UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

"DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS ANTINUTRICIONALES Y ALERGENOS EN SEMILLA Y TORTA DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis L.*)"

Presentado por:

RINA DIONICIA LÁZARO AGUILAR

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Lima – Perú

2015

Dedicado:

A Dios por su infinito amor…

A mi Padre, por su sabiduría y fortaleza brindada en el transcurso de mi vida…
A mi madre y mis hermanas, por ser mujeres de buen corazón.

Y a mis amigos
Por los inolvidables momentos compartidos…

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto “Caracterización físico-química de los componentes nutricionales y antinutricionales en el aceite y en los remanentes del proceso tradicional al sacha inchi” bajo responsabilidad de la D.P.G. y financiado por PERU BIODIVERSO y otros, con el fin de brindar información adecuada acerca de los productos o sub-productos que se deriven de esta cadena de valor a los comerciantes y consumidores.

Asimismo, agradezco a la Dr. Patricia Glorio Paulet, por la oportunidad de recibir apoyo del proyecto y por guiarme en la búsqueda del conocimiento.

A la Dr. Ana Akemi Kitazono Sugahara, por la paciencia y el apoyo en equipos y conocimientos adquiridos.

A la profesora Ada del Pilar Aliaga Rota por colaborar en parte de la metodología de inhibidores de tripsina de la presente tesis.

Al instituto “Food Allergy Research & Education” por la donación de los sueros utilizados en la presente tesis.

A las técnicas del laboratorio de Microbiología de Alimentos, Fisicoquímica de Alimentos y Biotecnología, quienes con paciencia me acompañaron en el desarrollo de métodos.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 3
2.1. CARACTERISTICAS GENERALES 3
2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA 3
2.1.2. SEMILLA DE SACHA INCHI 4
2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA 5
2.2. ANTINUTRIENTES 6
2.2.1. INHIBIDORES DE TRIPSINA 6
2.2.2. LECTINAS 7
2.3. ALERGIAS 12
2.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS 13
2.4. TOXINAS 14
2.4.1. ALCALOIDES 15
2.4.2. GLUCÓSIDOS 15
2.4.3. FITOTOXINAS 16
2.4.4. OXALATO 19
2.4.5. OTROS 19
2.5. PROCEDIMIENTOS INSTRUMENTALES 20
2.5.1. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS 20
2.5.2. WESTERN BLOTTING 23
2.5.3. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE 25
III. MATERIALES Y MÉTODOS 26
3.1. MATERIA PRIMA 26
3.2. REACTIVOS 26
3.3. MATERIALES 28
3.4. EQUIPOS 28
3.5. ANÁLISIS FISICO QUIMICO 29
3.5.1. HUMEDAD. 29
3.5.2. CENIZAS. 29
3.5.4. PROTEÍNA SOLUBLE 30
3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE TRIPSINA 30
3.7. DETERMINACION DE ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE 30

3.8. WESTERN BLOTTING 30
3.9. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 31
3.10. SENSIBILIZACION DE PACIENTE A SACHA INCHI 33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 34
4.1. COMPOSICION DE GRASA, HUMEDAD Y CENIZAS 34
4.2. ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA 35
4.3. ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE 37
4.3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN EXTRACTOS PARA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LECTINAS 38
4.4. FRACCIONES ELECTROFORÉTICAS DE SACHA INCHI 40
4.4.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY EN EXTRACTOS DE ELECTROFORESIS 42
4.5. PRESENCIA DE CADENA A DE RICINA EN SACHA INCHI 44
4.6. REACTIVIDAD CRUZADA DE FRACCIONES PROTEICAS EN SACHA INCHI CON IgE DE PACIENTES ALERGICOS A SOYA 49
4.7. REACTIVIDAD CRUZADA DE FRACCIONES PROTEICAS EN SACHA INCHI CON IgE DE PACIENTES ALERGICOS A MANI 50
4.8. CASO DE SENSIBILIZACION A TORTA Y SEMILLA DE SACHA INCHI .. 51
V. CONCLUSIONES 52
VI. RECOMENDACIONES 53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
VII. ANEXOS 63

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SACHA INCHI, MANÍ, RICINA Y LUPINO 6
TABLA 2: CONTENIDO DE HUMEDAD, GRASA Y CENIZAS EN SACHA INCHI 34
TABLA 3: ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA EN MUESTRAS SIN DESGRASAR Y SIN TRATAMIENTOS TÉRMICOS DE SACHA INCHI 35
TABLA 4: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE TRIPSINA EN MUESTRAS DESGRASADAS Y CON TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN SEMILLA Y TORTA DE SACHA INCHI 36
TABLA 5: PROTEÍNA SOLUBLE EN LA DILUCIÓN HEMOAGLUTINANTE DE SACHA INCHI 38
TABLA 6: ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE 39
TABLA 7: CANTIDAD DE PROTEÍNA EN EXTRACTOS PARA ELECTROFORESIS 43

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: SEMILLAS DE SEIS AGRUPACIONES DEL GENERO *PLUKENETIA* ESTUDIADOS EN LA AMAZONIA PERUANA ---------- 4
FIGURA 2: SACHA INCHI, SEMILLA Y NÚCLEO---------- 5
FIGURA 3: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES EN LECTINAS VEGETALES. ---------- 10
FIGURA 4: ESTRUCTURA BÁSICA DE UNA MOLÉCULA DE INMUNOGLOBULINA. ---------- 13
FIGURA 5: SEMILLAS DE DISTINTAS VARIEDADES DE *RICINUS COMMUNIS* L.---------- 17
FIGURA 6: REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN DE LA ACRILAMIDA.---------- 21
FIGURA 7: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL SEGUIDO PARA EVALUAR LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA, LECTINAS, CADENA A DE RICINA Y ALÉRGENOS EN TORTA Y SEMILLA DE SACHA INCHI.---------- 32
FIGURA 8: FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE (1) SACHA INCHI, (2) SEMILLA DE SACHA INCHI TOSTADA A 150 POR 30 SEGUNDOS, (3) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (4) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS, (5) TORTA DE SACHA INCHI, (6) MARCADOR DE PESO MOLECULAR, (7) MANÍ. (8) TARWI Y (9) RICIN. ---------- 41
FIGURA 9: FRACCIONAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS. (M) MARCADOR DE PESOS MOLECULARES. (1) SEMILLA DE SACHA INCHI. (2) TORTA DE SAHA INCHI ---------- 42
FIGURA 10: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO ANTICUERPO CADENA A DE RICINA CON 4 MINUTOS DE EXPOSICIÓN. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING. (1) SACHA INCHI, (2) TORTA DE SACHA INCHI, (3) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (4) TARWI, (5) MANÍ, (6) MARCADOR DE PESOS MOLECULARES Y (7) SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS---------- 44

