,3 µL); TEMED (6 µL); PSA al 10 % (30 µL).

Se colocó en placas de vidrio, adicionando primero el gel inferior y luego el gel superior. Una vez desarrollada la polimerización, el resultado fue la formación de un único gel (~1 mm de espesor), en el primer pocillo se colocó el estándar de pesos moleculares de la marca Bio-Rad® #161-0377, que abarca un rango de 15 a 250 kDa y en los siguientes pocillos cada uno de los concentrados proteicos obtenidos.

Este procedimiento se realizó tanto para el concentrado proteico de gándul verde como para el concentrado proteico de gándul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación.

La interpretación se realizó midiendo la distancia de cada banda desde el punto de aplicación de la muestra y la distancia total recorrida por el azul de bromofenol.

2.2.5. Obtención de los hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos fueron preparados con el concentrado del mejor tratamiento (seleccionado considerando los resultados de rendimiento y contenido proteico) siguiendo el método descrito por **Jiménez et al. (2012)** y **Minekus et al. (2014)** con ligeras modificaciones.

Digestión Gástrica a pH 2,0: se incubó la mezcla E:S en relación 1:1 en un microincubador Esco, Provolcell Shaking durante 2 h, a 37 °C y 500 rpm; la solución de enzima contenía 25 mg de pepsina (2000 U/mL) disuelta en 50 mL de NaCl 0,35 M de pH 2,0, el sustrato fue preparado con 10 mg del concentrado proteico diluido en 1 mL de NaCl 0,35 M de pH 2,0.

Digestión Duodenal: se mezcló 1 mL del digerido gástrico y 1 mL de solución de pancreatina (109 U/mL); 1 mL de esta mezcla fue añadido a 1 mL del fluido intestinal simulado, se llevó al microincubador Esco, Provolcell Shaking durante 2 h, a 37 °C y 500 rpm. Posteriormente se añadieron 200 µL de NaHCO₃ 1 M y se incubó 10 minutos a 80 °C y 500 rpm. El hidrolizado resultante fue almacenado a -80 °C en frascos estériles para la posterior liofilización. El proceso fue realizado tanto en el concentrado proteico de gandul verde como en el concentrado proteico de gandul maduro.

Preparación del fluido intestinal simulado: 0,61 g de NaOH y 6,80 g de NaH₂PO₄ fueron disueltos en 1000 mL de agua destilada y ajustado a pH 7,0.

2.2.6. Simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal *in vitro* de los concentrados proteicos

Para la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro*, se empleó el método descrito por **Jiménez et al. (2012)**. El concentrado proteico del mejor tratamiento (seleccionado considerando los resultados obtenidos en rendimiento y contenido proteico) fue sometido a un proceso de hidrólisis gástrica y duodenal simulando las condiciones fisiológicas humanas del estómago y del duodeno.

Digestión Gástrica: se pesó 10 mg del concentrado proteico que fue diluido en 1 mL de NaCl 0,35 M cuyo pH fue regulado a 3,2; 2,0 y 1,2, luego se añadió 100 µL de solución de pepsina (2000 U/mL), el resultante fue incubado durante 2 h, a 37 °C y 450 rpm en un microincubador Esco, Provolcell Shaking. Finalizado el tiempo de la digestión, se añadió 200 µL de NaHCO₃ 1 M y se incubó las muestras en el mismo microincubador por 10 minutos pero a 80 °C y 500 rpm para lograr la inactivación de la pepsina.

Digestión Duodenal: 0,5 mL de la muestra sometida a la digestión gástrica se mezclaron con 0,5 mL de solución de pancreatina (100 U/mg), sales biliares (10 mM) y CaCl₂ (1,5 mM), se ajustó a pH 7,0 y el resultante fue incubado durante 2 h, a 37 °C y 450 rpm en un microincubador Esco, Provolcell Shaking. Las enzimas

fueron inactivadas durante 10 minutos cambiando las condiciones del microincubador a 90 °C y 500 rpm.

2.2.7. Actividades Biológicas

2.2.7.1. Actividad Antiinflamatoria

La determinación de la actividad antiinflamatoria en el concentrado e hidrolizado proteico tanto de gandul verde como de gandul maduro se realizó por el método de desnaturalización de albúmina de huevo descrito por **Padmanabhan (2012)** y **Alhakmani et al. (2013)** con modificaciones. Las concentraciones de proteína fueron de 0,2; 0,4; 1,0 y 2,0 mg/2mL; se homogenizaron 2 mL de solución de cada concentración de proteína con 3 mL de la mezcla tampón fosfato 0,1 M de pH 6,4 y albúmina de huevo previamente sometida a agitación durante 10 minutos (80 rpm), preparada como se describe a continuación. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Para que ocurra la desnaturalización de la proteína, la mezcla fue incubada durante 10 minutos a 70 °C en un Baño María. Finalmente, se realizó la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Thermo SCIENTIFIC™, EVOLUTION 201.

El diclofenaco de sodio, 75 mg/3 mL, MK[®] fue empleado como modelo estándar para calcular la actividad antiinflamatoria presente en el concentrado e hidrolizado proteico (**Tamayo et al., 2018**).

El método se realizó por triplicado tanto en las muestras como en el estándar empleado.

Preparación del tampón fosfato a pH 6,4: se mezcló 46,3 mL de Na₂HPO₄ 1 M y 53,7 mL de NaH₂PO₄ 1 M y se aforó a 1 L con agua destilada. El tampón fue ajustado a pH 6,4 con adición de HCl 2 M.

Preparación de la mezcla tampón fosfato 0,1 M de pH 6,4 y albúmina de huevo: 70 mL de buffer fosfato ajustado a pH 6,4 y 3 mL de albúmina de huevo.

El porcentaje de actividad antiinflamatoria se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antiinflamatoria} = \frac{a-b}{b} * 100 \quad [Ec3]$$

Siendo:

a= absorbancia de la albúmina desnaturalizada

b= absorbancia de la muestra (concentración proteica + albúmina)

2.2.7.2. Actividad Antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante en el concentrado e hidrolizado proteico tanto de gandul verde como de gandul maduro se realizó mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) descrito por **Guzmán *et al.* (1997)** y **Rojano *et al.* (2008)** con modificaciones.

Para este ensayo se prepararon suspensiones de proteína de 0,2; 0,4; 1 y 2 mg/2mL. Se homogenizaron 500 µL de solución de cada concentración de proteína con 500 µL de aceite de oliva ARBOLITO oxidado (15 días a 68 °C), y se dejó en agitación a 450 rpm en el microincubador Esco, Provolcell Shaking durante 13 h a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de TBA al 1 % y se incubó durante 1 h a 95 °C y 450 rpm. Posteriormente se colocó en la centrífuga EPPENDORF MODEL 5702 durante 30 minutos a 13000 rpm para separar las partículas presentes en la muestra que producen turbidez. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro convencional de haz simple, HACH, DR-500.

El estándar fue preparado con un antioxidante comercial (BHT) a concentraciones iguales a las empleadas con el concentrado e hidrolizado proteico (**Pilicita, 2017; Poveda, 2016; Tamayo *et al.*, 2018**). La determinación se realizó por triplicado tanto en las muestras como en el estándar empleado.

Preparación de la solución de TBA al 1%: se preparó con 0,5 g de TBA disueltos en 40 mL de CH₃COOH y 10 mL de agua destilada.

El porcentaje de actividad antioxidante se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{a-b}{b} * 100 \quad [Ec4]$$

Siendo:

a= absorbancia del aceite oxidado

b= absorbancia de la muestra (concentración proteica + aceite oxidado)

2.3. Análisis Estadístico y Diseño Experimental

Se aplicó un diseño de un solo factor para el rendimiento proteico, cuantificación proteica y actividades biológicas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis proximal de la harina de gandul (*Cajanus cajan*)

En la Tabla 2 se muestra el análisis proximal de la harina de gandul en base seca, realizado en los Laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Santa Catalina, institución que participa en el proyecto “Valorización de la calidad nutricional y funcional de alimentos tradicionales de la población ecuatoriana” de la REDU. Los porcentajes de proteína y grasa se encuentran en el rango establecido por **Torres (2001)**, los cuales varían entre 15-38 % y 1-2 % respectivamente en leguminosas, y específicamente 18,8 % y 1,9 % para el gandul; en cuanto al análisis proximal realizado por **Oloyo (2004)**, los valores para el gandul son de 29,1 % de proteína; 2,7 % de grasa; 4,6 % de cenizas; 8,3 % de fibra cruda y 62,2 % de carbohidratos totales, resultados que no difieren en gran medida de los reportados por el **INIAP (2017)**. Valores similares reportan **García et al. (2009)**, 10,3 %; 18,4 %; 1,4 %; 66,1 %; 7,8 % y 3,8 % para humedad, proteína, grasa, carbohidratos totales, fibra cruda y cenizas, respectivamente.

Tabla 2. Análisis proximal de la harina de gandul (*Cajanus cajan*) en base seca

Parámetro analizado	Contenido (%)
Humedad	7,20
Proteína	18,67
Grasa	1,71
Cenizas	3,86
Fibra cruda	10,56
Carbohidratos totales	65,20

Fuente: (INIAP (2017))

3.1.2. Contenido de grasa y humedad

Previo al aislamiento de la proteína es necesario desengrasar la harina, **Damodaran (2010)** recomienda utilizar harinas desengrasadas debido a que la presencia de lípidos provoca la formación de emulsiones; este proceso se realiza apropiadamente si el contenido de humedad de la muestra no excede el 10 % (**Wayne, 2017**), por estas razones se determinaron como parte de este trabajo los contenidos de humedad y grasa (Tabla 3).

El contenido de humedad presente en la harina de gandul verde fue de 6,19 %. En la investigación realizada por **Aremu et al. (2006)** se obtiene un valor similar (6,49 %), sin embargo, difiere con los valores obtenidos (12,4 % y 11,90 %) por **Caballero et al. (2013)** y **Albornoz & Romero (2004)**. Respecto a esto, **Butt & Batool (2010)** mencionan que las variaciones en la composición proximal son causadas por la variedad de la semilla, etapa de madurez, tipo de suelo y condiciones climáticas que pueden haber afectado los parámetros físico-químicos en el cultivo; en cambio, en la harina de gandul maduro el contenido de humedad obtenido en este estudio (5,88 %) fue similar al valor reportado (6,46 %) en la investigación realizada por **Pazmiño et al. (2018)**. Además, dichos porcentajes se encuentran por debajo del valor máximo (15 %) recomendado por la **FAO (2007b)** en harinas de leguminosas para evitar daños por microorganismos y para proporcionar alta estabilidad de los componentes nutricionales como son la proteína, grasa y fibra (**García et al., 2012**).

Tabla 3. *Contenido de grasa y humedad de la harina de gandul (Cajanus cajan)*

Muestra	Grasa (%)	Humedad (%)
Gandul verde	2,21 ± 0,02	6,19 ± 0,58
Gandul maduro	1,40 ± 0,01	5,88 ± 0,01

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

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

A pesar de que **Torres (2001)** señala que las leguminosas como el gandul presentan bajo contenido en grasa (1,9 %), se procedió a realizar el desengrasado de las harinas utilizando el método Soxhlet, considerando la recomendación de **Navarro et al. (2014)** de preparar tanto los concentrados como los aislados proteicos a partir de

harinas desengrasadas, obteniéndose para la harina de gandul verde 2,21 % y para la harina de gandul maduro 1,40 % de grasa, valores cercanos a los obtenidos por **Butt & Batoool (2010)**, **Aremu et al. (2006)** y **Oloyo (2004)** los cuales fueron de 2,03; 1,80 y 2,7 %, respectivamente.

3.1.3. Obtención de los concentrados proteicos

La proteína que se encuentra en las células vegetales debe ser liberada para que pueda efectuarse la precipitación, para lo cual se utilizan solventes altamente alcalinos como el NaOH; este tipo de solventes provocan el rompimiento de los puentes de hidrógeno, produciendo el incremento de la carga superficial de las moléculas proteicas y por ende, el aumento de la solubilidad en agua (**Perry, 2001; Shen et al., 2008**).

Respecto al pH, conocer el efecto del mismo sobre la solubilidad de las proteínas es un factor determinante para evaluar el punto isoeléctrico (la solubilidad disminuye a medida que el pH aumenta). Debido a la pérdida de fuerzas de repulsión electrostáticas, se producen las condiciones favorables para que se formen agregados proteicos; la alta densidad aparente y el diámetro de los agregados resultan en la precipitación de la proteína.

Conforme se incrementa el pH por sobre el punto isoeléctrico, las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las proteínas con carga negativa las llevan a mantenerse separadas y a su vez se produce un aumento de las interacciones proteína-solvente, en consecuencia, ocurre la solubilidad a valores de pH básicos, esto se justifica porque las proteínas vegetales contienen gran cantidad de los aminoácidos aspártico y glutámico, cuyo punto isoeléctrico se encuentra en valores ácidos de pH (**Sathe, 2002; Singh et al., 2005**).

En la Figura 1 se observa el efecto de la adición de HCl 1 M para la precipitación isoeléctrica de la proteína del gandul verde a pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0.

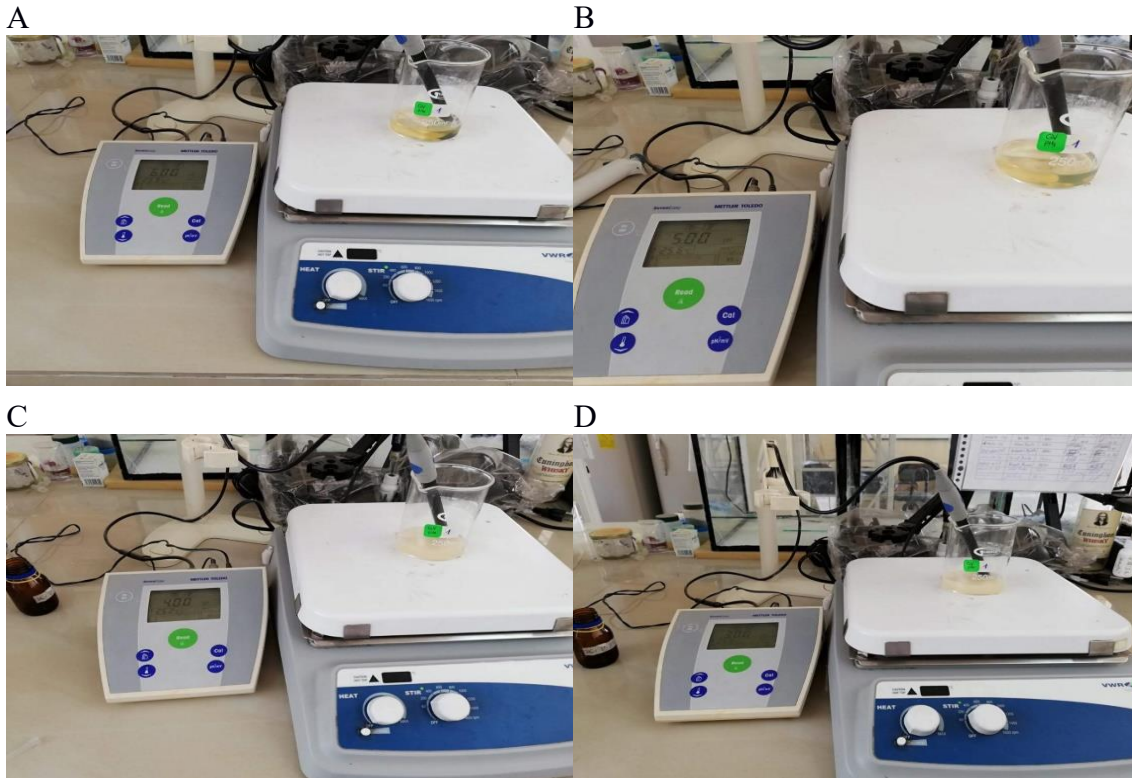


Figura 1. Precipitación isoelectrica de la proteína del gandul verde: A a pH 6,0; B a pH 5,0; C a pH 4,0 y D a pH 3,0

Mediante la precipitación isoelectrica se obtienen valores de recuperación de proteína entre 70-85 %, permitiendo obtener concentrados proteicos (60-80 % de proteína) (Chew *et al.*, 2003; Hojilla *et al.*, 2004).

Al realizar la precipitación isoelectrica del gandul verde, se observó que a pH 6,0 y 5,0 no existía precipitación y que a pH 4,0 la misma fue mínima (Figura 1: A, B y C), en cambio a pH 3,0 (Figura. 1D) se apreció claramente la formación de un precipitado. Tamayo *et al.* (2018) observaron un comportamiento similar con *Phaseolus lunatus* L, para el cual determinaron que el mayor rendimiento proteico (19,55 %) se produjo a pH 3,0, y recalcan que a pH 6,0 no existió precipitación.

La solubilidad de la proteína del gandul verde a valores bajos de pH disminuye, esto quedó demostrado en la investigación realizada por Pazmiño *et al.* (2018), donde a pH 4,0 la solubilidad fue de $6,98 \pm 0,25$ % por tal razón, la obtención del concentrado proteico y caracterización de la proteína del gandul verde fueron realizadas únicamente a pH 3,0. El rendimiento proteico promedio del gandul verde fue de $0,62 \% \pm 0,11$ a pH 3,0 de precipitación isoelectrica, considerando el factor de grasa y humedad presente en la muestra. Rodríguez & Magro (2008) mencionan

que el contenido de proteínas y del material mineral es mayor en las semillas maduras que en el vegetal tierno.

En base a esto, **Sangronis & Machado (2007)** expresan que tanto la especie, variedad de la semilla, tipo de suelo, así como las condiciones de germinación tienen influencia directa en el contenido proteico en una matriz vegetal; se demuestra además que las diferencias en los componentes morfológicos (raíz, hojas, tallos) son producidas por la duración de las etapas fisiológicas de las leguminosas, considerando que es necesario conocer el tiempo óptimo de fertilización en las mismas (**Costa et al., 2003; Díaz et al., 2011; Higuera et al., 2001**).

En el gandul maduro el mayor rendimiento proteico (11,35 %) se obtuvo a pH 4,0 seguido por el rendimiento alcanzado a pH 3,0 (11,30 %) y pH 5,0 (10,35 %), a pH 6,0 se produjo el menor rendimiento proteico (8,56 %) como se observa en la Tabla 4, debido a que las proteínas vegetales generalmente presentan una mínima solubilidad a valores de pH 4,0 y 5,0 por lo que precipitan. **Teniente et al. (2016)** realizaron la precipitación isoeléctrica en la variedad de fréjol *Phaseolus coccineus* y los resultados obtenidos coinciden en que el punto isoeléctrico se encuentra a pH 4,0 es decir, el punto isoeléctrico de este tipo de leguminosas, se encuentra por debajo del pH 6,0 (**Kaur & Singh, 2007; Serpa et al., 2014**).