FIGURA 11: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO ANTICUERPO CADENA A DE RICINA CON 4 MINUTOS DE EXPOSICIÓN. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING. (1) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS, (2) SACHA INCHI, (3) TORTA DE SACHA INCHI, (4) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (5) TARWI, (6) MANÍ, (7) RICINA, (8) MARCADOR DE PESO MOLECULAR Y (9) SEMILLA TOSTADA DE SACHA INCHI. INCLUYENDO CONTROL POSITIVO DE RICINA. ---------- 45

FIGURA 12: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO ANTICUERPO CADENA A DE RICINA CON 15 MINUTOS DE EXPOSICIÓN. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING. (1) SACHA INCHI, (2) TORTA DE SACHA INCHI, (3) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (4) TARWI, (5) MANÍ, (6) MARCADOR DE PESOS MOLECULARES Y (7) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS ---------- 46

FIGURA 13: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO ANTICUERPO CADENA A DE RICINA CON 15 MINUTOS DE EXPOSICIÓN. INCLUYENDO CONTROL, POSITIVO DE RICINA. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING, (1) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS, (2) SACHA INCHI, (3) TORTA DE SACHA INCHI, (4) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (5) TARWI, (6) MANÍ, (7) RICINA, (8) MARCADOR DE PESO MOLECULAR Y (9) SEMILLA TOSTADA DE SACHA INCHI A 150ºC POR 30 SEGUNDOS. ---------- 47

FIGURA 14: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO SUEROS CON 30 SEGUNDOS DE EXPOSICIÓN. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING (1) SACHA INCHI, (2) TORTA DE SACHA INCHI, (3) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (4) TARWI, (5) MANÍ, (6) MARCADOR DE PESOS MOLECULARES Y (7) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS. ---------- 49

FIGURA 15: RESULTADO DEL INMUNOBLOTTING USANDO SUEROS CON 30 SEGUNDOS DE EXPOSICIÓN. A) MEMBRANA NITROCELULOSA CON TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y B) IMMUNOBLOTTING (1) SEMILLA DE SACHA INCHI SECADA A 60ºC POR 4 HORAS, (2) SACHA INCHI, (3) TORTA DE SACHA INCHI, (4) SEMILLA DE SACHA INCHI CON TOSTADO CASERO, (5) TARWI, (6) MANÍ, (7) RICIN, (8) MARCADOR DE PESO MOLECULAR Y (9) SEMILLA TOSTADA DE SACHA INCHI A 150ºC POR 30 SEGUNDOS. ---------- 50

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A – 1: MÉTODO BRADFORD PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES 64
ANEXO A – 2: MÉTODO LOWRY PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLES 66
ANEXO A – 3: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA 68
ANEXO A – 4: DETERMINACION DE ACTIVIDAD HEMO-AGLUTINANTE 71
ANEXO A – 5: METODOLOGIA WESTERN BLOTTING 73
ANEXO B – 1: RESULTADOS DEL ANALISIS PROXIMAL 92
ANEXO B – 2: RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN SACHA INCHI 92
ANEXO B – 3: RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE 97
ANEXO B – 4: RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE PROTEÍNAS SOLUBLE POR EL METODO BRADFORD EN EXTRACTOS PARA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LECTINAS 100
ANEXO B – 5: RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE PROTEÍNAS SOLUBLES POR EL MÉTODO LOWRY EN EXTRACTOS DE ELECTROFORESIS 104
ANEXO B - 6: RESULTADO DE PRUEBA CUTANEA DE ALERGIA A SACHA INCHI (PRICK TEST). 110
ANEXO D – 1: ESPECIFICACIONES DE LOS EQUIPOS UTILIZADO PARA WESTERN BLOTTING 118

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer el potencial nutricional de las semillas y residuos de extracción del aceite ("tortas") de la especie *Plukenetia volubilis* determinando la presencia de inhibidores de tripsina, lectinas, las fracciones proteicas alergénicas que presentan reactividad cruzada con maní y/o soya, y la presencia de péptidos del tipo ricina, específicamente la cadena A de ricina. Se observó actividad hemoaglutinante hasta en la dilución 1/32 en torta y 1/64 en semilla de sacha inchi. La actividad de los inhibidores de tripsina (AIT) en semilla y torta fue de 31.9 y 46.19 UTI/mg, respectivamente. En la separación electroforética de proteínas de sacha inchi en geles de SDS-PAGE se detectó bandas proteicas a 10, 12, 15, 17, 25, 30, y 52 ~ kDa. En los ensayos de inmunoblotting, no se observó reacción con los sueros de pacientes alérgicos a maní o a soya. Por otro lado, se observó reacción entre la soya y el maní, utilizando suero de pacientes con alergia a soya, en las fracciones proteicas de 38, 40 y 42 ~ kDa del maní. El anticuerpo anti-cadena A de ricina reconoce unas proteínas en las fracciones proteicas de 30 a 32 kDa de semilla y torta de sacha inchi. En conclusión, se encontró actividad hemoaglutinante y actividad de inhibidores de tripsina moderada; y un posible epítopo de la cadena A de ricina no tóxica en las fracciones proteicas de semilla y torta de sacha inchi, pero estas no presentaron reactividad cruzada con los sueros de pacientes alérgicos a maní o a soya.

Palabras claves: anti-nutrientes, alergias, fracción proteica, cadena A de ricina, epítopo.

ABSTRACT

This study was aimed to know the nutritional potential of the seeds and residues of extraction of the oil ("cake") of the species *Plukenetia volubilis* by determining the presence trypsin inhibitors, lectins, allergenic protein fractions that present reactivity crossed with peanuts and / or soybean, and the presence of ricin-type peptide, specifically the A chain of ricin. Hemagglutination activity was observed even in the dilution 1/32 cake and 1/64 Sacha inchi seed. The activity of trypsin inhibitors (ATI) in seed and cake was 31.9 and 46.19 UTI/mg, respectively. In electrophoretic separation Sacha inchi protein on SDS-PAGE protein bands detected at 10, 12, 15, 17, 25, 30, and 52 ~ kDa. In immunoblotting assays, no reaction was observed with sera of allergic patients peanut or soybean. On the other hand, reaction is observed between soy and peanuts, using serum from patients allergic to soy, in peanut protein fractions 38, 40 and 42 ~ kDa. The anti-ricin A chain antibody recognizes proteins in the protein fractions of 30-32 kDa and seed Sacha Inchi cake. In conclusion, hemagglutination activity and moderate activity trypsin inhibitors found; and a potential epitope of the A chain of ricin nontoxic seed protein fractions and Sacha inchi cake, but these did not show cross-reactivity with sera of allergic patients peanut or soybean.

Key words: anti-nutrients, allergies, protein fraction, ricin A chain, epitope.

I. INTRODUCCIÓN

Es importante destacar la presencia de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) o maní del inca en estado silvestre en diversos lugares del Perú (San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto). Considerándose patrimonio del Perú desde la época preincaica por lo tanto debe conservarse, registrarse y divulgarse su importancia. Es así que existen organizaciones orientadas a promover el biocomercio en el Perú de especies promisorias como el sacha inchi bajo criterios de sostenibilidad ambiental, social y económica.

La semilla del sacha inchi supera en contenido de ácidos grasos insaturados (omega 3, 6 y 9, beneficiosos para la salud) a todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo y muestra además una menor proporción de grasas saturadas (dañinas para la salud). Por su alto contenido de proteínas es una fuente superior para la producción de harinas proteicas, respecto a otras semillas oleaginosas.

En los análisis químicos el sacha inchi es rico en aceite y proteínas, conteniendo 41.4% y 24.7%, respectivamente (Gutiérrez, *et al.*, 2011), variando con los factores climáticos. Mientras que en harinas desgrasadas el contenido de proteína es de 59.1 ± 3.3% (Sathe *et al*., 2012).

Una de las formas de expresar la calidad nutricional de proteínas es la ausencia de compuestos anti-nutricionales, específicamente de inhibidores de tripsina y lectinas. Los primeros interfieren con el proceso de la digestión, mientras que las lectinas reconocen de manera específica carbohidratos, aglutinan células y precipitan glicoconjugados. Muchos métodos tradicionales para preparar alimentos como la cocción incrementan la calidad nutricional de las partes alimenticias de vegetales, mediante la reducción de anti-nutrientes. Asimismo, es importante tener presente los estudios que indican que muchas leguminosas comestibles presentan proteínas alergénicas, puesto que las enfermedades alérgicas parecen estar aumentando en todo el mundo. Es así que encontramos a Bueso, *et al.* (2010), quienes

reportaron un “caso de alergenicidad en una mujer de 40 años encargada de manipular la semilla de sacha inchi” en una empresa de cosméticos.

Detectando fracciones alergénicas alrededor de 10, 27 y 39 kDa en suero de una paciente alérgica a sacha inchi. Aunque la alergia a *Plukenetia* se haya reportado, no se conoce reactividad cruzada de proteínas alergénicas del sacha inchi en pacientes con alergia al maní. La reactividad cruzada es generalmente un resultado de presencia de epítopos (Parte de una molécula de materia orgánica que es objeto de una respuesta inmune por un anticuerpo) en proteínas homólogas con secuencias conservadas de aminoácidos o dominios estéricos. Hoy en día los pacientes presentan mayor incidencia en alergias inducidas por maní.

Bueso *et al.* (2010) sugieren presencia de algún péptido del tipo ricina, esta es una de las más potente toxinas conocidas, pero no es activa hasta que es modificada por endopeptidasas que dejan sólo las cadenas A y B unidas por un puente disulfuro. Burrows y Renner, 1999; citados por Pita, *et al.*, 2004; indican que la ricina se puede detoxificar con tratamiento térmico.

A pesar de que existen infinidad de compuestos por determinar en un sinfín aun mayor de semillas pertenecientes a la biodiversidad peruana, se decidió evaluar las semillas de sacha inchi, por el boom de exportación que beneficia a los agricultores que apuestan por esta semilla. A fin de que esta investigación brinde aportes para la comercialización del sacha inchi y se sume a las muchas investigaciones que apoyen el consumo y apego por nuestra diversidad.

El objetivo general es aumentar los conocimientos del sacha inchi, tanto en nuestro país como a nivel mundial, para aumentar la comercialización y exportación de esta semilla y sus derivados. Los objetivos específicos de la presente investigación son examinar la presencia de inhibidores de tripsina y lectinas en torta y semilla de sacha inchi; determinar la presencia de fracciones proteicas alergénicas en semillas y torta de sacha inchi; determinar la presencia de péptidos del tipo ricina, específicamente cadena A de ricina en semillas y torta del sacha inchi.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. CARACTERISTICAS GENERALES

2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA

Según Brack (1999) y, el Catálogo de la Biodiversidad de Colombia (2007), citado por Mondragón, G. (2009), la clasificación botánica de la planta es la siguiente.