Tabla 4. Rendimiento de los concentrados de gandul maduro preparados a diferentes valores de pH de precipitación

Gandul maduro	Promedio (%)
pH 3,0	11,30 ± 0,05
pH 4,0	11,35 ± 0,02
pH 5,0	10,35 ± 0,04
pH 6,0	8,56 ± 0,01

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

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

En la Tabla 5 se observa que la desviación estándar del rendimiento dentro de cada uno de los 4 niveles de pH de precipitación es la misma; valor-P por debajo de 0,05 existen 2 (comparaciones 3/4 y 3/6), lo que significa que existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0

% de confianza. Al aplicar la prueba de comparación de Tukey con un nivel de confianza del 95,0 % se determinó que a pH 3,0 y pH 4,0 donde se obtuvo el 11,30 % y 11,35 % de rendimiento proteico no existen diferencias significativas.

Tabla 5. *Análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro; verificación de varianza*

Comparación	P-Valor
3 / 4	0,0117
3 / 5	0,0779
3 / 6	0,0236
4 / 5	0,2534
4 / 6	0,6588
5 / 6	0,4560

Fuente: Statgraphics, 2018

Las diferencias que se han encontrado entre los valores obtenidos para el rendimiento de gandul maduro y los reportados hasta la actualidad, se atribuyen a que la extracción de proteínas mediante precipitación isoeléctrica se encuentra asociada con la pureza y variedad de los reactivos utilizados para los correspondientes ajustes de pH y también es consecuencia de la concentración de nitrógeno en el suelo, ya que niveles bajos de este elemento conllevan a una disminución de la síntesis de proteínas en las plantas (Posada, 2005).

3.1.4. Caracterización del concentrado proteico

3.1.4.1. Cuantificación de proteína en los concentrados

Método 1: Método espectrofotométrico Biuret

El contenido proteico de los concentrados de gandul verde y gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación se determinó mediante el método espectrofotométrico Biuret, específico para polipéptidos y proteínas, método que sirve para reconocer las uniones peptídicas, el resultado positivo se interpreta por la formación de una coloración violeta producto de un complejo de coordinación entre los cationes cúpricos en medio alcalino con las uniones peptídicas (Vázquez *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos por este método se detallan en la Tabla 6, los cuales superaron el 100 % en los diferentes valores de pH de precipitación.

Tabla 6. *Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método espectrofotométrico Biuret*

pH	Contenido proteico (%)
3,0	124,05 ± 1,65
4,0	112,24 ± 3,86
5,0	120,41 ± 0,41
6,0	107,56 ± 1,23

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

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

Flores & Ruiz (2017) expresan que las variaciones en los datos obtenidos se deben a que el método tiene mayor sensibilidad a los cambios de peso de la muestra y al volumen de los reactivos empleados respecto al resto de factores evaluados; la cantidad de muestra empleada fue de 10 mg, frente a esto argumentan que es recomendable utilizar cantidades mayores de muestra.

Método 2: Método de digestión en microKjeldahl

El método de digestión en microKjeldahl emplea una digestión ácida con H₂SO₄ concentrado y catalizadores, es utilizado para la determinación de proteína en base a la cantidad de nitrógeno que contiene la muestra orgánica, dependiendo de la naturaleza de la misma, la fracción de nitrógeno puede proceder de otros compuestos nitrogenados como bases púricas y pirimídicas, creatinas y creatinina, urea y amoníaco (**Gregorio et al., 2016**).

Para la conversión de nitrógeno a proteína se multiplicó el contenido de nitrógeno obtenido por el método digestión en microKjeldahl por el factor de 6,25; dicho factor es específico para las variedades de fréjol (**Greenfield & Southgatel, 2003**). De esta manera se calculó el contenido de proteína del gandul maduro.

Tabla 7. *Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl*

pH	Contenido proteico (%)
3,0	71,75 ± 1,20
4,0	73,41 ± 1,06
5,0	75,51 ± 1,59
6,0	77,32 ± 0,73

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA; 2018

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

Pazmiño et al. (2018) realizaron la cuantificación proteica por microKjeldahl obteniendo a pH 4,5 el valor de 76,41 % en el gandul maduro, valor comparable con los obtenidos en este estudio a pH 5,0 y 6,0.

El análisis estadístico mostrado en la Tabla 8, evalúa la hipótesis de que la desviación estándar del porcentaje de contenido proteico dentro de cada uno de los 4 niveles de los diferentes valores de pH de precipitación para el gandul maduro es la misma. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 8. *Análisis estadístico del contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl; verificación de varianza*

Comparación	P-Valor
3 / 4	0,4890
3 / 5	0,8651
3 / 6	0,1465
4 / 5	0,6186
4 / 6	0,5307
5 / 6	0,2344

Fuente: Statgraphics, 2018

Para determinar las medias que son significativamente diferentes de otras se aplicó el análisis de pruebas de múltiples rangos; como se observa en la Tabla 9, la mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El

asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que los mismos muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 9. *Análisis estadístico del contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación cuantificados mediante el método de digestión en microKjeldahl; pruebas de múltiples rangos*

Contraste	Sig.	Diferencia
3-4		-0,834167
3-5	*	-2,93417
3-6	*	-4,7475
4-5		-2,1
4-6	*	-3,91333
5-6		-1,81333

Fuente: Statgraphics, 2018

El * indica una diferencia significativa con un nivel del 95,0 % de confianza.

3.1.4.2. Electroforesis

3.1.4.2.1. (SDS-PAGE) de los concentrados proteicos

Para caracterizar el proteoma, se requiere de la separación y purificación de las proteínas, para esto, las proteínas necesitan ser separadas de las muestras complejas de manera selectiva mediante un procedimiento de fraccionamiento adecuado. La solubilidad, tamaño o carga son características que diferencian a las proteínas. La electroforesis es una herramienta analítica simple, rápida y sensible, en la que se produce la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico, constituye una de las técnicas más utilizadas para la separación y estudio de moléculas cargadas como las proteínas (Nelson & Cox, 2001).

El perfil proteico de los concentrados de gandul verde y gandul maduro fue analizado mediante electroforesis SDS-PAGE (con y sin 2-mercaptoetanol).

En leguminosas las fracciones proteicas más abundantes son las globulinas, albúminas y glutelinas cuyas proporciones con respecto al total de proteínas presentes en el gandul son 55,0 a 50,0 %, 20,0 a 15,0 % y 10,0 %, respectivamente (Vargas *et al.*, 2012).

En la Figura 2 se muestra el perfil electroforético de las proteínas del gandul verde obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol, en donde se identificaron bandas entre 15,0 y 100 kDa; este resultado coincide con lo reportado por **Gangwar & Bajpai (2006)** quienes observaron bandas polipeptídicas próximas a 87,5; 71,5; 60,0; 26,0; 10,0; 31,5; 23,0 y 29,5 kDa. La banda polipeptídica cercana a 50,0 kDa correspondiente a las globulinas 7S se observa claramente a pH 5,0; 4,0 y 3,0 debido a que el punto isoeléctrico de este tipo de proteínas está entre 4,2 y 4,8; también se observa que la velocidad de migración de las moléculas está determinada por el pH.

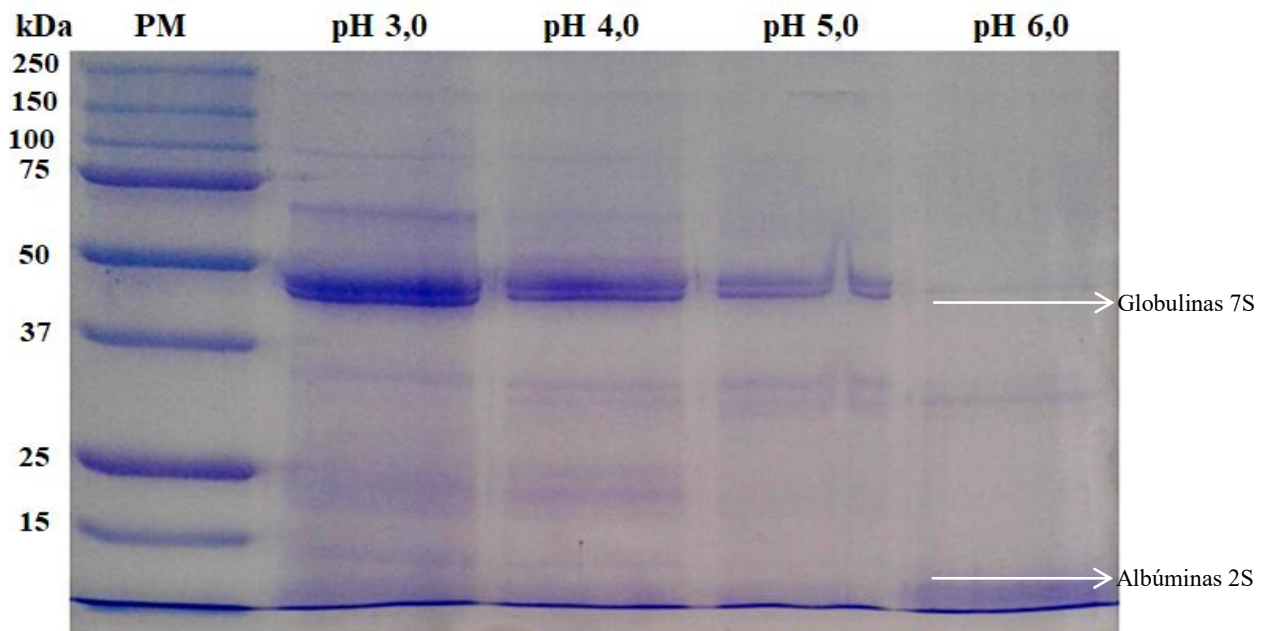


Figura 2. Perfil electroforético de los concentrados de gandul verde en SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

El perfil electroforético de proteínas del gandul verde obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol se observa en la Figura 3; las bandas más pronunciadas se encuentran a pH 3,0 alrededor de 37,0 y 50,0 kDa y corresponden a la globulina 7S. En la investigación realizada por **Pazmiño et al. (2018)** se observó en el gandul verde un perfil electroforético similar con polipéptidos de pesos moleculares entre 37,0 kDa y 75,0 kDa, siendo la banda más intensa la de 50,0 kDa correspondiente a la proteína vicilina (globulina 7S). En el pH 3,0 alrededor de 75,0 kDa se observan bandas tenues correspondientes a las

subunidades α' y α de la globulina 7S y próximo a 50,0 kDa el péptido que coincide con la subunidad β .

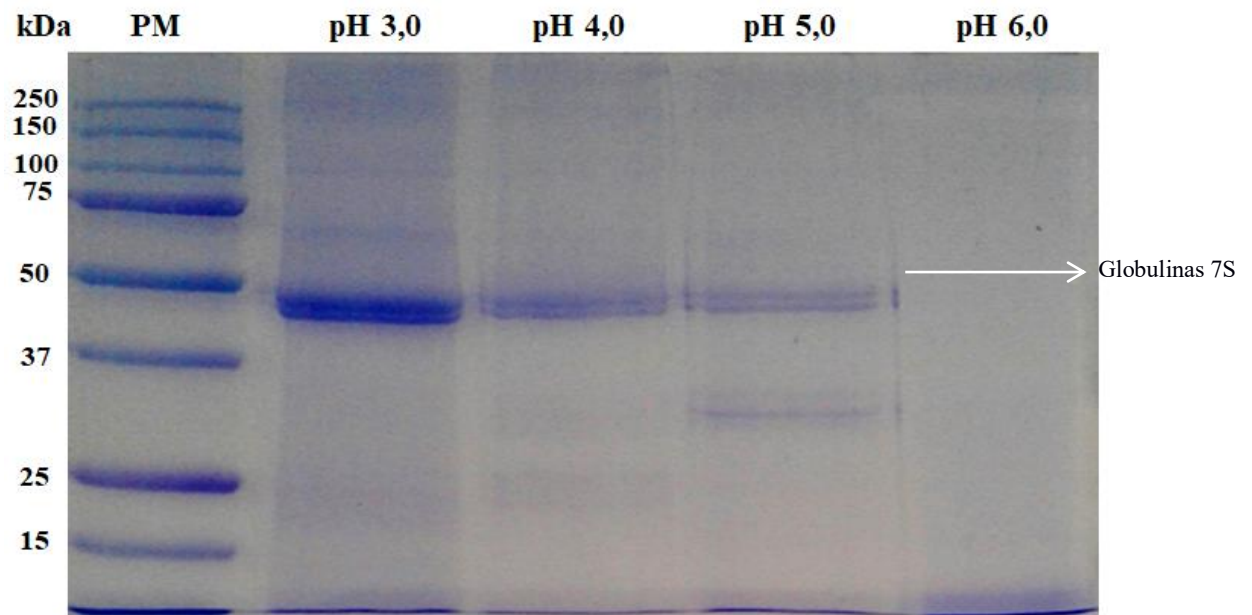


Figura 3. Perfil electroforético de los concentrados proteicos de gandul verde en SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

Como se puede observar en la Figura 4 las bandas polipeptídicas del gandul maduro presentan más intensidad en relación a las bandas del gandul verde. El perfil electroforético del gandul maduro presenta subunidades de polipéptidos entre 15,0 y 75,0 kDa, siendo las bandas con mayor intensidad las cercanas a 50,0 y 70,0 kDa que corresponden a la globulina 7S. Resultados similares a los reportados por **Pazmiño *et al.* (2018)**.

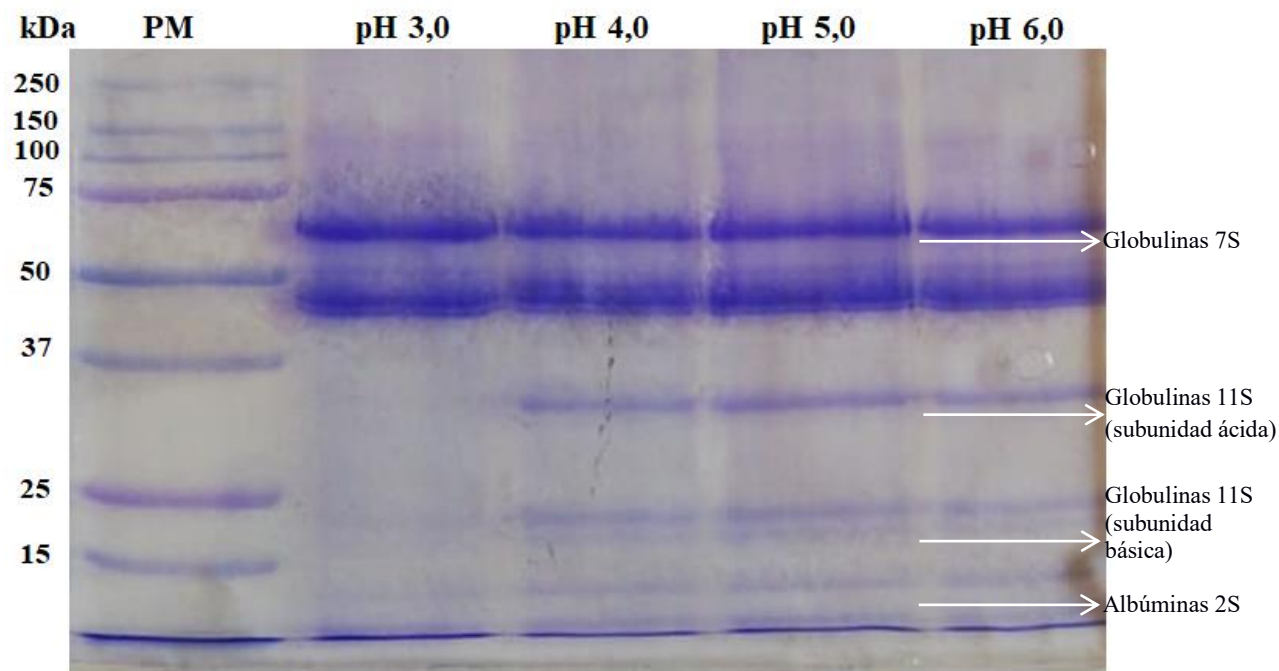


Figura 4. Perfil electroforético de las proteínas del gandul maduro en SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

Así mismo, a pH 6,0; 5,0 y 4,0 se evidencian polipéptidos con un peso molecular próximo a 37,0; 25,0 y 15,0 kDa que pueden pertenecer a las globulinas 11S; que contienen una fracción ácida (29,0-35,0 kDa) y una fracción básica (18,0-28,0 kDa) (**Dávalos *et al.*, 2008**); además, se visualizan bandas proteicas por debajo de 15,0 kDa que pertenecen a las albúminas 2S.

A diferencia del gel SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol, en el gel de la Figura 5 las bandas por debajo de 37,0 kDa son tenues; se observan bandas más intensas entre 40,0 y 70,0 kDa pertenecientes a la globulina 7S. Este perfil no difiere en gran medida con el reportado por **Camacho *et al.* (2010)**, cuyo estudio se basó en la electroforesis de 3 variedades de fréjol obteniendo polipéptidos entre 30,0 kDa (faseolinas) y 50,0 kDa (lectinas). La presencia de las lectinas (proteínas de reserva) se debe a que en las semillas maduras de las leguminosas las proteínas de reserva se encuentran depositadas en estructuras vacuolares características denominadas cuerpos proteicos (**Martínez *et al.*, 2011**).