Reino: Vegetal
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Orden: *Euphorbiales*
Familia: *Euphorbiaceae*
Género: *Plukenetia*
Especie: *Plukenetia volubilis Linneo*.
Ecotipo: *Pinto Recodo*

La especie *Plukenetia volubilis L.*, es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: sacha inchi, maní estrella, maní inca, maní de monte, maní de bejuco, cacahuate inca, N´gart, Inca peanut, supua, amui-o, sacha yuchi, sacha yuchiqui, sampannankii, suwaa (Soukup, 1970).

Las características morfológicas diferenciales más saltantes la encontramos en la forma de las semillas de los diferentes grupos de *Plukenetia* (véase Figura 1), que van desde redondeadas hasta ligeramente lenticuladas; y diferencias en la testa de las semillas, de aspecto liso en cuatro de los seis especies (*P. loretensis*, *P. brachybotrya*, *P. volubilis* - procedencia San Martín y *P. polyadenia*), y rugosa en *P. huayllabambana* y *P. volubilis* (procedencia Cusco). Asímismo existe una considerable variación en el tamaño de las semillas (Rodríguez, *et al*.; 2010).

Figura 1: Semillas de seis agrupaciones del genero *Plukenetia* estudiados en la Amazonia peruana. A = *P. brachybotrya*; B = *P. loretensis*; C = *P. volubilis* (procedencia San Martin); D = *P. volubilis* (procedencia Cusco); E = *P. huallaybambana*; F = *P. polyadenia.*
FUENTE: Rodríguez *et al.* (2010)

2.1.2. SEMILLA DE SACHA INCHI

El sacha inchi (*Plukenetia volúbilis*) es una leguminosa (Obregón, 1996) que en el Perú crece en forma silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. Es una planta que se adapta a suelos arcillosos y ácidos y se desarrolla mejor en climas cálidos (Valles, 1995).

El sacha inchi constituye uno de los recursos vegetales más prometedores del Perú ya que por su alto contenido de grasa y proteínas, posee potencial como fuente de aceite y complemento de la alimentación humana y animal. Actualmente los agricultores lo siembran como planta de huerto, cobertura de arcos vivos y alambres, y su semilla es

consumida tostada y/o cocida. Las ventajas de su cultivo incluye su resistencia a condiciones adversas de suelo, su rápido crecimiento y productividad continua (García, 1992).

Los frutos están formados por cuatro capsulas dehiscentes. Dentro de las cápsulas se encuentran las semillas de color marrón oscuro (véase Figura 2), ovaladas de 1.5 cm a 2.0 cm de diámetro, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas en los bordes (Valles, 1995).

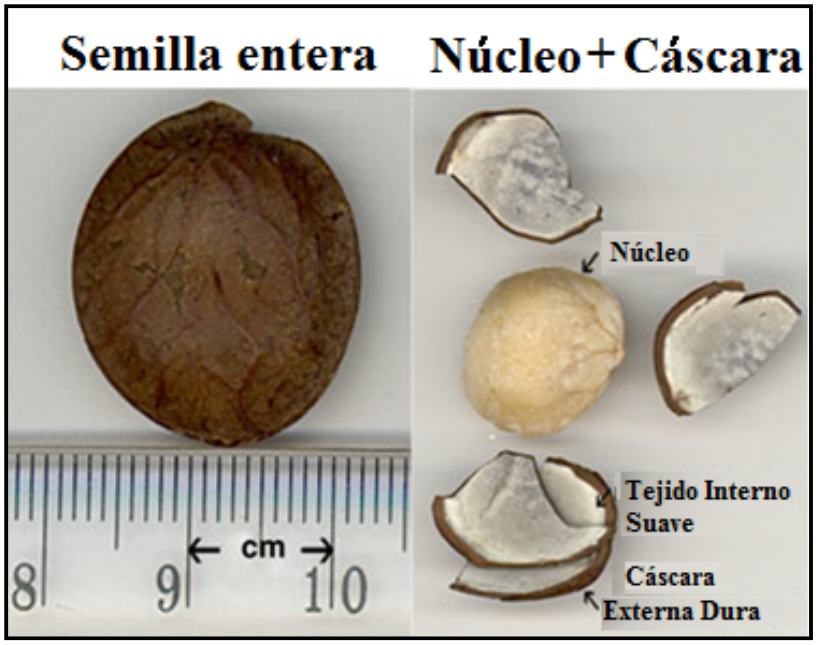


Figura 2: Sacha inchi, semilla y núcleo. El núcleo se embala dentro de una cáscara dura de color marrón con un forro interior suave tejido blanco FUENTE: Sathe *et al.* (2012)

2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los principales ácidos grasos poliinsaturados del sacha inchi son el ácido α-linolénico (ω-3) y el ácido linoleico (ω-6) con 50.8% y 33.4%, respectivamente (Gutiérrez, *et al.*, 2011).

En el Tabla 1, se recopilo información de diferentes autores sobre la composición de aceite y proteína total del sacha inchi, maní, ricina y lupino.