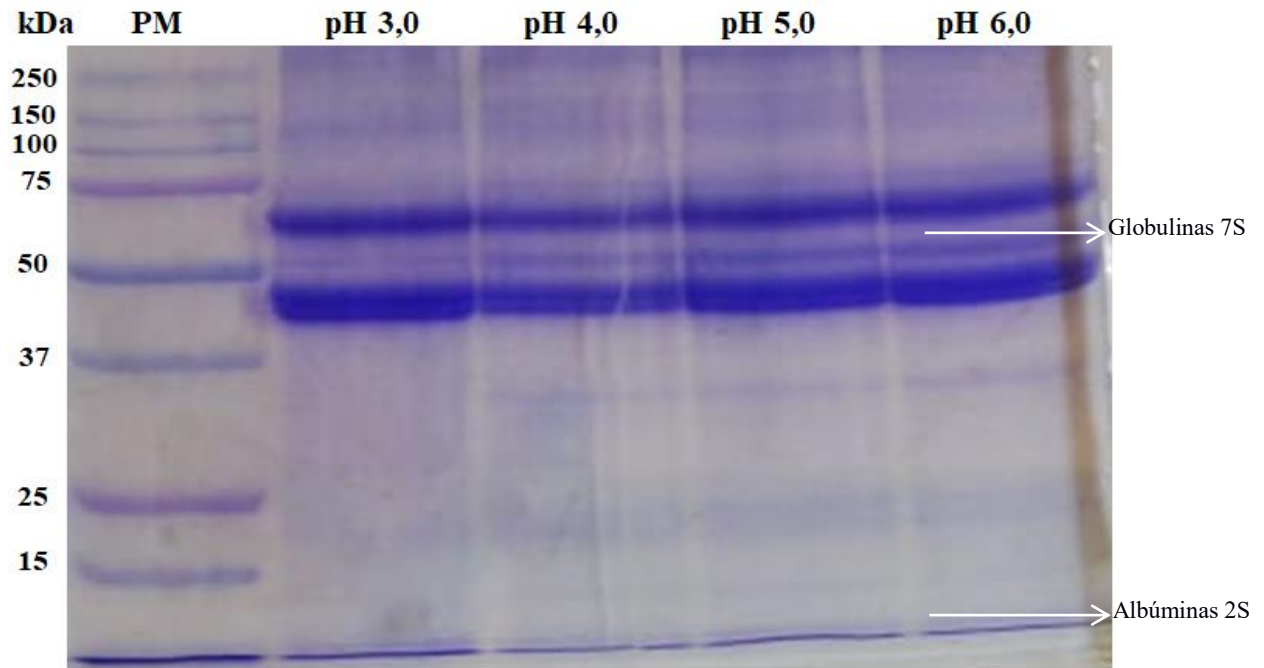


Figura 5. Perfil electroforético de los concentrados proteicos de gandul maduro en SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

Por debajo de 15,0 kDa se observan bandas tenues que corresponden a las albúminas 2S, por otro lado, por encima de 37,0 kDa se observan bandas. En la variedad de fréjol *Phaseolus vulgaris*, **Morán (2017)** observó bandas entre 30,0 y 50,0 kDa, bandas tenues entre los 60,0 y 100 kDa pero no existieron bandas por debajo de los 14,0 kDa, se infiere que esta variación depende de la variedad de fréjol.

La diferencia de las bandas observada entre el perfil electroforético del gandul verde y del gandul maduro se puede justificar por las variaciones existentes en el contenido proteico de los mismos; las globulinas 11S fueron observadas en los geles con y sin 2-mercaptoetanol, comprobando que en su mayoría no se encuentran unidas por puentes disulfuro (**Camacho *et al.*, 2010; Morán, 2017**).

Para identificar los polipéptidos situados alrededor de los 25,0 kDa y obtener una mayor separación, es necesario utilizar geles de poliacrilamida de mayor concentración, debido a que los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular retardando el movimiento de las macromoléculas mientras permiten a moléculas más pequeñas moverse libremente, potenciando de esta forma la separación (**Nasir *et al.*, 2010**).

3.1.4.2.2. NATIVE-PAGE de los concentrados proteicos

En la Figura 6 se observa la electroforesis NATIVE-PAGE de los concentrados proteicos de gandul verde precipitados a diferentes valores de pH, aquí la carga de cada una de las proteínas, misma que dependerá de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína (punto isoeléctrico) y el pH, influirá principalmente en la movilidad de la proteína respectiva durante la electroforesis (Arndt *et al.*, 2012). Se observan bandas que no se han separado eficientemente alrededor de 250 y 150 kDa pertenecientes a las globulinas, proteínas que son abundantes en las leguminosas y cuyo peso molecular se encuentra entre 140 y 200 kDa (Klodmann *et al.*, 2011), las mismas que presentan mayor intensidad a pH 3,0 y 4,0. Morán (2017) y Galarza (2017) reportaron un perfil similar en las leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Lablab purpureus* L. Sweet, respectivamente.

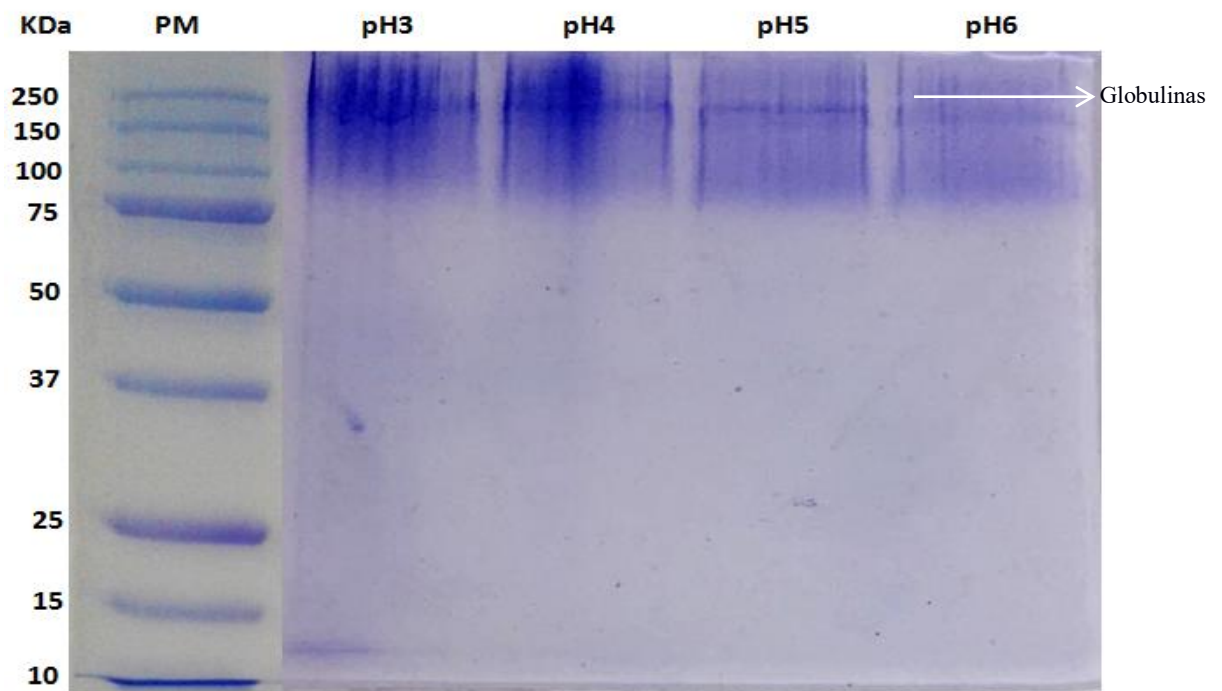


Figura 6. Electroforesis nativa (NATIVE-PAGE) de los concentrados proteicos de gandul verde precipitados a diferentes valores de pH. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

En la Figura 7 se observa que el perfil proteico es similar en todos los pH, probablemente porque se han obtenido el mismo grupo de proteínas a diferentes valores de pH de precipitación, las cuales son las globulinas 7S cuyo peso molecular es cercano a 140 kDa. Este perfil coincide con el de *Pisum sativum* reportado por Vallejo (2018).

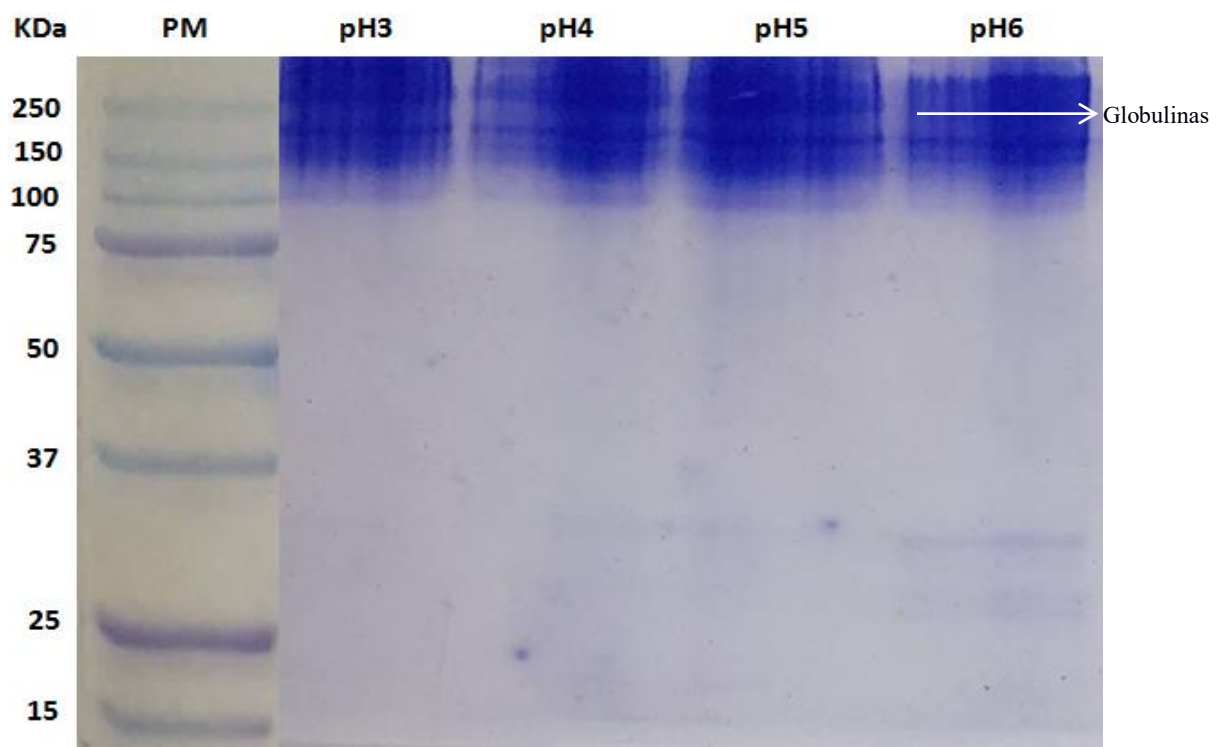


Figura 7. Electroforesis nativa (NATIVE-PAGE) de los concentrados proteicos de gandul maduro precipitados a diferentes valores de pH. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM).*

3.1.5. Obtención de hidrolizados proteicos

La hidrólisis consiste en el rompimiento de enlaces peptídicos que unen los aminoácidos que forman las proteínas, entre los métodos utilizados para este fin se encuentra la hidrólisis enzimática, que es un proceso controlado a través de factores como el pH, la temperatura, el tiempo y el tipo de enzima usada que libera pequeños péptidos y aminoácidos y constituye una de las técnicas que contribuyen a la valorización de productos de origen vegetal y animal, por medio de transformaciones que permiten el cambio de sus propiedades fisicoquímicas logrando un mayor y mejor uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica; en las leguminosas, este proceso conlleva a la mejora de la actividad nutricional, funcional, inmunológica y biológica de la proteína hidrolizada (Cheison *et al.*, 2009; Pagán *et al.*, 2013).

El hidrolizado proteico se preparó a partir del mejor tratamiento que correspondió al concentrado obtenido a pH 4,0 en el gandul maduro. Se evaluaron las propiedades

funcionales del concentrado e hidrolizado proteico mediante la determinación de las actividades antiinflamatoria y antioxidante.

3.1.6. Simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal *in vitro* de los concentrados proteicos

El cuerpo humano ha desarrollado un complejo sistema para descomponer los alimentos y extraer los nutrientes necesarios. En la ingesta, los alimentos en la boca se mezclan con la saliva, después son sujetos a un proceso gástrico (por un período variable en el cual el pH puede ser bajo y puede cambiar por el volumen, contenido de comida, presencia o ausencia de antiácidos consumidos por el individuo) y, finalmente entran los alimentos al duodeno donde son neutralizados, luego pasan al yeyuno e íleon. Durante esta fase de la digestión, se mezcla con enzimas (amilasas, proteasas y lipasas) y con surfactantes (sales biliares y fosfolípidos) en el duodeno. Dependiendo del grado de hidrólisis en la fase gástrica y duodenal, las proteínas de los alimentos son degradadas a fragmentos más pequeños, para que puedan atravesar la capa de moco del epitelio; para ello son convertidas en moléculas pequeñas como aminoácidos, di y tripéptidos (**Thomas *et al.*, 2004**).

En los modelos *in vitro* se consideran tres fases: 1) fase bucal, 2) fase gástrica y 3) fase duodenal. En la fase bucal se trituran los alimentos y se homogenizan. Las proteínas purificadas tienen un tamaño de partícula reducido y la fase bucal es omitida. Para estudios de hidrólisis de proteínas la acción de las enzimas en la boca no tiene mucha importancia, pero si son importantes en el estómago y duodeno. En este sentido, los métodos de digestibilidad *in vitro* permiten simular eficientemente condiciones químicas y fisiológicas de los compartimientos digestivos y los efectos de éstas sobre los alimentos; permitiendo el estudio y evaluación de los procesos digestivos simulados. Por tal razón, se llevó a cabo la digestión gástrica y duodenal del concentrado proteico obtenido a pH 3,0 (gandul verde) y a pH 4,0 (gandul maduro) simulando las condiciones fisiológicas del ser humano. Se trabajó con fluidos gástricos a valores de pH 1,2; 2,0 y 3,2 que equivalen al pH del estómago de personas que padecen enfermedades gástricas, de un adulto sano y de niños

respectivamente. El concentrado puro no sometido a la acción enzimática se empleó como patrón (**Jiménez *et al.*, 2012**).

En la Figura 8 se observa que en la digestión gástrica a pH 1,2 se produjo la mayor hidrólisis enzimática que se evidencia por la ausencia de bandas, sin embargo, a pH 2,0 y 3,2 aparecen bandas polipeptídicas entre 37,0 y 50,0 kDa, bandas que pertenecen a las globulinas 11S (subunidad básica) y 7S, que al parecer son resistentes a la acción de la pepsina, en consecuencia, las proteínas del gandul verde son digeridas parcialmente, a pesar de que dependiendo del sustrato, el pH óptimo para la actividad máxima de la pepsina puede encontrarse entre pH 2,0 y pH 3,5 (**Hani de Ardila, 2009; Polverino *et al.*, 2002**). En la digestión duodenal con el fluido gástrico obtenido a pH 3,2 las bandas son tenues, existiendo mayor hidrólisis a comparación de lo que ocurrió en la digestión gástrica. Respecto a esto, **Bannon *et al.* (2003)** expresan que el pH de los ensayos de digestión con pepsina es determinante y que además influye en la digestibilidad de ciertas proteínas; a pH 2,0 algunas proteínas alergénicas presentan resistencia a la digestión por la pepsina, formando en algunos casos, fragmentos estables que conservan el potencial alergénico de la proteína nativa.

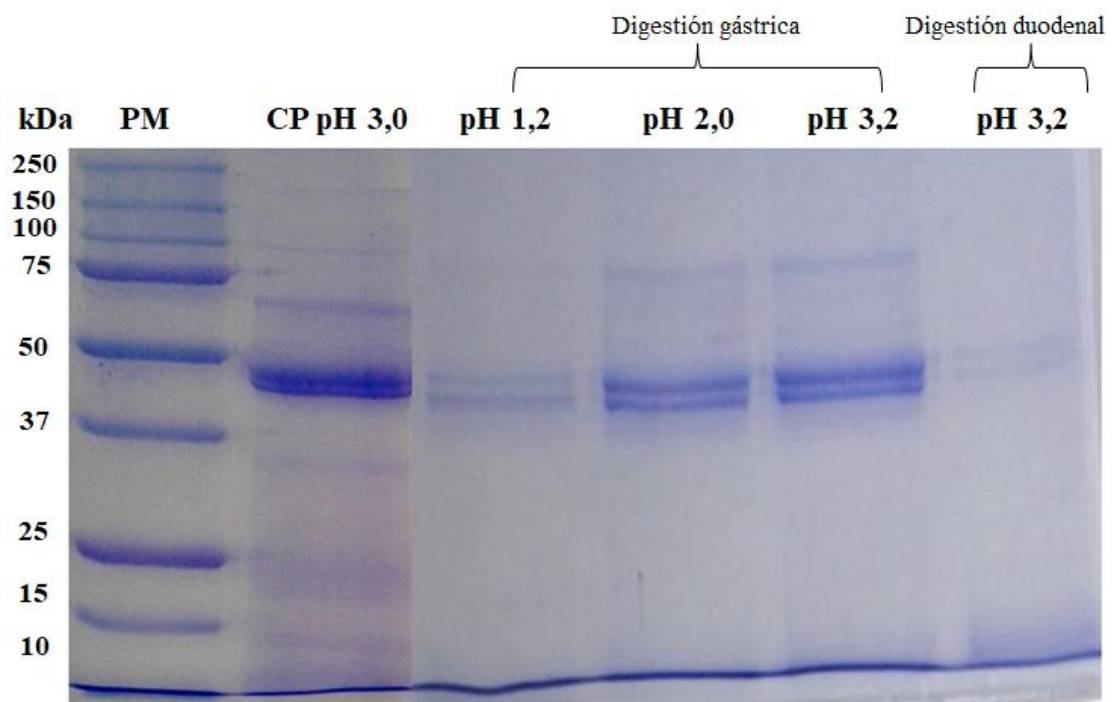


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol del concentrado proteico y de los productos de la simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal *in vitro* del concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM), concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0 (CP).*

En la Figura 9 se observa que a pH 1,2 se produjo el mayor grado de hidrólisis enzimática del concentrado de gandul maduro, sin embargo, se aprecian bandas polipépticas tenues por debajo de 37,0 kDa, que pertenecen a las globulinas 11S (subunidad básica) que al parecer son resistentes a la acción de la pepsina; por ende las proteínas del gandul maduro no se hidrolizarían en el estómago de adultos y niños, pero si en el estómago de personas con padecimientos gástricos pudiendo ser incluida en la dieta y contribuir al mejoramiento de la salud.