Tabla 1. Composición química del sacha inchi, maní, ricina y lupino

	Materia prima	Composición	Fuente
Aceite	Sacha inchi	41,40%	Gutiérrez, *et al.* (2011)
		43,27%	García (1992)
		49%	Higuchi (2004)
		51,40%.	Pascual y Mejía (2000)
Proteína total	Sacha inchi	24,39%	García (1992)
		24,70%	Gutiérrez, *et al.* (2011)
		27%	Hamaker *et al*. (1992)
		33%	Higuchi (2004)
	Torta de sacha inchi	58,72%	Pascual y Mejía (2000)
	Sacha inchi tostado	31,44%	Merino, *et al*. (2008)
	Torta de sacha inchi 60ºC	32.65%	Hamaker, *et al.* (1992)
	Maní	29,55%	Méndez, *et al*. (2000)
	Lupino	44,30%	Castañeda, *et al*. (2009)
	Ricina	20.40%	Breese (1947)

2.2. ANTINUTRIENTES

2.2.1. INHIBIDORES DE TRIPSINA

Son péptidos de pequeño tamaño (de 7 a 8 kDa) con numerosos enlaces disulfuro. Además, son ricos en aminoácidos azufrados, por lo que la digestibilidad se reduce en su presencia (Valencia, *et al*., 2008). El páncreas segrega en forma de zimógenos: tripsinógeno, quimiotripsinógeno y pro-carboxipeptidasa, las formas inactivas de las enzimas: tripsina, quimiotripsina y pro-carboxipeptidasa, respectivamente. Una vez que ingresa el tripsinógeno al intestino delgado, una peptidasa, enzima secretada por el intestino, la transforma en tripsina. A su vez, la tripsina se encarga de transformar al tripsinógeno, al quimiotripsinógeno y a la pro-carboxipeptidasa en sus formas activas. Estas enzimas se encargan casi totalmente de la digestión de proteínas (Lehninger *et al.*, 1993).

Los inhibidores de tripsina interfieren con la digestión normal de proteínas en el tracto intestinal. Estos inactivan a las enzimas secretadas por el páncreas, a través de la formación de complejos enzima-inhibidor con una constante de disociación muy baja, bloqueando así efectivamente el sitio activo. El inhibidor no permite un desarrollo del mecanismo enzimático normal, no hay formación de producto y la enzima permanece unida al inhibidor (Walker *et al*., 1998, mencionado por Lawrence y Koundal, 2002).

La función fisiológica que cumplen estos inhibidores ha sido ampliamente estudiada y se han propuesto tres posibles roles. El primero está relacionado a la regulación de proteínas endógenas, el segundo asocia a los inhibidores con una función de defensa biológica contra patógenos y el tercero afirma que estos inhibidores son una forma de reserva de proteínas (Padmaja *et. al*., 1999; citados por Aliaga y Gómez, 2007).

Los inhibidores de tripsina, como inhibidores proteolíticos, pueden provocar retardo en el crecimiento e hipertrofia pancreática. La hiperplasia o agrandamiento de la glándula tiroides se explica ya que al ser inhibida parte de la tripsina el organismo, exige a la glándula una mayor producción, con el consiguiente agrandamiento (Ulloa *et al*., 2011).

2.2.2. LECTINAS

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados. Poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidrato como es el caso de las selectinas. Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Las actividades biológicas reportadas para las lectinas

tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacarídico (Mikami *et al.*1994, y Cygler *et al.,* 1991; citados por Hernández *et al.*, 2005).

Actualmente debido a la gran cantidad de datos cristalográficos de lectinas vegetales, se ha propuesto una nueva clasificación de lectinas vegetales con base en su estructura molecular (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005), la cual tiende a reemplazar la clasificación basada en la especificidad y en la cual se distinguen seis familias (Figura 3):

A. LECTINAS AISLADAS DE LEGUMINOSAS

Es la familia de lectinas vegetales más estudiada, generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25 a 30 kDa, cada de estas contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+}, Mn^{2+} y Mg^{2+}. Una subunidad contiene aproximadamente 250 aminoácidos y presenta una gran homología con las otras subunidades. Está constituida por doce hojas β anti-paralelas conectadas entre sí mediante bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo (Figura 3-1), cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

B. LECTINAS CON DOMINIOS TIPO HEVEÍNA O ESPECÍFICAS DE QUITINA

Generalmente presentan dos subunidades idénticas, ricas en cisteínas contrariamente a las lectinas de leguminosas. Una subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína, conteniendo cuatro puentes disulfuros (Figura 3-2), lo cual origina que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de una pequeña α hélice de cinco residuos; cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidrato, que no necesita la presencia de iones metálicos (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

C. LECTINAS AISLADAS DE MONOCOTILEDÓNEAS ESPECÍFICAS DE MANOSA

A este grupo de lectinas pertenecen las provenientes de orquídeas, ajo y amarilis, con secuencias de aminoácidos altamente conservadas. Estas lectinas son tetraméricas, cada

monómero tiene un peso molecular de 12 kDa, así como una secuencia de 36 aminoácidos repetidas tres veces. El sitio de reconocimiento a carbohidrato está constituido por cuatro hojas β antiparelelas unidas entre sí por giros (Figura 3-3). El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

D. LECTINAS EN FORMA DE PRISMA B O DEL TIPO JACALINA

En este grupo, se encuentran lectinas vegetales, que presentan estructuras tridimensionales muy similares a la de *Artocarpus integrifolia* (jacalina). Lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada sub-unidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y está constituida por tres hojas β antiparalelas arregladas a manera de un prisma triangular (Figura 3-4) (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

E. LECTINAS RELACIONADAS CON PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE RIBOSOMAS

Estas proteínas forman parte de los venenos más tóxicos. Su estructura molecular es compleja. Están constituidas por dos cadenas, la A y B, las cuales son diferentes y se encuentran unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A es la responsable de la toxicidad (actividad de N-glicosidasa sobre el ribosoma que inactiva la traducción), mientras que la cadena B, posee la actividad de lectina. La cadena B está constituida por dos dominios que presentan cuatro sub-unidades, las cuales contienen α hélices y hojas β (Figura 3-5) (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

F. LECTINAS TIPO AMARANTO

Dentro de este grupo encontramos lectinas provenientes de distintas especies de amaranto, entre las que destacan *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus leucocarpus*. Cada proteína se encuentra formada por dos monómeros en los que existen dos dominios N y C, unidos por una pequeña hélice 3^{10}, cada dominio muestra una conformación de trébol β semejante a la conformación observada en la cadena B de la lectina de *Ricinus communis*. (Figura 3-6) (Mákela, 1957; citado por Hernández *et al*., 2005).

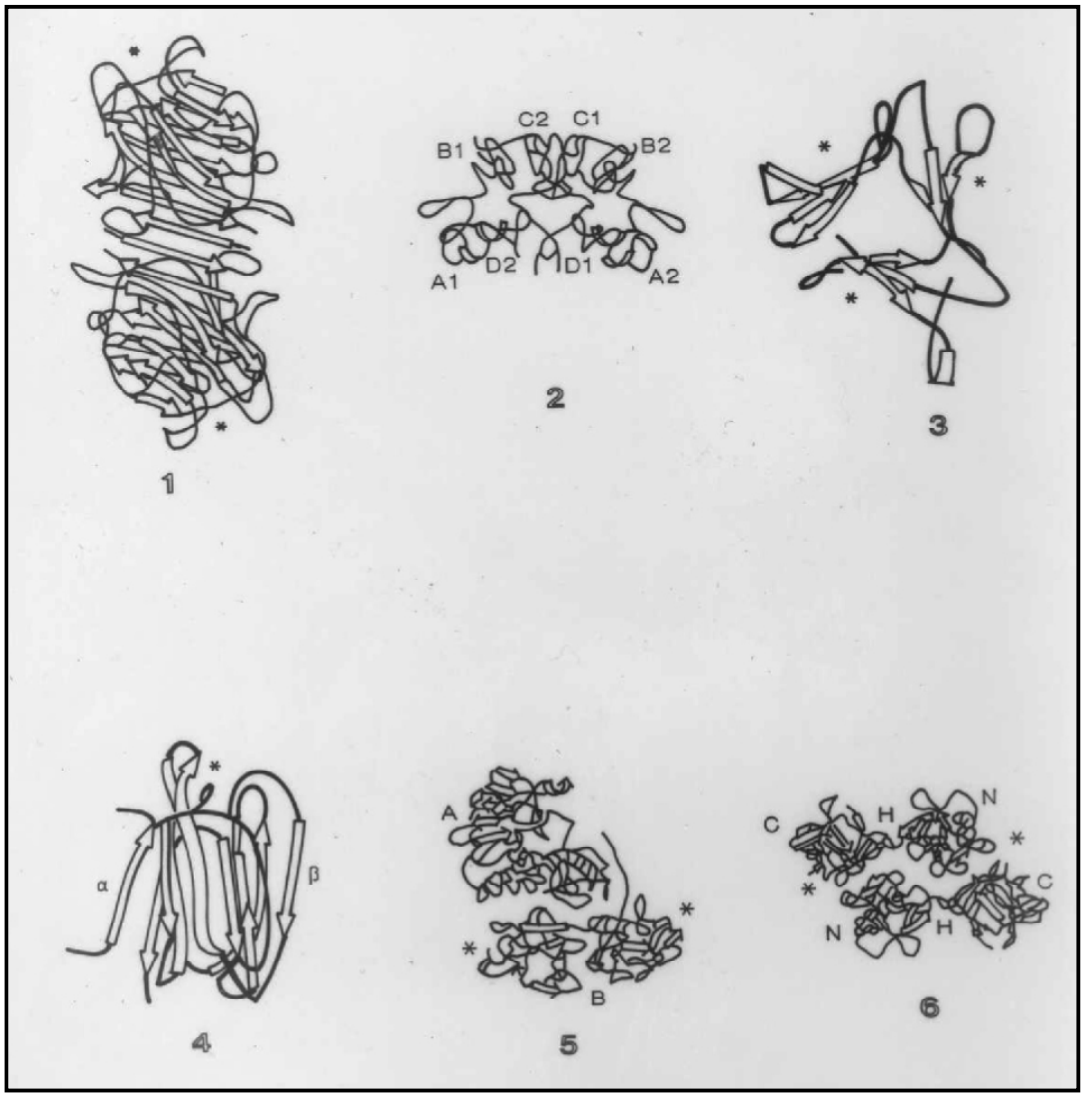


Figura 3: Representación esquemática de las estructuras tridimensionales en lectinas vegetales. (1) Lectinas aisladas de leguminosas, (2) lectinas con dominio tipo heveina, en donde cada uno de los dominios son representados con letras de la A-D, mismos que tienen un sitio de reconocimiento a carbohidrato, (3) lectinas aisladas de monocotiledóneas, específicas de manosa, (4) lectinas con estructura tipo prisma β, (5) lectinas relacionadas con proteínas inactivadoras de ribosomas, (6) Lectinas tipo Amaranto. (*) Sitio de unión al carbohidrato.

FUENTE: Hernández *et al*. (2005)

El efecto de las lectinas está relacionado con el hecho de que se adhieren a los carbohidratos sobre la superficie del intestino delgado (duodeno y yeyuno) y causan daños en la pared intestinal, afectando los procesos de absorción y transporte de nutrimentos a través de ella (Celis, 2007). El efecto dañino es una intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio y edema, o sea que reaccionan con las criptas y vellos intestinales, pero en diferente región de acuerdo a la especificidad de la hemaglutinina, lo que ocasiona una interferencia no-específica con la absorción de los nutrimentos, por consiguiente hay un efecto drástico en la nutrición del organismo que las ingiere (Jaffé, 1980; Liener, 1986; Donatucci *et al*, 1987). Otros autores sugieren que la causa de la toxicidad de estas sustancias, se debe a que en las lesiones epiteliales del intestino se puede favorecer la proliferación bacteriana que es la causante de la no biodisponibilidad de nutrimentos. Hay que mencionar, que algunas lectinas al parecer no resisten el proceso hidrolítico de las enzimas digestivas, por lo tanto no presentan propiedad tóxica, como es el caso de las lectinas del garbanzo (*Cicer arietinum*). Un método para poder detectar la presencia de este tipo de sustancias, es aprovechar la capacidad de aglutinar los eritrocitos de cierta especie de animales, ya que se puede presentar en altas diluciones con este tipo de glicoproteínas (Lis and Sharon, 1981; Lucas and Sotelo, 1993).