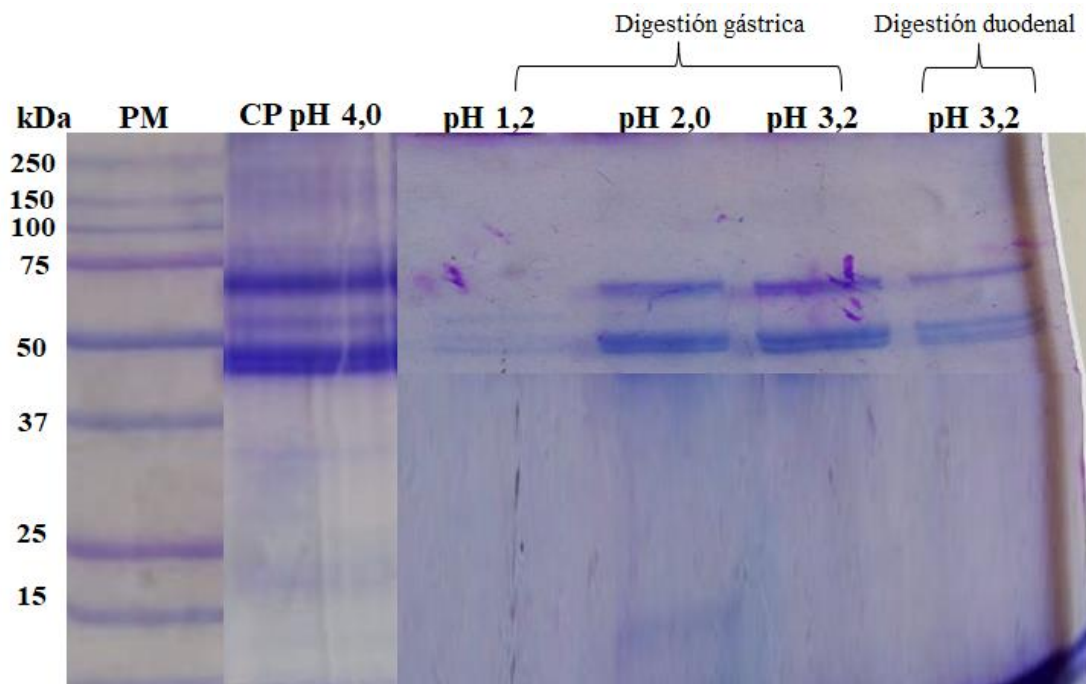


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol del concentrado proteico y de los productos de la simulación de la digestibilidad gastrointestinal y duodenal *in vitro* del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0. *Estándar preteñido de pesos moleculares (PM), concentrado proteico de gandul verde precipitado a pH 3,0 (CP).*

A valores de pH 2,0 y 3,2 no existió hidrólisis de la proteína, el perfil electroforético se encuentra casi intacto, con la presencia de bandas entre 15,0 y 37,0 kDa que corresponden a las globulinas 11S. Estudios realizados en otras leguminosas demuestran que en *Phaseolus vulgaris* la faseolina (globulina 7S), en *Phaseolus sativum* L. la vicilina (globulina 7S) y en *Glycine max* L. la glicinina (globulina 11S), presentan resistencia a las proteasas (Carbonaro *et al.*, 2005).

Existen compuestos como las saponinas y las lectinas que son productos del metabolismo secundario sintetizados por las plantas como mecanismo de defensa y reciben el nombre de factores antinutricionales (compuestos presentes en una amplia

variedad de alimentos de origen vegetal, que, cuando se consumen, tienden a reducir el valor nutritivo, lo que interfiere con la digestibilidad, absorción e inhibición de nutrientes como proteínas y minerales), estos compuestos son inhibidores de proteasas que influyen en los procesos de digestión, en la actividad de ciertas enzimas, en la biodisponibilidad y en la absorción intestinal de los nutrientes (**Filho et al., 2017**). Frente a este hecho, **Ng et al. (2015)** mencionan que las saponinas son capaces de formar complejos con el hierro y el zinc disminuyendo su absorción intestinal; en cuanto a las lectinas, estas son resistentes a la degradación por calentamiento y enzimas digestivas.

3.1.7. Actividades Biológicas

3.1.7.1. Actividad antiinflamatoria del concentrado proteico

La inflamación es una respuesta fisiológica de defensa del organismo frente a estímulos nocivos (patógenos, células dañadas, traumas físicos o irritantes), consiste en un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, se caracteriza por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (**Bayarsaihan, 2011; Hutchinson et al., 2011**).

Los porcentajes de actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gándul maduro obtenido a pH 4,0 se encuentran en la Tabla 10 y los resultados de la actividad antiinflamatoria del diclofenaco, utilizado como patrón, en la Tabla 12. Se observa que el porcentaje de actividad es directamente proporcional a la concentración, es decir, a mayor concentración mayor actividad antiinflamatoria, obteniendo el mayor valor ($46,07 \% \pm 0,15$) a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figura 11). Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó el análisis mediante pruebas de múltiples rangos. En la Tabla 11 se detallan los resultados de la comparación múltiple y en la Figura 10 la comparación de medias para la actividad antiinflamatoria.

Tabla 10. *Actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0*

Concentración [µg/mL]	Promedio (%) ± Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	9,39 ± 0,10	1,06
200	14,63 ± 0,10	0,68
500	31,93 ± 0,15	0,48
1000	46,07 ± 0,15	0,33

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

La mitad inferior de la salida (Tabla 11) muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza, por lo tanto, la concentración del concentrado proteico influye en el porcentaje de actividad antiinflamatoria.

Tabla 11. *Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0; comparación múltiple*

Contraste	Sig.	Diferencia
100-200	*	-5,2
100-500	*	-22,5333
100-1000	*	-36,6333
200-500	*	-17,3333
200-1000	*	-31,4333
500-1000	*	-14,1

Fuente: Statgraphics, 2018

El * indica una diferencia significativa con un nivel del 95,0 % de confianza.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

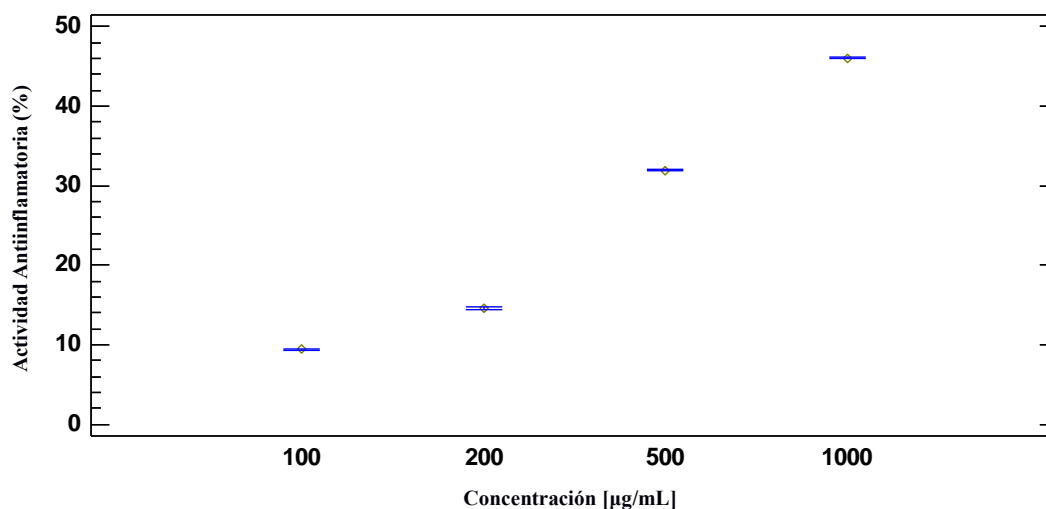


Figura 10. Comparación de medias para la actividad antiinflamatoria en el concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0
Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 12. Actividad antiinflamatoria del diclofenaco de sodio, 75mg/3mL, MK[®]

Concentración [µg/mL]	Promedio (%) ± Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	30,53 ± 0,06	0,19
200	47,83 ± 0,12	0,24
500	60,37 ± 0,06	0,10
1000	80,87 ± 0,06	0,07

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

En la Figura 11 se compara la actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 con la actividad del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL y del hidrolizado. Existen estudios en los cuales se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de fuentes vegetales, así, **Tamayo et al. (2018)** reportaron que el concentrado de *Phaseolus lunatus* L. obtenido a pH 5,0 de precipitación y a una concentración de 1000 µg/mL, presenta un valor de actividad de 21,53 % ± 0,39, **Quinteros (2016)** reportó que el aislado de *Plukenetia volubilis* L. ensayado también a la concentración de 1000 µg/mL presentó un porcentaje de actividad de 21,87 %.

3.1.7.2. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico

La hidrólisis proteica permite mejorar las características nutricionales, retrasar el deterioro, eliminar compuestos antinutritivos, así como modificar las propiedades funcionales, también genera péptidos cuyo valor nutricional es mayor que el de la proteína nativa o los aminoácidos libres. Adicionalmente, la proteólisis *in vitro* se puede considerar como una predigestión de las proteínas que mejora su absorción a nivel intestinal (Meisel & FitzGerald, 2003).

Los péptidos presentan una amplia gama de actividades biológicas, relacionadas con su secuencia aminoacídica, características estructurales, propiedades de hidrofobicidad o carga y la capacidad de enlazar microelementos (Borja, 2014; Sánchez *et al.*, 2016); Iwaniak & Minkiewicz (2007) mencionan que los péptidos bioactivos, además de su valor nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer efectos biológicos específicos.

En la Tabla 13 se presentan los resultados de la actividad antiinflamatoria obtenidos en el hidrolizado proteico de gandul maduro, se observa que a una concentración de 1000 µg/mL existe un porcentaje de actividad de 66,0 % ± 0,17. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó el análisis estadístico de pruebas de múltiples rangos y comparación de medias cuyos resultados resume la Tabla 14. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 13. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico obtenido a partir del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0

Concentración [µg/mL]	Promedio (%) ± Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	19,50 ± 0,10	0,51
200	30,97 ± 0,15	0,49
500	49,63 ± 0,21	0,42
1000	66,00 ± 0,17	0,26

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 14. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0; comparación múltiple

Contraste	Sig.	Diferencia
100-200	*	-11,47
100-500	*	-30,13
100-1000	*	-46,50
200-500	*	-18,67
200-1000	*	-35,03
500-1000	*	-16,37

Fuente: Statgraphics, 2018

* Indica una diferencia significativa.

Los resultados demuestran que existen péptidos con actividad antiinflamatoria en el hidrolizado de gandul maduro, pudiéndose transformar en un sustituto a fármacos como el diclofenaco MK® en ampolla de 75mg/3mL. De igual manera, la concentración influye en el porcentaje de actividad, sin embargo, el hidrolizado presentó mayor actividad con respecto al concentrado a todas las concentraciones ensayadas (Figura 11).

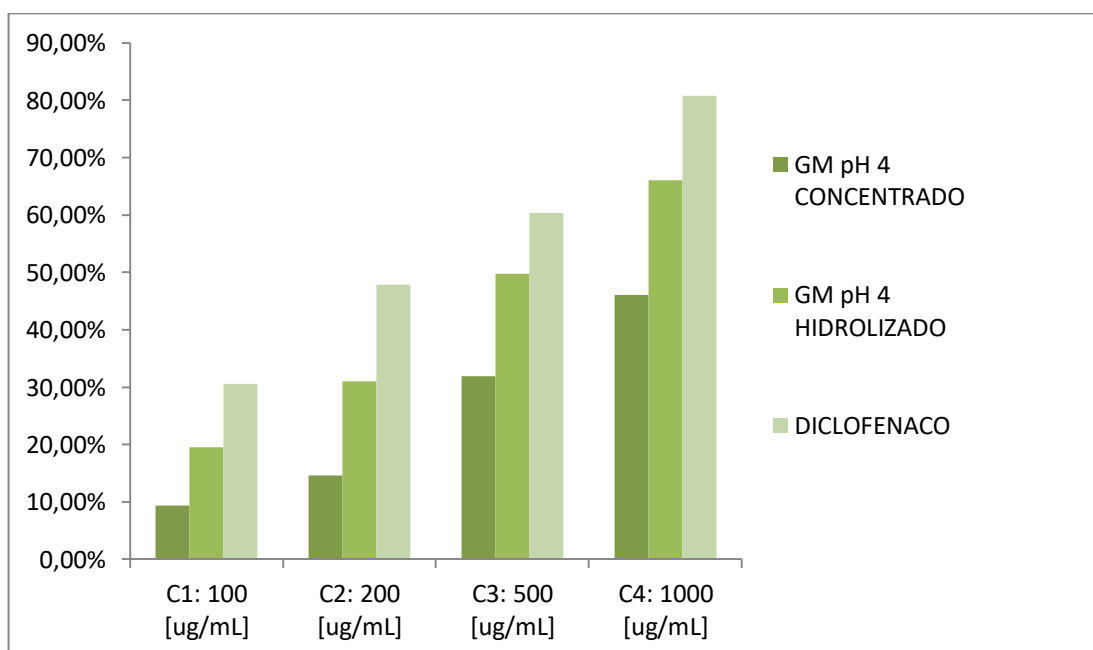


Figura 11. Actividad antiinflamatoria del concentrado e hidrolizado de gandul maduro (GM) y del diclofenaco MK® en ampolla de 75mg/3mL

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

3.1.7.3. Actividad antioxidante del concentrado proteico

Existe un creciente interés en los antioxidantes naturales, ya que son más seguros para los consumidores que los antioxidantes sintéticos (Torres *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, un ejemplo es la peroxidación lipídica; un antioxidante actúa debido a su capacidad para reaccionar con radicales libres recibiendo el nombre de antioxidante terminador de cadena, el término de actividad estabilizadora de radicales libres está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción, en cambio la actividad antioxidante mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa (Penas *et al.*, 2015).

El principio del método de TBARS consiste en neutralizar los radicales libres (en forma hidrofóbica e hidrofílica), la reacción ocurre entre dos moléculas de TBA con un malondialdehído, teniendo como resultado compuestos rojos (Delgado, 2015). Mediante este método se determinó la actividad antioxidante en el concentrado (Tabla 15) e hidrolizado proteico (Tabla 18) de gandul maduro obtenido a pH 4,0.

Como se observa en la Tabla 15 a mayor concentración proteica es mayor la actividad antioxidante. En el análisis estadístico se encontró que el valor-P es menor que 0,05, lo cual significa que existe diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante y las diferentes concentraciones, con un nivel del 95,0 % de confianza, por tal razón se propuso realizar pruebas de múltiples rangos (Tabla 16).

Tabla 15. Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0

Concentr. del concentrado [$\mu\text{g/mL}$]	Actividad antioxidante Promedio (%) \pm Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	13,27 \pm 0,50	3,79
200	21,30 \pm 0,50	2,35
500	33,03 \pm 0,68	2,06
1000	41,13 \pm 0,61	1,49

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 16. Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0: pruebas de múltiples rangos

Contraste	Sig.	Diferencia
100-200	*	-8,03333
100-500	*	-19,7667
100-1000	*	-27,8667
200-500	*	-11,7333
200-1000	*	-19,8333
500-1000	*	-8,1

Fuente: Statgraphics, 2018

* Indica una diferencia significativa.

Se realizó el procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. Finalmente se realizó un gráfico de comparación de medias (Figura 12) para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

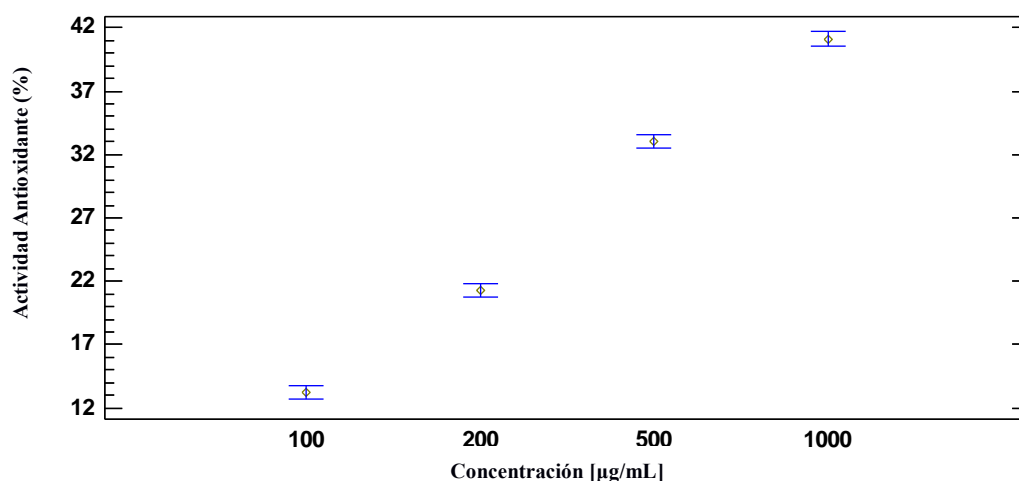


Figura 12. Comparación de medias para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0

Fuente: Statgraphics, 2018

En el concentrado proteico el porcentaje de mayor actividad antioxidante (41,13 %) se obtuvo con la concentración de 1000 [µg/mL], valor inferior al del BHT (70,17 %) a la misma concentración. El valor de 41,13 % es superior en 30 % al encontrado por Tamayo et al. (2018) en la variedad *Phaseolus lunatus* L (31,19 %), sin embargo, es

inferior al porcentaje (82,25 %) reportado por **Vallejo (2018)** en la variedad *Pisum sativum* y al reportado por **Galarza (2017)** (92,89 %) en la variedad *Lablab purpureus* L. Sweet.

Como control se empleó el BHT que es un antioxidante comercial, los valores de actividad se detallan en la Tabla 17 y la comparación con la capacidad antioxidante del concentrado e hidrolizado proteico de gandul maduro se aprecia en la Figura 13.

Tabla 17. *Actividad antioxidante del BHT*

Concentración de BHT [µg/mL]	Actividad antioxidante Promedio (%) ± Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	33,73 ± 0,45	1,33
200	43,63 ± 0,35	0,80
500	58,73 ± 0,51	0,87
1000	70,17 ± 0,61	0,87

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

La actividad antioxidante del gandul maduro se atribuye a que en su composición se encuentran compuestos fenólicos (**Beninger & Hosfield, 2003**), los alimentos con altos porcentajes de compuestos antioxidantes como fenoles son beneficiosos para la salud, debido a que previenen enfermedades como el cáncer y la obesidad relacionadas con el estrés oxidativo (**Morillas, 2012**).

3.1.7.4. Actividad antioxidante del hidrolizado proteico

Los antioxidantes sintéticos tienen posibles efectos tóxicos, promoviendo el interés en la búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes, considerando a las leguminosas como principal opción (**Taghvaei & Jafari, 2015**).

Existen numerosos estudios respaldando que los péptidos obtenidos de proteínas vegetales poseen actividad antioxidante (**Gallegos et al., 2013; Olagunju et al., 2018; Pierre et al., 2017; Sánchez et al., 2016**). **Olagunju et al. (2018)** reportan que el gandul es una fuente potencial de péptidos bioactivos, los cuales podrían ser útiles como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales con efectos beneficiosos para la salud, por lo cual en este estudio, se determinó la actividad antioxidante de los péptidos con los resultados detallados en la Tabla 18.

Tabla 18. *Actividad antioxidante del hidrolizado proteico obtenido a partir del concentrado de gandul maduro precipitado a pH 4,0*

Concentración del hidrolizado [µg/mL]	Actividad antioxidante Promedio (%) ± Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
100	19,43 ± 0,21	1,07
200	29,67 ± 0,35	1,18
500	40,47 ± 0,25	0,62
1000	57,47 ± 0,25	0,44

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Se observa que los resultados de actividad antioxidante obtenidos con el hidrolizado proteico aumentaron respecto al concentrado (Figura 13). En el análisis estadístico se obtuvo que el valor-P es menor que 0,05 existiendo diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antioxidante de los ensayos realizados a las distintas concentraciones, por tanto, para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó el análisis mediante Pruebas de Múltiples Rangos (Tabla 19). El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 19. *Actividad antioxidante del hidrolizado proteico de gandul maduro: pruebas de múltiples rangos*

Contraste	Sig.	Diferencia
100-200	*	-10,23
100-500	*	-21,03
100-1000	*	-38,03
200-500	*	-10,80
200-1000	*	-27,80
500-1000	*	-17,00

Fuente: Statgraphics, 2018

* Indica una diferencia significativa.

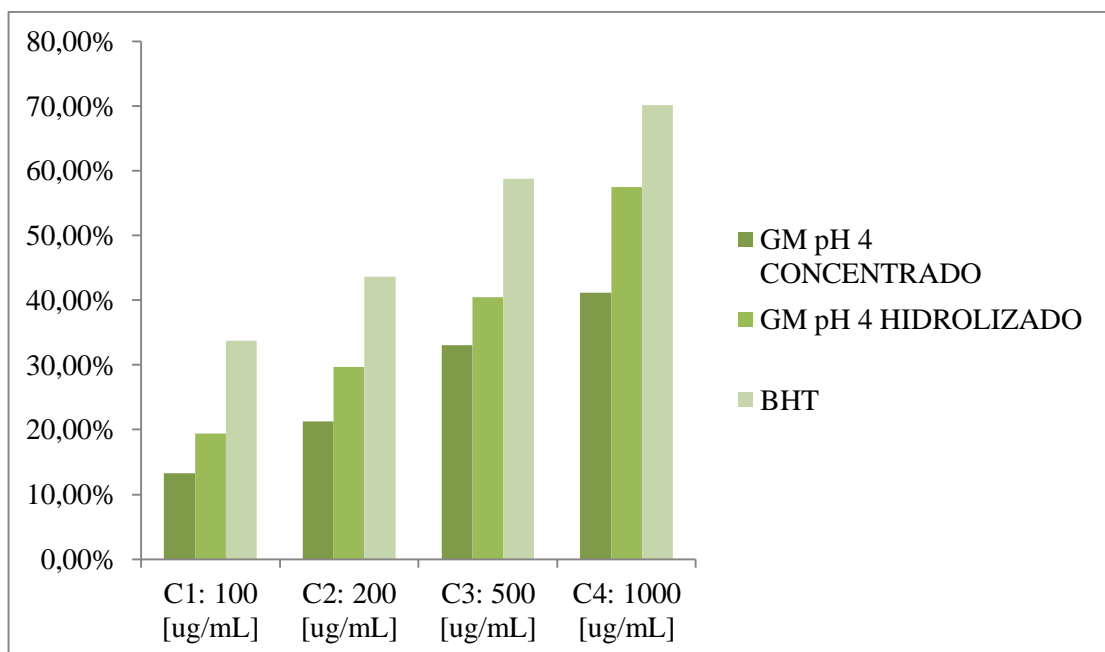


Figura 13. Actividad antioxidante del concentrado e hidrolizado proteico de gandul maduro (GM) y del BHT

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Se ha demostrado que tanto el concentrado como el hidrolizado de gandul maduro tienen propiedades antioxidantes, con valores de 41,13 % y 57,47 %, respectivamente. **Tamayo et al. (2018)** evaluaron la actividad antioxidante en el hidrolizado de *Phaseolus lunatus* L obteniendo 77,17 %. Resultados similares fueron reportados por **Garcia et al. (2015)**.

Stanisavljević et al. (2015) explican que los fragmentos de péptidos del gandul son ricos en aminoácidos hidrófobos y polares, que previamente han mostrado efectos antioxidantes, aminoácidos aromáticos (pueden donar protones a radicales deficientes de electrones, mejorando su propiedad de atrapar radicales libres) que también podrían contribuir a la actividad antioxidante, además los péptidos con actividad antioxidante forman parte de las proteínas de reserva, mismas que son abundantes en las leguminosas.

La diferencia entre los valores de actividad antioxidante del hidrolizado (57,47 %) y del BHT (70,17 %) no es muy amplia (23 %), por lo que el hidrolizado podría considerarse como alternativa en el uso de antioxidantes naturales.

3.2.Verificación de hipótesis

Con la información obtenida y con un nivel de confianza del 95 % se establece lo siguiente:

3.2.1. Rendimiento de concentrados proteicos preparados mediante precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH a partir de harinas de gandul (*Cajanus cajan*)

Con el análisis de varianza de un solo factor se determinó que existieron diferencias significativas en el rendimiento de extracción de la proteína en relación al pH de precipitación empleado, por lo que la precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) influye en el rendimiento y caracterización de las proteínas presentes en harinas de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro.

3.2.2. Contenido proteico de los concentrados de harina de gandul (*Cajanus cajan*)

Con el análisis de varianza de un solo factor para el contenido proteico de los concentrados de gandul verde y maduro, se demostró que existieron diferencias significativas entre los precipitados de gandul (*Cajanus cajan*) verde y maduro obtenidos a diferentes valores de pH (pH 6,0; 5,0; 4,0 y 3,0) mediante precipitación isoelectrica.

3.2.3. Hidrólisis enzimática del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*)

Las proteínas presentes en los concentrados de gandul verde obtenidos del mejor tratamiento (pH 3,0) son hidrolizadas parcialmente en la digestión gástrica.

Las proteínas presentes en los concentrados de gandul maduro obtenidos del mejor tratamiento (pH 4,0) no son hidrolizadas en el estómago de adultos y niños, pero si en el estómago de personas con padecimientos gástricos, consecuentemente las proteínas presentes en los concentrados de gandul verde y maduro no pueden ser digeridas en su totalidad.

3.2.4. Actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro

De acuerdo con el análisis estadístico, se concluye que las concentraciones proteicas utilizadas en la evaluación de la actividad antiinflamatoria influyen significativamente en el resultado de esta evaluación.

3.2.5. Actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro

En base al análisis estadístico realizado, las concentraciones proteicas empleadas en el ensayo influyen significativamente en la actividad antioxidante.

3.2.6. Actividad antiinflamatoria del hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro

Mediante el análisis estadístico realizado, se determinó que las concentraciones proteicas del hidrolizado influyen significativamente en la magnitud de la actividad antiinflamatoria, rechazándose la hipótesis nula.

3.2.7. Actividad antioxidante del hidrolizado proteico de gandul (*Cajanus cajan*) maduro

A través del análisis estadístico realizado, se definió que las concentraciones proteicas del hidrolizado influyen significativamente en la magnitud de la actividad antioxidante, rechazándose la hipótesis nula.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se aislaron las proteínas presentes en harinas de gandul (*Cajanus cajan*) mediante precipitación isoelectrica a diferentes valores de pH después de la solubilización de la proteína a pH 8,0. En la harina de gandul verde a pH 3,0 se obtuvo el mayor porcentaje de extracción (0,62 %), a los valores de pH 4,0; 5,0 y 6,0 no se observó precipitación. En la harina de gandul maduro a pH 4,0 se obtuvo el mayor porcentaje de extracción (11,35 %), mientras que a pH 5,0 (10,35 %) y pH 3,0 (11,30 %) el porcentaje de extracción fue similar.
- Se caracterizaron por peso molecular las proteínas aisladas de harina de gandul (*Cajanus cajan*) a diferentes valores de pH de precipitación mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. Se observó similitud en los perfiles electroforéticos de gandul verde y maduro. En el gandul verde se observaron bandas entre 15,0 y 100 kDa pertenecientes a las albúminas 2S y globulinas 7S, respectivamente; en el gandul maduro se observaron bandas entre 10,0 y 75,0 kDa, las bandas con mayor intensidad fueron las cercanas a 50,0 y 70,0 kDa que corresponden a la proteína globulina 7S.
- Se cuantificó mediante el método espectrofotométrico de Biuret el contenido proteico de los concentrados preparados a partir de harina de gandul (*Cajanus cajan*), y se obtuvieron valores de concentración proteica mayores al 100 % por lo que se optó por realizar la cuantificación mediante el método de MicroKjeldahl. El mayor contenido proteico tuvo el concentrado obtenido a pH 6,0 con un valor de 77,32 %; en los concentrados obtenidos a pH 4,0 y 5,0 los contenidos de proteína fueron similares entre sí con 73,41 % y 75,51 %, respectivamente.

- Se realizó la simulación de las condiciones fisiológicas para la hidrólisis enzimática de los concentrados proteicos de gandul (*Cajanus cajan*), se trabajó con fluidos gástricos a valores de pH 1,2; 2,0 y 3,2 que equivalen al pH del estómago de personas que padecen enfermedades gástricas, de un adulto sano y de niños no lactantes respectivamente; en la digestión gástrica, tanto en el gandul verde como en el gandul maduro, a pH 1,2 se produjo la hidrólisis enzimática (ausencia de bandas polipeptídicas), sin embargo en el gandul verde a pH 2,0 y 3,2 se observan bandas polipeptídicas entre 37,0 y 50,0 kDa, bandas que pertenecen a las globulinas 11S y 7S y en el gandul maduro se aprecian bandas polipeptídicas tenues por debajo de los 37,0 kDa, que pertenecen a las globulinas 11S; a los valores de pH 2,0 y 3,2 no existió hidrólisis de la proteína.
- Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro* (método de desnaturalización de proteína) y actividad antioxidante (método de TBARS). El porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado e hidrolizado proteico de gandul maduro obtenidos a pH 4,0 fue 46,07 % y 66,0 %, respectivamente; en cambio el porcentaje de actividad antioxidante fue de 41,13 % en el concentrado y 57,47 % en el hidrolizado proteico de gandul maduro obtenidos a pH 4,0.

4.2.Recomendaciones

- Realizar la cuantificación proteica mediante métodos alternativos como Lowry, Dumas o la determinación de nitrógeno en los sobrenadantes para consolidar los resultados obtenidos en este estudio.
- Como tratamiento previo, fermentar los granos de gandul con el fin de mejorar significativamente las propiedades funcionales de la harina.
- Debido a las actividades biológicas potenciales (antiinflamatoria y antioxidante) presentadas en el hidrolizado proteico de gandul maduro, se sugiere realizar estudios *in vivo* para confirmar el efecto biológico de los

péptidos, para que posteriormente puedan ser considerados como una opción en la formulación de alimentos funcionales y medicinales o en el desarrollo de nuevos productos dentro de la industria alimenticia y farmacéutica.

- Extraer los fenoles de la harina de gandul previo al aislamiento de las proteínas para determinar si la actividad antioxidante detectada en concentrados e hidrolizados proteicos de gandul maduro se debe a la presencia de péptidos bioactivos o al aporte de moléculas como los compuestos fenólicos.
- En los concentrados sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* aplicar el test de Elisa para confirmar la alergenicidad que podrían presentar las proteínas resistentes a las enzimas digestivas.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abugoch, L., Romero, N., Tapia, C., Silva, J & Rivera, M. (2008). "Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates". *J Agric Food Chem*, 56(12), 4745-4750. doi: <https://doi.org/10.1021/jf703689u>
- Albornoz, M & Romero, V. (2004). *Utilización de la harina de guandul (Cajanus cajan L.) para incrementar el aporte proteico en la elaboración de pastas alimenticias* (Pregrado), Universidad de la Salle, Bogotá:Colombia. Retrieved from <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/15990/00798385.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Alhakmani, F., Kumar, S & Khan, S. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(8), 623-626. doi: [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60126-4)
- AOAC. (2012). Official Method of Analysis 925.10. Moisture determination (15th ed.). USA.
- Aremu, M., Olaofe, O & Akintayo, E. (2006). A comparative study on the chemical and amino acid composition of some Nigerian under-utilized legume flours. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1), 34-38. doi: <https://doi.org/10.3923/pjn.2006.34.38>
- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H & Bachmann, M. (2012). Protein Electrophoresis: Methods and Protocols Native Polyacrylamide Gels In Kurien, B & Hal, R (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 869, pp. 5): Springer Science Business Media.
- Bannon, G., Fu, T., Kimber, I & Hinton, D. (2003). Protein digestibility and relevance to allergenicity. *Environmental health perspectives*, 111(8), 1122-1124. doi: [10.1289/ehp.5812](https://doi.org/10.1289/ehp.5812)
- Bayarsaihan, D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*, 90(1), 9-17. doi: <https://doi.org/10.1177/0022034510378683>
- Beninger, C & Hosfield, G. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J Agric Food Chem*, 51(27), 7879-7883. doi: [10.1021/jf0304324](https://doi.org/10.1021/jf0304324)

- Betancur, D., Gallegos, S & Chel, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: Partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Betancur, D., Martinez, R., Corona, A., Castellanos, A., Jaramillo, E & Chel, L. (2009). "Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds". *International Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 128-137. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01690.x>
- Borja, J. (2014). *Obtención de péptidos bioactivos de Lupinus mutabilis ("tarwi") mediante proteasas de Bacillus sp.* (Tesis de Pregrado), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Retrieved from http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3924/Borja_lj.pdf?sequence=1
- Butt, M & Batoool, R. (2010). Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 373-379 doi: <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.373.379>
- Caballero, S., Wiszovaty, L., Piris, P., Mereles, L & Michajluk, J. (2013). Composición química y valor nutricional del "kumanda yvyra'i", *Cajanus cajan* (L.) Huth (FABACEAE). *ROJASIANA*, 12(1), 23-27.
- Camacho, M., Peinado, L., López, J., Valdez, Á., Salinas, R., Moreno, C & Medina, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*, 6(1), 23-36.
- Carbonaro, M., Grant, G & Cappelloni, M. (2005). "Heat-induced denaturation impairs digestibility of legume (*Phaseolus vulgaris* L and *Vicia faba* L) 7S and 11S globulins in the small intestine of rat". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 65-72. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1940>
- Córsico, B., Falomir, L., Franchini, G & Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas* (Primera ed.). La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Costa, S., Montenegro, M., Arregui, T., Pinto, I., Nazareno, M & Mishima, B. (2003). Caracterización de acelga fresca de Santiago del Estero (Argentina). Comparación del contenido de nutrientes en hoja y tallo. Evaluación de los

- carotenoides presentes. *Food Science and Technology*, 23(1), 33-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000100008>
- Chang, S. (2010). Protein Analysis. In Nielsen, S (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual* (Segunda ed., pp. 139). Estados Unidos Springer
- Cheison, S., Zhang, S., Wang, Z & Xu, S. (2009). "Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor". *Food Research International*, 42(1), 91-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.003>
- Chew, P., Casey, J & Johnson, K. (2003). "Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration". *Food Chem*, 83(4), 575-583. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00156-0)
- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. In Damodaran, S, Parkin, K & Fennema, O (Eds.), *Química de los Alimentos* (Tercera ed., pp. 440-444).
- Dávalos, H., Herrera, G & Astudillo, A. (2008). *Obtención de almidón resistente de amaranto* Paper presented at the V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular México. <http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/chiapas/cd/Biotecnologia%5C Extensos%5C224076.pdf>
- Delgado, C. (2015). *Amaranto como ingrediente funcional: propiedades antioxidantes de proteínas y péptidos*. (Doctorado), Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10915/46175>
- Díaz, J., Rojas, G., Him, Y., Hernández, N., Torrealba, E & Rodríguez, Z. (2011). Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento en vivero de Cocuy (*Agave cocui* Trelease). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 28(1), 264-272.
- Drago, S., González, R., Chel, L & Valencia, M. (2007). Evaluación de la Disponibilidad de Minerales en Harinas de Frijol y en Mezclas de Maíz/Frijol Extrudidas. *Información tecnológica*, 18(1), 41-46. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100007>
- FAO. (2007a). *Cajanus cajan* [online]. from <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=576>

- FAO. (2007b). *Cereales, legumbres, leguminosas y productos proteínicos vegetales* (Primera ed.). Roma.
- Filho, A., Pirozi, M., Borges, J., Pinheiro, H., Chaves, J & Coimbra, J. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618-1630. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>
- Flores, L & Ruiz, A. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 371-381.
- Galarza, I. (2017). *Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro y actividad antioxidante en concentrados proteicos de zarandaja (Lablab purpureus L. Sweet)*. (Pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26601/1/AL%20645.pdf>
- Gallegos, S., Chel, L., Corzo, L & Martinez, A. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. In Segura, M, Chel, L & Betancur, D (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience.
- Gangwar, L & Bajpai, G. (2006). Seed protein variation in interspecific hybrids of pigeonpea. *Indian Journal Crop Science*, 1(2), 125-128.
- García, M., Gómez, I., Espinoza, C., Bravo, F & Ganoza, L. (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos (8^o ed., pp. 54). Lima: Instituto Nacional de Salud del Perú.
- García, O., Aiello, C., Peña, M., Ruiz, J & Acevedo, I. (2012). Caracterización fisico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sometidos a diferentes procesamientos. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 919-928.
- García, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Bastida, J., Wiczkowski, W., Zielinska, D & Martinez, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18(1), 319-332. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010>