Las lectinas pueden ser detectadas en el laboratorio por su actividad hemo-aglutinante. El primer informe sobre lectinas data de 1888. En ese año Stillmark (1888) publica una conferencia sobre la toxina y aglutinina de la semilla del ricino (*Ricinus communis*). El extracto de esta semilla era capaz de aglutinar eritrocitos animales. Esta propiedad de aglutinar hematíes fue confirmada en diversos trabajos (en los veinte años siguientes) en extractos de distintas semillas. Esta aptitud hemoaglutinante dio lugar a que las moléculas responsables del fenómeno fueran designadas como hemoaglutininas o fitohemoaglutininas (dado su origen vegetal) hasta que Boyd y Shapleigh (1954) acuñaron el término lectina utilizado hasta nuestros días. Las hemoaglutininas se les conocen por su propiedad de aglutinar los eritrocitos de la sangre humana o de otros animales.

La capacidad hemaglutinante de las lectinas es usualmente medida por la técnica de dilución de series, esta técnica se determina con estimación visual del punto final, tomándose como una medida indirecta del contenido de lectinas en leguminosas. Comparando los datos publicados sobre la actividad hemoaglutinante de las lectinas por

diferentes autores, el principio básico de la técnica es la aglutinación de células, teniendo algunas variantes en cuanto a buffer utilizado para la extracción, tiempo de agitación del extracto, etc. (Barrón, 1984).

La destoxificación de los alimentos que contienen hemaglutininas es por medio de tratamiento térmico. Se manifiesta que con los métodos tradicionales de cocimiento casero, se puede obtener una adecuada inactivación de estas proteínas tóxicas; sin embargo, se debe recordar que en regiones de altitud elevada, el punto de ebullición se abate y puede ser una limitante en el proceso de inactivación (Van der Poo, *et al.*, 1990). Hay que tener suma precaución, ya que en cada caso hay que aplicar el tratamiento adecuado; además, si el material se somete a un calentamiento severo, se puede dañar la calidad nutritiva de la proteína (Melcion and Van der Poel, 1993).

2.3. ALERGIAS

La reacción alérgica se inicia con la exposición de un individuo genéticamente predispuesto a antígenos (alérgenos) que estimulan la producción de anticuerpos específicos tipo inmunoglobulina E (IgE); este proceso se denomina sensibilización. Cuando el individuo sensibilizado se pone de nuevo en contacto con el alérgeno, se produce una liberación de mediadores por parte de los mastocitos que da lugar a los síntomas clínicos. Esta segunda fase no es silenciosa, sino prodrómica, mostrándose como aquellas manifestaciones clínicas inespecíficas, que sobresalen del estado habitual del paciente y que preceden a los síntomas con manifestaciones clínicas equivalentes (Rodríguez, 2005).

Los mastocitos son células del tejido conjuntivo grandes y ovoides (20 a 30 μm de diámetro) que sintetizan y almacenan histaminas y que se encuentran en la mayoría de los tejidos del cuerpo cavidades serosas y alrededor de los vasos sanguíneos. En una respuesta alérgica, un alérgeno estimula la liberación de anticuerpos, los cuales se unen a la superficie de los mastocitos (Ross y Pawlina, 2007).

Las inmunoglobulinas E, son anticuerpos desarrollados contra alérgenos, y a diferencia de otras inmunoglobulinas sus cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro y un puente disulfuro une las cadenas pesadas y livianas entre sí. Se encuentra en muy baja

concentración en el suero y su vida media es aproximadamente de dos o tres días. Los antígenos que la estimulan se llaman alérgenos (Montoya, 2008).

La determinación cuantitativa del nivel de IgE específica frente a alérgenos individuales se considera el patrón oro o método de referencia en el diagnóstico de la alergia, por su elevada sensibilidad y especificidad y porque permite cuantificar la respuesta y conocer el grado de sensibilización según el nivel de anticuerpos. Las regiones constantes de los anticuerpos IgE (véase Figura 4) se unen firmemente a receptores existentes en la superficie de los mastocitos (Toral y Moral, 2004).