- Granado, F & Hernández, E. (2016). Functional Foods and Health Effects: A Nutritional Biochemistry Perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 23. doi: <https://doi.org/10.2174/0929867323666160615105746>
- Granito, M., Valero, Y & Zambrano, R. (2010). Desarrollo de productos horneados a base de leguminosas fermentadas y cereales destinados a la merienda escolar. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(1), 85-92.
- Greenfield, H & Southgate, D. (2003). Examen de los métodos de análisis. In Burlingame, B & Charrondiere, U (Eds.), *Datos de composición de alimentos* (Segunda ed., pp. 117-161). Roma: Elsevier Science Publishers.
- Gregorio, J., Lanza, P., Churión, C & Gómez, N. (2016). Comparación entre el método Kjeldahl tradicional y el método Dumas automatizado (n cube) para la determinación de proteínas en distintas clases de alimentos. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28(2), 245-249.
- Guzmán, M., Vicario, I & Guillén, R. (1997). "Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid". *J Agric Food Chem*, 45(7), 2452-2457. doi: <https://doi.org/10.1021/jf960965v>
- Hani de Ardila, A. (2009). Fisiopatología de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24(1), 87-94.
- Herrera, C., Bolaños, V & Nuria, G. (2003). *Química de los Alimentos* (Primera ed.). Costa Rica.
- Higuera, A., Ferrer, O., Boscán, D., Canelón, A., Montiel, M & Castro, C. (2001). Efecto de la altura y tiempo de corte sobre el contenido mineral de hojas y tallos de tres variedades quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp con fines de alimentación animal. *Revista Científica (FCV-LUZ)*, 11(6), 491-500.
- Hojilla, P., Sessa, J & Mohamed, A. (2004). "Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration-diafiltration". *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81(12), 1153-1157. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-004-1033-1>
- Hutchinson, J., Rajagopal, S., Sales, K & Jabbour, H. (2011). Molecular regulators of resolution of inflammation: potential therapeutic targets in the reproductive system. *Reproduction*, 142(1), 15-28. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep-11-0069>

- INIAP. (2017). Tabla de análisis del Laboratorio de Nutrición y Calidad. Quito, Ecuador: Departamento de Nutrición y Calidad.
- Iwaniak, A & Minkiewicz, P. (2007). "Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides". *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 5-15.
- Jiménez, R., Martos, G., Carrillo, W., López, R & Molina, E. (2012). "Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests". *Food Chem*, 127(4), 1719-1726. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Kaur, M & Singh, N. (2007). "*Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (Cicer arietinum L.) cultivars*" (Vol. 102).
- Klodmann, J., Lewejohann, D & Braun, H. (2011). "Low-SDS Blue native PAGE". *Proteomics*, 11(9), 1834-1839. doi: <https://doi.org/10.1002/pmic.201000638>
- Kong, Y., Fu, Y., Zu, Y., Chang, F., Chen, Y., Liu, X., Stelten, J & Schiebel, H. (2010). "Cajanuslactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves". *Food Chem*, 121(4), 1150-1155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.062>
- Korhonen, H & Pihlanto, A. (2006). Bioactive Peptides: Production and Functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Laemmli, U. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227, 680. doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J & Millán, F. (2002). "*Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization". *Food Chem*, 76(3), 349-356. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00285-0)
- Maldonado, A & Jorrín, J. (2001). #Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*" *Proyecto de Innovación y Mejora de la Calidad Docente VI Convocatoria* (pp. 16). España.
- Martínez, N & Añón, C. (1996). "Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study". *J Agric Food Chem*, 44(9), 2523-2530. doi: <https://doi.org/10.1021/jf960169p>
- Martínez, P., Lucía, M., Gómez, D & Albarracín, S. (2011). "Purification and carbohydrate determination of vicilin from *Canavalia ensiformis*". *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 40(1), 5-26.

- Meisel, H & FitzGerald, R. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des*, 9(16), 1289-1295.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D., Menard, O., Recio, I., Santos, C., Singh, R., Vegarud, G., Wickham, M., Weitschies, W & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5(6), 1113-1124. doi: <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mizubuti, I., Biondo, O., De Oliveira, L., Dos Santos, R & Iouko, E. (2000). Propriedades funcionais da farinha e concentrado protéico de feijão guandu *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 274-280.
- Morales, J., Vázquez, N., Torres, N., Gil, L & Bressani, R. (2007). "Preparation and characterization of protein isolate from fresh and hardened beans (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Journal of Food Science*, 72(2), C96-C102. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00244.x>
- Morán, R. (2017). *Caracterización de concentrados proteicos, determinación de la actividad antioxidante y cuantificación de fenoles solubles totales de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris)*. (Pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26870/1/AL%20651.pdf>
- Morillas, J. (2012). Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes
- Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Dialnet*, 32(2), 8-20.
- Morris, H., Carrillo, O., Almarales, Á., Bermúdez, R., Alonso, M., Borges, L., Quintana, M., Fontaine, R., Llauradó, G & Hernández, M. (2009). Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. *Biotecnología Aplicada*, 26, 162-165.
- Muñoz, J. (2008). *Capacidad antioxidante en seis especies vegetales de la selva peruana* (Tesis de Pregrado), UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA, Lima-Perú. Retrieved from

<http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/683/T.FRS-57.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nasir, C., Azim, M., Qadir, G & Rabbani, M. (2010). Characterization of castor bean genotypes under various environments using SDS-PAGE of total seed storage proteins. *Pakistan Journal of Botany*, 42(10), 1797-1805.

Navarro, C., Restrepo, D & Perez, J. (2014). El guandul (*Cajanus cajan*) una alternativa en la industria de los alimentos. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 197-206.

Nelson, L & Cox, M. (2001). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (3a ed.). Barcelona: Omega.

Ng, T., Chan, Y., Ng, C & Wong, J. (2015). "Purification and Characterization of a Lectin from Green Split Peas (*Pisum sativum*)". *Appl Biochem Biotechnol*, 177(6), 1374-1385. doi: 10.1007/s12010-015-1821-x

Nicholson, R., David, L., Pan, R & Liu, X. (2010). "Pinostrobin from *Cajanus cajan* (L.) Millsp. inhibits sodium channel-activated depolarization of mouse brain synaptoneuroosomes". *Fitoterapia*, 81(7), 826-829. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.005>

Nkonge, C & Ballance, M. (1982). "A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in microKjeldahl digests". *J Agric Food Chem*, 30(3), 416-420. doi: <https://doi.org/10.1021/jf00111a002>

Olagunju, A., Omoba, O., Enujiugha, V., Alashi, A & Aluko, R. (2018). Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. *LWT*, 97, 269-278. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.003>

Oloyo, R. (2004). Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. *Food Chem*, 85(4), 497-502. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00454-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00454-5)

Oseguera, M. (2009). *Actividad antioxidante y antiinflamatoria de hidrolizados de proteína de dos variedades de frijol común*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Querétaro. México.

Oshodi, A., Olaofe, O & Hall, G. (2009). "Amino acid and mineral composition of pigeon pea (*Cajanus cajan*)". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43(1), 187-191. doi: <https://doi.org/10.3109/09637489309027541>

- Padmanabhan, J. (2012). Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 109-116.
- Pagán, J., Ibarz, A., Falguera, V & Benítez, R. (2013). Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 655-659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.040>
- Pal, D., Mishra, P., Sachan, N & Ghosh, A. (2011). Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L)Millsp. 2(1), 207-214. doi: <https://doi.org/10.4103/2231-4040.90874>
- Pazmiño, A., Vásquez, G & Carrillo, W. (2018). "Pigeon pea protein concentrate (*Cajanus cajan*) seeds grown in Ecuador functional properties". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(6), 1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24966>
- Penas, E., Limon, R., Martinez, C., Restani, P., Pihlanto, A & Frias, J. (2015). "Impact of Elicitation on Antioxidant and Potential Antihypertensive Properties of Lentil Sprouts". *Plant Foods Hum Nutr*, 70(4), 401-407. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-015-0508-3>
- Perry, R. (2001). *Manual del Ingeniero Químico* (McGraw-Hill Ed. 7th ed. Vol. 1).
- Pierre, N., Fombang, E & Mbofung, C. (2017). The effect of steam blanching and drying method on nutrients, phytochemicals and antioxidant activity of moringa (*Moringa oleifera* L.) leaves. *American Journal of Food Science and Technology*, 5(2), 53-60. doi: 10.12691/ajfst-5-2-4
- Pilicita, G. (2017). *Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro, actividad antioxidante y determinación de polifenoles de las proteínas de papillas para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papas nativas ecuatorianas (Solanum tuberosum ssp.)*. (Tesis de Pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26601/1/AL%20645.pdf>
- Polverino, P., Frare, E., Gottardo, R., Van Dael, H & Fontana, A. (2002). "Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: a comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis". *Protein Science*, 11(12), 2932-2946. doi: <https://doi.org/10.1110/ps.0205802>

- Posada, J. (2005). *Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros* (Antioquía, U d Ed.). Colombia.
- Poveda, T. (2016). *Evaluación del grado de digestibilidad gastrointestinal, actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de aislados proteicos de sesamo*. (Tesis de Pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23824/1/AL609.pdf>
- Quinteros, M. (2016). *Estudio de la Digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y Actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de sachu inchi (Plukenetia volubilis L.)*. (Tesis de pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23823/1/AL608.pdf>
- Rivera, M. (2006). *Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de quinua orgánica (Chenopodium quinoa)*. (Tesis de Pregrado), Universidad de Chile, Chile. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2006/rivera_m/html/index-frames.html
Available from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105605>
- Rodríguez, V & Magro, E. (2008). *Bases de la alimentación humana* (Primera ed.). España: Netbiblio.
- Rojano, B., Gaviria, C & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*, 15(1), 212-218.
- Ruiz, J., Betancur, D & Segura, M. (2014). Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering: nutraceutical potential. *Nutrición Hospitalaria*, 29(4), 776-784. doi: <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.29.4.7208>.
- Sánchez, N., Dávila, G & Jiménez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. In Ramírez, M (Ed.), *Alimentos Funcionales de Hoy* (pp. 117-142). Barcelona: OmniaScience.
- Sangronis, E & Machado, C. (2007). "Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*". *Food Science and Technology*, 40(1), 116-120. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.003>
- Sangronis, E., Machado, C & Cava, R. (2004). Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*) germinadas. *Interciencia*, 29(2), 80-85.

- Sathe, S. (2002). Dry bean protein functionality. *Crit Rev Biotechnol*, 22(2), 175-223. doi: <https://doi.org/10.1080/07388550290789487>
- Segal, C & Ortega, G. (2010). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula* (Ciencias, P d Ed. 3rd ed.). México.
- Serpa, A., Hincapié, G & Álvarez, C. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta Crank*) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospectiva*, 12(1), 30-39. doi: <http://dx.doi.org/10.15665/rp.v12i1.148>
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y & Chen, J. (2008). "Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods". *Food Chem*, 107(2), 929-938. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.047>
- Singh, N., Kaur, M & Sandhu, K. (2005). "Physicochemical and functional properties of freeze-dried and oven dried corn gluten meals". *Drying Technology*, 23(4), 975-988. doi: <https://doi.org/10.1081/DRT-200054253>
- Stanisavljević, N., Vukotic, G., Pastor, F., Suznjevic, D., Jovanović, Ž., Strahinic, I., Fira, D & Radovic, S. (2015). Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 1033-1042. doi: <https://doi.org/10.2298/ABS150130066S>
- Taghvaei, M & Jafari, S. (2015). "Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives". *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1272-1282. doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1080-1>
- Tamayo, J., Poveda, T., Paredes, M., Vasquez, G & Calero, W. (2018). "Antimicrobial, antioxidant and anti-Inflammatory activities of proteins of *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) Baby Lima Beans produced in Ecuador". *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/401323>
- Teniente, G., Cariño, R., Bernardino, A & González, L. (2016). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 1-6.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G., Bartels, M., Dearman, R., Esdaile, D., Fu, T., Glatt, C., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S L., Heylings, J., Goodman, R., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G., Landry, T., MacIntosh, S., Rice, E., Privalle, L., Steiner, H., Teshima, R., Van Ree, R., Woolhiser, M & Zawodny, J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol

used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 39(2), 87-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.11.003>

Torres, A. (2001). *Estudio comparativo de harinas de caraotas blancas y quinchochos con y sin cáscara y su incorporación en mezclas para elaborar un producto de consumo masivo*. (Tesis de Pregrado), Universidad Simón Bolívar Caracas, Venezuela.

Torres, A., Frias, J., Granito, M & Vidal, C. (2006). Fermented pigeon pea (*Cajanus cajan*) ingredients in pasta products. *J Agric Food Chem*, 54(18), 6685-6691. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0606095>

Torres, A & Guerra, M. (2003). Sustitución parcial de harina de maíz precocida con harina de quinchoncho (*Cajanus cajan*) para la elaboración de arepas. *Interciencia*, 28(11), 660-664.

Torres, C., Contreras, M., Recio, I., Alaiz, M & Vioque, J. (2015). "Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates". *Food Chem*, 180, 194-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>

Udenigwe, C & Aluko, R. (2012). "Food protein derived bioactive peptides: production, processing and potential health benefits". *Food Science*, 77(1), R11-24. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>

Vallejo, E. (2018). *Obtención de concentrados proteicos de la harina de arveja (Pisum sativum) y determinación de su actividad antioxidante por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA)*. (Pregrado), Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27136/1/AL%20657.pdf>

Vargas, A., Villamil, O., Murillo, E., Murillo, W & Solanilla, J. (2012). Caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol (*Caupí vigna unguiculata* L.) cultivado en Colombia. *Vitae*, 19(1), 320-321.

Vázquez, Y., Guerra, L., Quintana, J., Ramírez, J., Ballesteros, R & Vázquez, J. (2014). Caracterización físicoquímica y contenido de proteínas de extractos fluidos del ostión de mangle (*Crassostrea rizophorae*). *Revista Cubana de Química*, 26(1), 66-74.

Wayne, E. (2017). Fat Analysis. In Nielsen, S (Ed.), *Food Analysis* (Fifth ed., pp. 298-314). Switzerland Springer.

Wu, N., Fu, K., Fu, Y., Zu, Y., Chang, F., Chen, Y., Liu, X., Kong, Y., Liu, W & Gu, C. (2009). "Antioxidant activities of extracts and main components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves". *Molecules*, 14(3).

Zhang, D., Zhang, S., Zu, Y., Fu, Y., Kong, Y., Gao, Y., Zhao, J & Efferth, T. (2010). Negative pressure cavitation extraction and antioxidant activity of genistein and genistin from the roots of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Separation and Purification Technology*, 74(2), 261-270. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.06.015>

ANEXOS

ANEXO A

HARINA DE GANDUL VERDE-CONTENIDO DE HUMEDAD

Tabla 20. Datos obtenidos para el cálculo del contenido de humedad en la harina de gandum verde

Réplica	m _{H2O} [g]	m _s [g]	H _{bs} (%)	Promedio (%)	Desviación Estándar
1	0,1737	2,8384	6,1196		
2	0,1913	2,8108	6,8059	6,1902	0,0583
3	0,1607	2,8467	5,6451		

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

HARINA DE GANDUL MADURO-CONTENIDO DE HUMEDAD

Tabla 21. Datos obtenidos para el cálculo del contenido de humedad en la harina de gandum maduro

Réplica	m _{H2O} [g]	m _s [g]	H _{bs} (%)	Promedio (%)	Desviación Estándar
1	0,1673	2,8431	5,8844		
2	0,1681	2,8531	5,8918	5,8773	0,0189
3	0,1660	2,8348	5,8558		

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

HARINA DE GANDUL VERDE-CONTENIDO DE GRASA

Tabla 22. Datos obtenidos para el cálculo del contenido de grasa en la harina de gandum verde

Réplica	Peso de la muestra [g]	Balón tarado [g]	Balón más grasa [g]	Grasa (%)	Desviación Estándar
1	3,1211				
2	3,0964	96,7092	96,9149	2,2112	0,0183
3	3,0852				
Total	9,3027				

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

HARINA DE GANDUL MADURO-CONTENIDO DE GRASA

Tabla 23. *Datos obtenidos para el cálculo del contenido de grasa en la harina de gandul maduro*

Réplica	Peso de la muestra [g]	Balón tarado [g]	Balón más grasa [g]	Grasa (%)	Desviación Estándar
1	3,0295				
2	3,0088	96,7086	96,8139	1,4079	0,0146
3	1,4405				
Total	7,4788				

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

ANEXO B

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO PROTEICO DE GANDUL MADURO PREPARADO A pH 4,0

Tabla 24. Rendimiento proteico del gandul maduro con corrección del contenido de humedad y grasa

pH de precipitación isoeléctrica	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio (%)
3,0	11,3672	11,2879	11,2538	11,3030
4,0	11,3352	11,3263	11,3768	11,3461
5,0	10,4092	10,3277	10,3202	10,3524
6,0	8,5472	8,5672	8,5681	8,5608

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 25. Resumen del análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación

pH de precipitación	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
3,0	3	11,303	0,0581816	0,514745%	11,2539
4,0	3	11,3461	0,0269535	0,237557%	11,3263
5,0	3	10,3524	0,0493443	0,476648%	10,3202
6,0	3	8,56083	0,0118201	0,138072%	8,54719
Total	12	10,3906	1,17931	11,3498%	8,54719

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 26. Resumen del análisis estadístico del rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación

pH de precipitación	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
3,0	11,3673	0,11339	0,769764	
4,0	11,3768	0,05048	1,07755	
5,0	10,4092	0,089	1,1924	
6,0	8,56807	0,020881	-1,21776	
Total	11,3768	2,82963	-1,26618	-0,648274

Fuente: Statgraphics, 2018

Esta tabla muestra diferentes estadísticos del porcentaje de rendimiento para cada uno de los 4 niveles de pH de precipitación.

Tabla 27. ANOVA para el rendimiento proteico de gandul maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	15,2851	3	5,09505	3048,11	0,0000
Intra grupos	0,0133723	8	0,00167154		
Total (Corr.)	15,2985	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

La tabla ANOVA descompone la varianza de porcentaje de rendimiento en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3048,11, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de rendimiento entre un nivel de pH de precipitación y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 28. Pruebas de múltiple rangos para el rendimiento proteico de gandum maduro obtenido a diferentes valores de pH de precipitación

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	8,56083	X
5	3	10,3524	X
3	3	11,303	X
4	3	11,3461	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 4		-0,04311	0,0769793
3 - 5	*	0,95065	0,0769793
3 - 6	*	2,74218	0,0769793
4 - 5	*	0,99376	0,0769793
4 - 6	*	2,78529	0,0769793
5 - 6	*	1,79153	0,0769793

Fuente: Statgraphics, 2018

Método: 95,0 porcentaje LSD

* Indica una diferencia significativa.

La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

ANEXO C

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO PROTEICO DE GANDUL MADURO PREPARADO A pH 4,0

Método: 1

Tabla 29. Datos para la construcción de la curva estándar de pepsina

Concentración [mg/mL]	Absorbancia (540 nm)
0,00	0,000
3,59	0,110
7,72	0,243
11,84	0,372
15,63	0,494

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

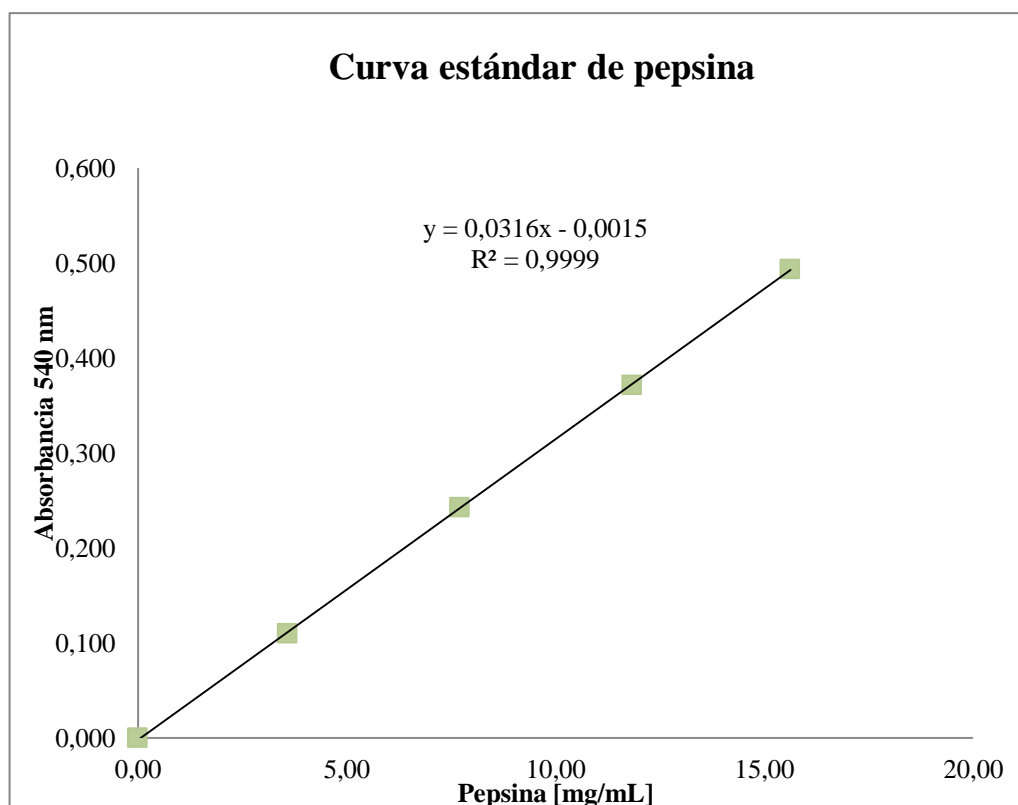


Figura 14. Curva estándar de pepsina
Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 30. Valores de absorbancia a 540 nm del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0

pH de precipitación isoelectrica	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
3,0	0,297	0,310	0,390	0,310
4,0	0,303	0,282	0,306	0,290
5,0	0,317	0,317	0,318	0,318
6,0	0,322	0,318	0,315	0,318

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 31. Contenido proteico del concentrado de gandul maduro preparado a pH 4,0

pH de precipitación isoelectrica	Contenido proteico (%)	Contenido proteico (%)	Contenido proteico (%)	Contenido proteico (%)	Promedio (%)
3,0	113,35	117,09	148,66	117,09	124,05
4,0	114,26	116,38	107,65	110,69	112,24
5,0	120,74	120,74	119,89	119,89	120,41
6,0	121,41	121,14	118,78	121,14	120,62

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Método: 2

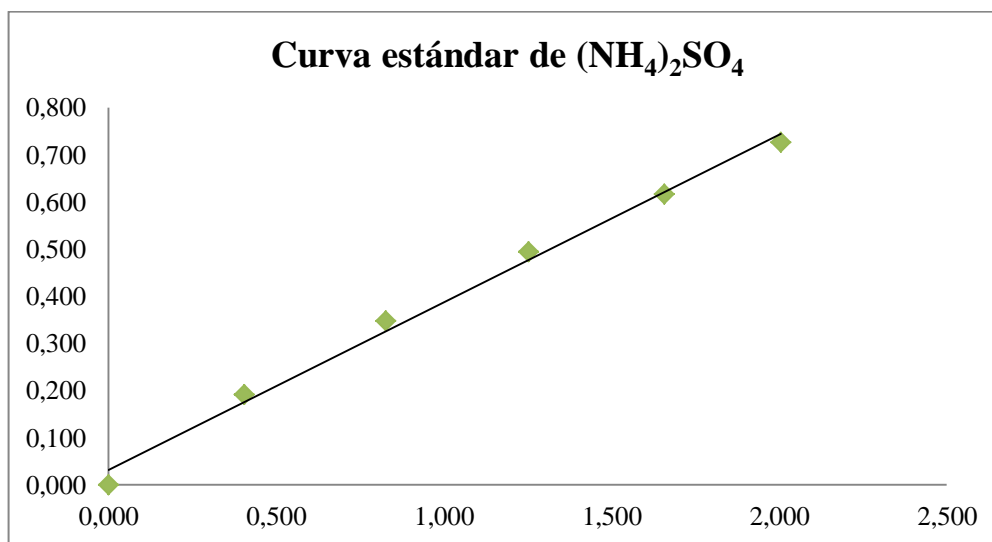


Figura 15. Curva estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 32. Datos de los estándares de N

Estándares	Peso solución stock [g]	Peso total [g]	Factor de dilución	N [mg/100]	Abs (645 nm)
STD-0	0,0000	0,5000	-	0,000	0,000
STD-1	0,1001	0,5172	4,9193	0,405	0,191
STD-2	0,2045	0,5179	4,9193	0,827	0,348
STD-4	0,3064	0,5125	4,9193	1,252	0,494
STD-3	0,4124	0,5211	4,9193	1,658	0,616
STD-5	0,5035	0,5261	4,9193	2,004	0,726

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 33. Datos de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

Muestra	Peso [g]	Volumen de aforo (mL)	Muestra [mg]	Peso de la alícuota [g]	Peso total [g]	Dilución
GM pH 3,0	0,0500	100	50,0	0,3702	1,8578	5,0184
GM pH 4,0	0,0503	100	50,3	0,3734	1,8705	5,0094
GM pH 5,0	0,0503	100	50,3	0,3709	1,8609	5,0173
GM pH 6,0	0,0497	100	49,7	0,3681	1,8518	5,0307

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 34. Valores de absorbancia (645 nm) de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

Muestra	ABS-0	ABS-1	ABS-2	ABS-3	ABS-4
GM pH 3,0	-	0,433	0,457	0,436	0,446
GM pH 4,0	-	0,447	0,448	0,458	0,39
GM pH 5,0	-	0,461	0,454	0,472	0,397
GM pH 6,0	-	0,467	0,471	0,461	0,466

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 35. Concentración de N de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

[N]-1 leída [mg/100 mL]	[N]-2 leída [mg/100 mL]	[N]-3 leída [mg/100 mL]	[N]-4 leída [mg/100 mL]	[N]-1 total [mg/100 mL]	[N]-2 total [mg/100 mL]	[N]-3 total [mg/100 mL]	[N]-4 total [mg/100 mL]
1,13	1,20	1,14	1,17	5,66	6,00	5,71	5,85
1,17	1,17	1,20	1,01	5,85	5,87	6,01	5,05
1,21	1,19	1,24	1,03	6,06	5,96	6,21	5,16
1,22	1,24	1,21	1,22	6,16	6,22	6,07	6,15

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 36. Contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

Proteína-1	Proteína-2	Proteína-3	Proteína-4	Promedio	Des. Est	CV
70,81	75,04	71,34	73,10	72,57	1,91	2,64
72,71	72,88	74,63	62,74	73,41	1,06	1,45
75,27	74,05	77,20	64,07	75,51	1,59	2,10
77,45	78,16	76,39	77,28	77,32	0,73	0,95

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Coefficiente de variación (CV). Desviación estándar (Des. Est).

Tabla 37. Resumen estadístico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

pH de precipitación	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
3	4	72,5725	1,91418	2,63761%	70,81
4	3	73,4067	1,06284	1,44788%	72,71
5	3	75,5067	1,58828	2,1035%	74,05
6	4	77,32	0,727782	0,94126%	76,39
Total	14	74,7364	2,35992	3,15766%	70,81

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 38. ANOVA para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52,5143	3	17,5048	8,80	0,0037
Intra grupos	19,8858	10	1,98858		
Total (Corr.)	72,4001	13			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 39. Medias para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro obtenidos a diferentes valores de pH de precipitación con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
3	4	72,5725	0,705085	71,4616	73,6834
4	3	73,4067	0,814162	72,1239	74,6894
5	3	75,5067	0,814162	74,2239	76,7894
6	4	77,32	0,705085	76,2091	78,4309
Total	14	74,7364			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 40. Verificación de Varianza para el contenido proteico de los concentrados de gandul maduro por valor de pH de precipitación

Levene's	Prueba	Valor-P
	1,76344	0,217451

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
3 / 4	1,91418	1,06284	3,24361	0,4890
3 / 5	1,91418	1,58828	1,45249	0,8651
3 / 6	1,91418	0,727782	6,91773	0,1465
4 / 5	1,06284	1,58828	0,447799	0,6186
4 / 6	1,06284	0,727782	2,13272	0,5307
5 / 6	1,58828	0,727782	4,76268	0,2344

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO D

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL CONCENTRADO PROTEICO DE GANDUL MADURO PREPARADO A pH 4,0

Tabla 41. *Valores de absorbancia (660 nm) del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0*

C1: 100 [µg/mL]	C2: 200 [µg/mL]	C3: 500 [µg/mL]	C4: 1000 [µg/mL]	Blanco
1,799	1,694	1,349	1,069	
1,800	1,696	1,354	1,072	1,987
1,802	1,699	1,355	1,074	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 42. *Porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0*

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	9,5%	14,7%	32,1%	46,2%
R2	9,4%	14,6%	31,9%	46,0%
R3	9,3%	14,5%	31,8%	45,9%
Promedio	9,39%	14,63%	31,92%	46,07%
Desv. Stand	0,001	0,001	0,002	0,001
Coef. Var.	0,82	0,87	0,51	0,27

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 43. *Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0*

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
100	3	9,4	0,1	1,06383%	9,3
200	3	14,6	0,1	0,684932%	14,5
500	3	31,9333	0,152753	0,478348%	31,8
1000	3	46,0333	0,152753	0,33183%	45,9
Total	12	25,4917	15,1454	59,4131%	9,3

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 44. ANOVA para la actividad antiinflamatoria del concentrado de gándul maduro obtenido a pH 4,0

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2523,08	3	841,025	50461,52	0,0000
Intra grupos	0,133333	8	0,0166667		
Total (Corr.)	2523,21	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

La tabla ANOVA descompone la varianza del porcentaje de actividad antiinflamatoria en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 50461,52 es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es menor que 0,05, existe diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de actividad antiinflamatoria entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

Tabla 45. Medias para la actividad antiinflamatoria del concentrado de gándul maduro obtenido a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

Concentración [µg/mL]	Caso	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
100	3	9,4	0,0745356	9,27846	9,52154
200	3	14,6	0,0745356	14,4785	14,7215
500	3	31,9333	0,0745356	31,8118	32,0549
1000	3	46,0333	0,0745356	45,9118	46,1549
Total	12	25,4917			

Fuente: Statgraphics, 2018

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

Tabla 46. Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	9,4	X
200	3	14,6	X
500	3	31,9333	X
1000	3	46,0333	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 200	*	-5,2	0,243075
100 - 500	*	-22,5333	0,243075
100 - 1000	*	-36,6333	0,243075
200 - 500	*	-17,3333	0,243075
200 - 1000	*	-31,4333	0,243075
500 - 1000	*	-14,1	0,243075

Fuente: Statgraphics, 2018

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. En la parte superior, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Tabla 47. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración

Levene's	Prueba		Valor-P	
	0,484848		0,702086	
Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
100 / 200	0,1	0,1	1,0	1,0000
100 / 500	0,1	0,152753	0,428571	0,6000
100 / 1000	0,1	0,152753	0,428571	0,6000
200 / 500	0,1	0,152753	0,428571	0,6000
200 / 1000	0,1	0,152753	0,428571	0,6000
500 / 1000	0,152753	0,152753	1,0	1,0000

Fuente: Statgraphics, 2018

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de la actividad antiinflamatoria dentro de cada uno de los 4 niveles de concentración es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0 % de confianza. La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 0, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5 % de nivel de significación.

ANEXO E

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL HIDROLIZADO DE GANDUL MADURO OBTENIDO A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO PREPARADO A pH 4,0

Tabla 48. *Valores de absorbancia (660 nm) del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0*

C1: 100 [µg/mL]	C2: 200 [µg/mL]	C3: 500 [µg/mL]	C4: 1000 [µg/mL]	Blanco
1,504	1,290	0,940	0,635	
1,507	1,291	0,941	0,635	1,871
1,508	1,295	0,946	0,639	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 49. *Porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0*

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	19,6%	31,1%	49,8%	66,1%
R2	19,5%	31,0%	49,7%	66,1%
R3	19,4%	30,8%	49,4%	65,8%
Promedio	19,49%	30,95%	49,63%	65,99%
Desv. Stand	0,11%	0,14%	0,17%	0,12%
Coef. Var.	0,57	0,46	0,35	0,19

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 50. *Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0*

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo
100	3	19,5	0,1	0,512821%	19,4
200	3	30,9667	0,152753	0,49328%	30,8
500	3	49,6333	0,208167	0,419409%	49,4
1000	3	66,0	0,173205	0,262432%	65,8
Total	12	41,525	18,5479	44,6668%	19,4

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 51. ANOVA para la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3784,05	3	1261,35	47300,61	0,0000
Intra grupos	0,213333	8	0,0266667		
Total (Corr.)	3784,26	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 52. Medias para la actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
100	3	19,5	0,0942809	19,3463	19,6537
200	3	30,9667	0,0942809	30,8129	31,1204
500	3	49,6333	0,0942809	49,4796	49,7871
1000	3	66,0	0,0942809	65,8463	66,1537
Total	12	41,525			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 53. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 por concentración

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	19,5	X
200	3	30,9667	X
500	3	49,6333	X
1000	3	66,0	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 200	*	-11,4667	0,307468
100 - 500	*	-30,1333	0,307468
100 - 1000	*	-46,5	0,307468
200 - 500	*	-18,6667	0,307468
200 - 1000	*	-35,0333	0,307468
500 - 1000	*	-16,3667	0,307468

Fuente: Statgraphics, 2018

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 54. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gándul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0 por concentración

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,933333	0,468131

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
100 / 200	0,1	0,152753	0,428571	0,6000
100 / 500	0,1	0,208167	0,230769	0,3750
100 / 1000	0,1	0,173205	0,333333	0,5000
200 / 500	0,152753	0,208167	0,538462	0,7000
200 / 1000	0,152753	0,173205	0,777778	0,8750
500 / 1000	0,208167	0,173205	1,44444	0,8182

Fuente: Statgraphics, 2018

Medias y 95,0% de Fisher LSD

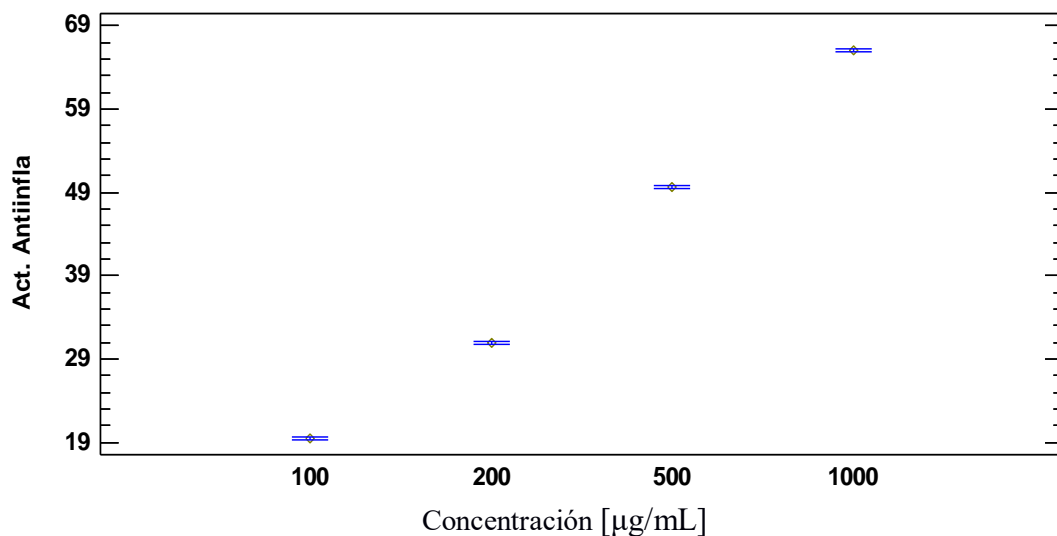


Figura 16. Medias para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del hidrolizado de gándul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO F

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL DICLOFENACO MK[®] EN AMPOLLA DE 75mg/3mL

Tabla 55. Valores de absorbancia (660 nm) del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL

C1: 100 [µg/ml]	C2: 200 [µg/ml]	C3: 500 [µg/ml]	C4: 1000 [µg/ml]	Blanco
1,293	0,971	0,738	0,356	
1,294	0,971	0,739	0,358	1,863
1,297	0,975	0,741	0,36	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 56. Porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	30,6%	47,9%	60,4%	80,9%
R2	30,5%	47,9%	60,3%	80,8%
R3	30,4%	47,7%	60,2%	80,7%
Promedio	30,51%	47,81%	60,31%	80,78%
Desv. Stand	0,001	0,001	0,001	0,001
Coef. Var.	0,37	0,26	0,14	0,13

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 57. Resumen estadístico de la actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
100	3	30,5333	0,057735	0,189089%	30,5
200	3	47,8333	0,11547	0,241401%	47,7
500	3	60,3667	0,057735	0,0956406%	60,3
1000	3	80,8667	0,057735	0,0713953%	80,8
Total	12	54,9	19,1727	34,923%	30,5

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 58. ANOVA para actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4043,47	3	1347,82	231055,62	0,0000
Intra grupos	0,0466667	8	0,00583333		
Total (Corr.)	4043,52	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 59. Medias para la actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
100	3	30,5333	0,0440959	30,4614	30,6052
200	3	47,8333	0,0440959	47,7614	47,9052
500	3	60,3667	0,0440959	60,2948	60,4386
1000	3	80,8667	0,0440959	80,7948	80,9386
Total	12	54,9			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 60. Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco MK[®] en ampolla de 75mg/3mL

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	30,5333	X
200	3	47,8333	X
500	3	60,3667	X
1000	3	80,8667	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 200	*	-17,3	0,143805
100 - 500	*	-29,8333	0,143805
100 - 1000	*	-50,3333	0,143805
200 - 500	*	-12,5333	0,143805
200 - 1000	*	-33,0333	0,143805
500 - 1000	*	-20,5	0,143805

Fuente: Statgraphics, 2018

Método: 95,0 porcentaje LSD

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 61. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del DICLOFENACO MK[®] en ampolla de 75mg/3mL por concentración

Levene's	Prueba	Valor-P		
	2,28571	0,155648		
Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
100 / 200	0,057735	0,11547	0,25	0,4000
100 / 500	0,057735	0,057735	1,0	1,0000
100 / 1000	0,057735	0,057735	1,0	1,0000
200 / 500	0,11547	0,057735	4,0	0,4000
200 / 1000	0,11547	0,057735	4,0	0,4000
500 / 1000	0,057735	0,057735	1,0	1,0000

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO G

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL CONCENTRADO PROTEICO DE GANDUL MADURO PREPARADO A pH 4,0

Tabla 62. *Valores de absorbancia (532 nm) del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0*

C1: 100 [µg/mL]	C2: 200 [µg/mL]	C3: 500 [µg/mL]	C4: 1000 [µg/mL]	Blanco
0,612	0,555	0,470	0,413	
0,616	0,559	0,477	0,419	0,710
0,619	0,562	0,479	0,422	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 63. *Porcentaje de actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0*

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	13,8%	21,8%	33,8%	41,8%
R2	13,2%	21,3%	32,8%	41,0%
R3	12,8%	20,8%	32,5%	40,6%
Promedio	13,29%	21,31%	33,05%	41,13%
Desv. Stand	0,49%	0,49%	0,67%	0,65%
Coef. Var.	3,72	2,32	2,01	1,57

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 64. *Resumen estadístico de la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0*

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
100	3	13,2667	0,503322	3,79389%	12,8	13,8
200	3	21,3	0,5	2,34742%	20,8	21,8
500	3	33,0333	0,680686	2,0606%	32,5	33,8
1000	3	41,1333	0,61101	1,48544%	40,6	41,8
Total	12	27,1833	11,1763	41,1147%	12,8	41,8

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 65. ANOVA para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro precipitado a pH 4,0

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1371,34	3	457,112	1364,51	0,0000
Intra grupos	2,68	8	0,335		
Total (Corr.)	1374,02	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 66. Medias para la actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
100	3	13,2667	0,334166	12,7218	13,8116
200	3	21,3	0,334166	20,7551	21,8449
500	3	33,0333	0,334166	32,4884	33,5782
1000	3	41,1333	0,334166	40,5884	41,6782
Total	12	27,1833			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 67. Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	13,2667	X
200	3	21,3	X
500	3	33,0333	X
1000	3	41,1333	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
100 - 200	*	-8,03333	1,08978
100 - 500	*	-19,7667	1,08978
100 - 1000	*	-27,8667	1,08978
200 - 500	*	-11,7333	1,08978
200 - 1000	*	-19,8333	1,08978
500 - 1000	*	-8,1	1,08978

Fuente: Statgraphics, 2018

Método: 95,0 porcentaje LSD

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 68. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro obtenido a pH 4,0 por concentración

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,274018	0,842608

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
100 / 200	0,503322	0,5	1,01333	0,9934
100 / 500	0,503322	0,680686	0,546763	0,7070
100 / 1000	0,503322	0,61101	0,678571	0,8085
200 / 500	0,5	0,680686	0,539568	0,7009
200 / 1000	0,5	0,61101	0,669643	0,8021
500 / 1000	0,680686	0,61101	1,24107	0,8924

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO H

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL HIDROLIZADO DE GANDUL MADURO OBTENIDO A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO PREPARADO A pH 4,0

Tabla 69. Valores de absorbancia (660 nm) del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado proteico precipitado a pH 4,0

C1: 100 [µg/mL]	C2: 200 [µg/mL]	C3: 500 [µg/mL]	C4: 1000 [µg/mL]	Blanco
1,384	1,206	1,021	0,729	
1,387	1,210	1,025	0,731	1,722
1,392	1,218	1,029	0,737	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 70. Porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	19,6%	30,0%	40,7%	57,7%
R2	19,5%	29,7%	40,5%	57,5%
R3	19,2%	29,3%	40,2%	57,2%
Promedio	19,42%	29,66%	40,48%	57,47%
Desv. Stand	0,002346952	0,003548258	0,00232288	0,002417731
Coef. Var.	1,21	1,20	0,57	0,42

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 71. Resumen estadístico de la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
100	3	19,4333	0,208167	1,07118%	19,2	19,6
200	3	29,6667	0,351188	1,18378%	29,3	30,0
500	3	40,4667	0,251661	0,621897%	40,2	40,7
1000	3	57,4667	0,251661	0,437925%	57,2	57,7
Total	12	36,7583	14,7083	40,0136%	19,2	57,7

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 72. ANOVA para la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2379,1	3	793,034	10814,10	0,0000
Intra grupos	0,586667	8	0,0733333		
Total (Corr.)	2379,69	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 73. Medias para la actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

Concentración [ug/mL]	Casos	Media	Error Est.		
			(s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
100	3	19,4333	0,156347	19,1784	19,6883
200	3	29,6667	0,156347	29,4117	29,9216
500	3	40,4667	0,156347	40,2117	40,7216
1000	3	57,4667	0,156347	57,2117	57,7216
Total	12	36,7583			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 74. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gandul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 por concentración

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	19,4333	X
200	3	29,6667	X
500	3	40,4667	X
1000	3	57,4667	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 200	*	-10,2333	0,509878
100 - 500	*	-21,0333	0,509878
100 - 1000	*	-38,0333	0,509878
200 - 500	*	-10,8	0,509878
200 - 1000	*	-27,8	0,509878
500 - 1000	*	-17,0	0,509878

Fuente: Statgraphics, 2018

Método: 95,0 porcentaje LSD

* Indica una diferencia significativa.

Tabla 75. Verificación de varianza para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gándul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 por concentración

Levene's	Prueba		Valor-P	
	0,244898		0,862725	
Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
100 / 200	0,208167	0,351188	0,351351	0,5200
100 / 500	0,208167	0,251661	Comparación	Sigma1
100 / 1000	0,208167	0,251661	0,684211	0,8125
200 / 500	0,351188	0,251661	1,94737	0,6786
200 / 1000	0,351188	0,251661	1,94737	0,6786
500 / 1000	0,251661	0,251661	1,0	1,0000

Fuente: Statgraphics, 2018

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de actividad antioxidante dentro de cada uno de los 4 niveles de concentración es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0 % de confianza. La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay 0, indican diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5 % de nivel de significación.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

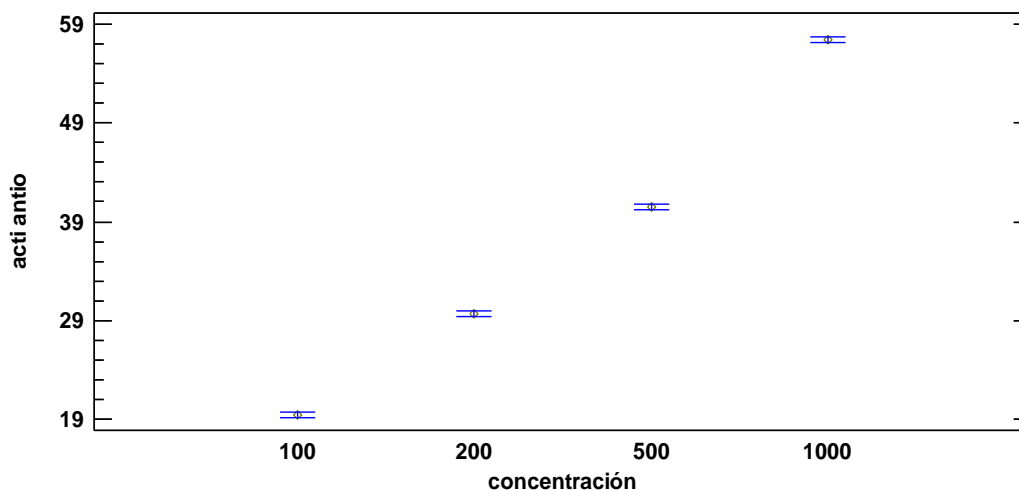


Figura 17. Medias para el porcentaje de actividad antioxidante del hidrolizado de gándul maduro obtenido a partir del concentrado precipitado a pH 4,0 con intervalos de confianza del 95,0 %

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO I

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL BHT

Tabla 76. Valores de absorbancia (532 nm) del BHT

C1: 100 [µg/mL]	C2: 200 [µg/mL]	C3: 500 [µg/mL]	C4: 1000 [µg/mL]	Blanco
2,669	2,613	2,525	2,460	BHT
2,672	2,615	2,529	2,462	2,865
2,674	2,617	2,531	2,467	

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 77. Porcentaje de actividad antioxidante del BHT

	100 [µg/mL]	200 [µg/mL]	500 [µg/mL]	1000 [µg/mL]
R1	34,2%	44,0%	59,3%	70,7%
R2	33,7%	43,6%	58,6%	70,3%
R3	33,3%	43,3%	58,3%	69,5%
Promedio	33,74%	43,63%	58,76%	70,16%
Desv. Stand	0,44%	0,35%	0,53%	0,63%
Coef. Var.	1,30	0,80	0,91	0,90

Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI-UTA, 2018

Tabla 78. Resumen estadístico de la actividad antioxidante del BHT

Concentración [µg/mL]	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
100	3	33,7333	0,450925	1,33673%	33,3	34,2
200	3	43,6333	0,351188	0,804863%	43,3	44,0
500	3	58,7333	0,51316	0,873712%	58,3	59,3
1000	3	70,1667	0,61101	0,870798%	69,5	70,7
Total	12	51,5667	14,5752	28,2647%	33,3	70,7

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 79. ANOVA para la actividad antioxidante del BHT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2334,86	3	778,287	3231,64	0,0000
Intra grupos	1,92667	8	0,240833		
Total (Corr.)	2336,79	11			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 80. Medias para la actividad antioxidante del BHT

Concentración [µg/mL]	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
			(s agrupada)		
100	3	33,7333	0,283333	33,2713	34,1953
200	3	43,6333	0,283333	43,1713	44,0953
500	3	58,7333	0,283333	58,2713	59,1953
1000	3	70,1667	0,283333	69,7047	70,6287
Total	12	51,5667			

Fuente: Statgraphics, 2018

Tabla 81. Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante del BHT por concentración

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
100	3	33,7333	X
200	3	43,6333	X
500	3	58,7333	X
1000	3	70,1667	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 200	*	-9,9	0,924004
100 - 500	*	-25,0	0,924004
100 - 1000	*	-36,4333	0,924004
200 - 500	*	-15,1	0,924004
200 - 1000	*	-26,5333	0,924004
500 - 1000	*	-11,4333	0,924004

Fuente: Statgraphics, 2018

Método: 95,0 porcentaje LSD

* Indica una diferencia significativa.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

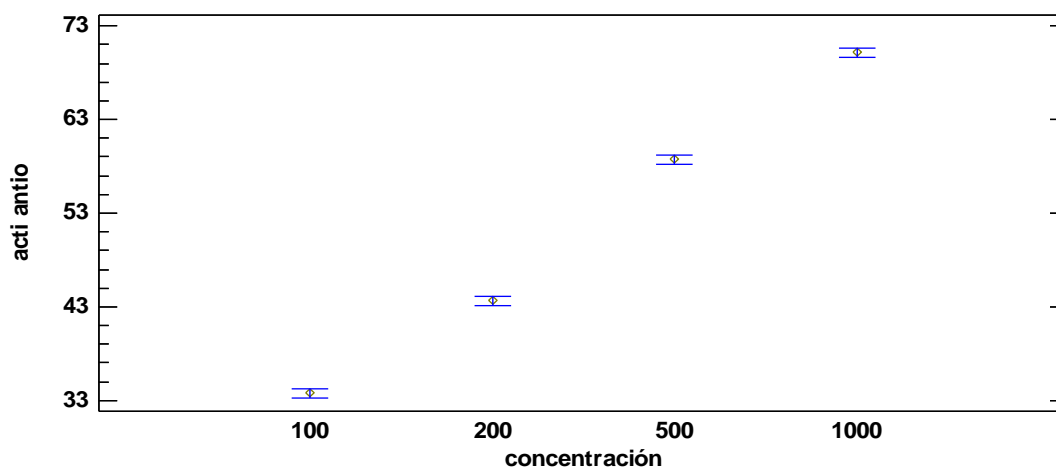


Figura 18. Medias para el porcentaje de actividad antioxidante del BHT con intervalos de confianza del 95,0 %

Fuente: Statgraphics, 2018

ANEXO J

FOTOGRAFÍAS DEL DESARROLLO DE LA PARTE EXPERIMENTAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MATERIA PRIMA

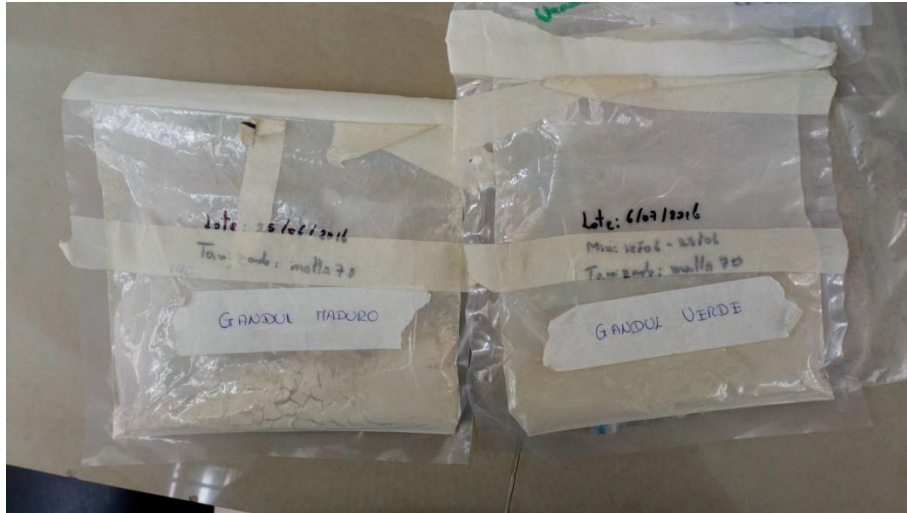


Figura 19. Harina de gandul verde y harina de gandul maduro procedentes de la ESPOL

PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA



Figura 20. Solubilización de la proteína del gandul verde



Figura 21. Solubilización de la proteína del gandul maduro



Figura 22. Precipitación isoelectrica de la proteína del gandul verde



Figura 23. Precipitación isoelectrica de la proteína del gandul maduro



Figura 24. Proteína del gandul verde precipitada a pH 3,0



Figura 25. Proteína del gandul maduro precipitada a pH 4,0

LIOFILIZACIÓN



Figura 26. Liofilización de la proteína precipitada del gandul verde (pH 3,0) y del gandul maduro (pH 4,0)

CUANTIFICACIÓN PROTEICA

MÉTODO 1: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO BIURET

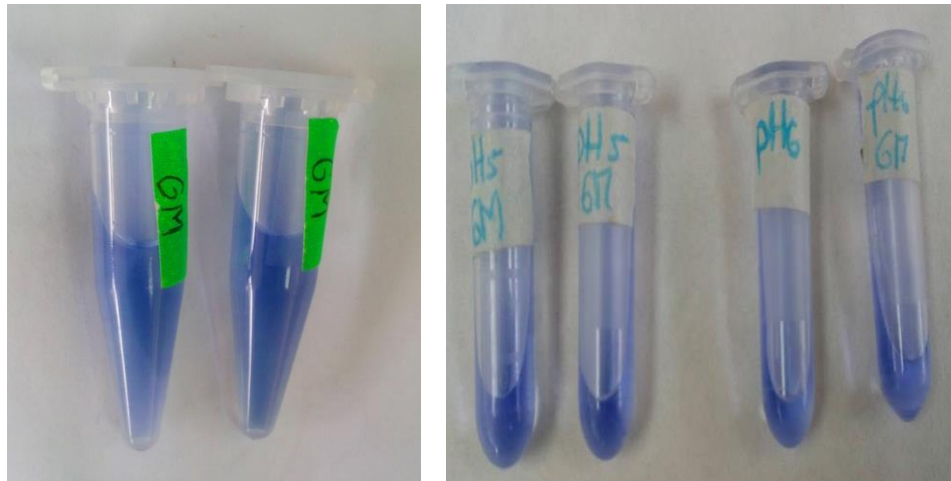


Figura 27. Cuantificación proteica de la proteína del gandul maduro

CUANTIFICACIÓN PROTEICA
MÉTODO 2. DIGESTIÓN POR MICROKJENDAL



Figura 28. Concentrados proteicos de gandul maduro obtenidos a los diferentes valores de pH de precipitación



Figura 29. Digestión por MicroKjeldahl de los concentrados proteicos de gandul maduro



Figura 30. Digestión en MicroKjeldahl de los concentrados proteicos de gandul maduro preparados a diferentes valores de pH

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

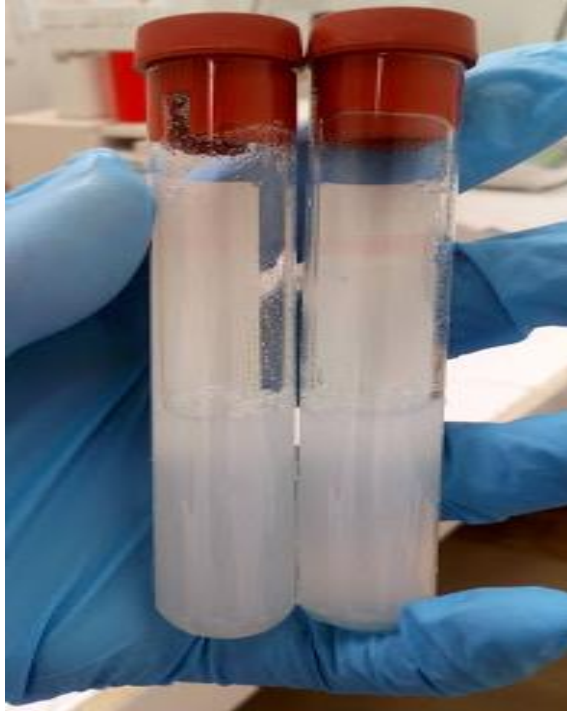


Figura 31. Actividad Antiinflamatoria del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0 (desnaturalización de la proteína)

A



B



Figura 32. Actividad Antioxidante del concentrado proteico de gandul maduro preparado a pH 4,0. A Preparación de la muestra B Incubación de la muestra