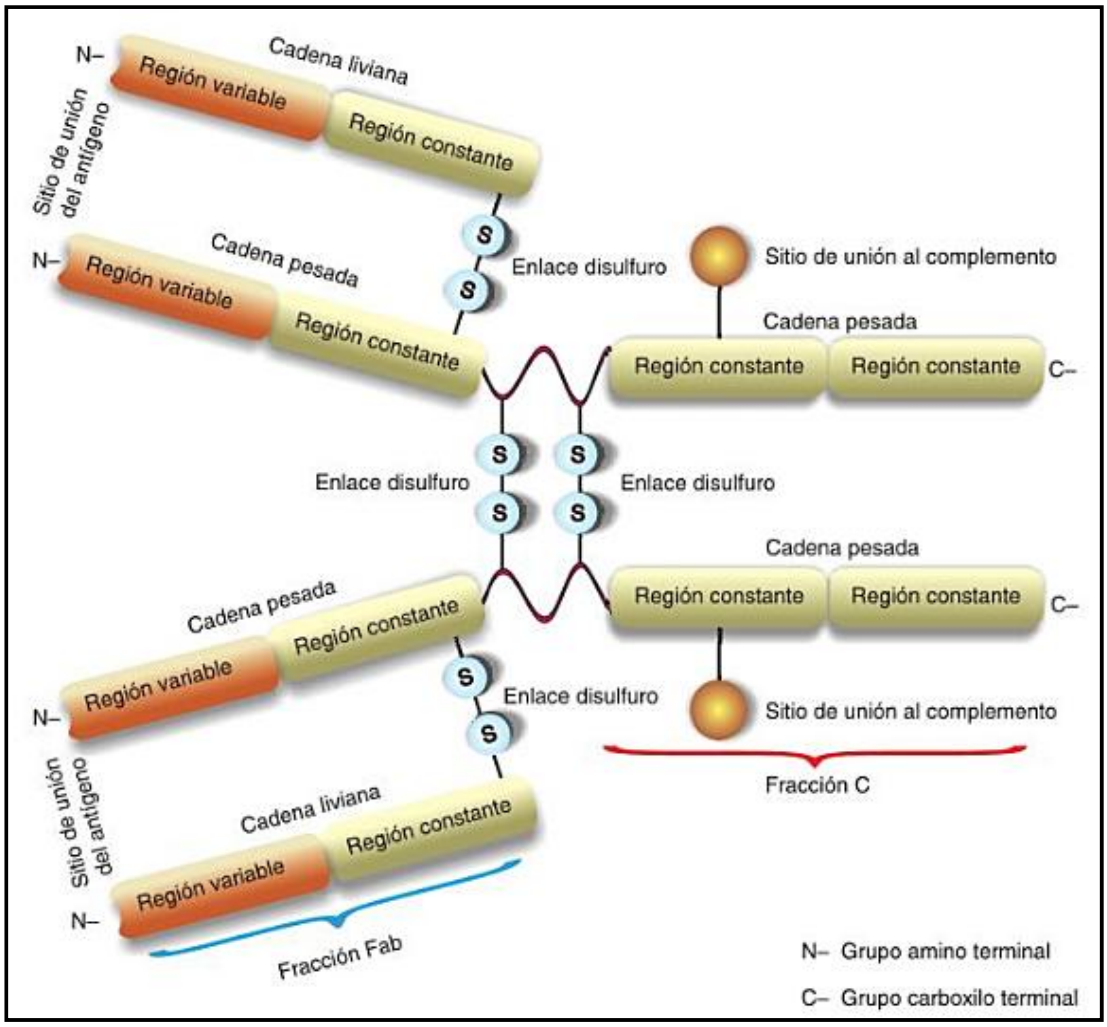


Figura 4: Estructura básica de una molécula de inmunoglobulina.
FUENTE: Montoya (2008)

2.3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS

Tipo 1 o anafiláctica. A este tipo pertenecen las "enfermedades atópicas", entre ellas: el asma, la rino-conjuntivitis, y la dermatitis atópica. En esta reacción alérgica un anticuerpo del tipo IgE, se fija a los receptores de superficie de los mastocitos y cuando penetra el alérgeno la célula libera los mediadores químicos que provocan una reacción inmediata, bronco espástica y una tardía, inflamatoria (Rodríguez, 2005).

Tipo II o citolítica o citotóxico. Un anticuerpo específico, al unirse a un antígeno fijado a la superficie de una célula que se haya hecho antigénica por alteración de su estructura química, provoca una grave reacción de autoagresión con severo daño tisular. Pertenecen a este tipo de reacción alérgica las "enfermedades autoinmunes"; las reacciones transfusionales; la enfermedad hemolítica del recién nacido, la tiroiditis de Hashimoto y otras (Rodríguez, 2005).

Tipo III o enfermedad de los complejos tóxicos. En este tipo, el antígeno y el anticuerpo se unen en el torrente sanguíneo o en el líquido intercelular, precipitan en los tejidos y activan el sistema del complemento, cuyas enzimas proteolíticas causan daño secundario en el órgano o sistema donde se depositen, menos graves que el daño primario del tipo II (Rodríguez, 2005).

Tipo IV o de sensibilidad retardada. En esta la hipersensibilidad no se manifiesta en los tejidos, sino en la célula inmuno-competente misma, en el linfocito T auxiliador o en el macrófago en cuya superficie se fija un anticuerpo citofílico. El principal correlato clínico de este tipo es la dermatitis de contacto (Rodríguez, 2005).

2.4. TOXINAS

La toxicología de alimentos se refiere al conocimiento sistemático y científico de la presencia de sustancias potencialmente dañinas en los alimentos, y evitar hasta donde sea posible la ingesta de una cantidad que ponga en riesgo la salud del consumidor. En el Renacimiento, Philippus Aureolus Theofrastus Bombastus von Mohenhein Paracelsus promulgó el siguiente enunciado: "Todas las sustancias son venenosas; no hay ninguna que no sea tóxica. La correcta dosis diferencia al veneno del remedio" (Valle y Lucas, 2000).

Algunas sustancias tóxicas vegetales de los principales grupos se describen a continuación:

2.4.1. ALCALOIDES

Son compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra comúnmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación (Paris, 1981 y Evans, 2000; citados por Arango, 2008). Arango (2008), indica los siguientes alcaloides naturales:

- Andrometodoxina - (*Rododendro, Kalmia*)
- Atropina - (*Estramonio*)
- Colchicina - (*Cólquico*)
- Conidina - (*Conidio*)
- Gelsemina o Gelseminina - (*Jazmín Amarillo*)
- Hiosciamina - (*Estramonio, Beleño Negro*)
- Madragorina - (*Madrágora*)
- Papaverina - (*Opio*)
- Solanina - (*Dulcamara*)
- Taxina - (*Tejo*)

2.4.2. GLUCÓSIDOS

Los glucósidos derivan de aminoácidos, el aglucón puede ser de tipo aromático, alifático, o cíclico. También puede haber variación en la naturaleza del carbohidrato; sin embargo, de los 32 glucósidos reportados, la mayoría son monosacáridos siendo la D-glucosa el azúcar más común (Li *et al*, 1992; citados por Valle y Lucas, 2000).

Los glucósidos cianógenos se definen así por presentar cianuro en cantidad de trazas, está ampliamente distribuido en las plantas, en donde se encuentra principalmente en forma de glucósido, ya que al parecer más que un metabolito secundario como en un principio se creía, son productos intermediarios en la biosíntesis de algunos aminoácidos (Valle y Lucas, 2000). Los principales glucósidos cianogénicos son:

- (S)-Durrina
- (R)-Taxifilina
- Trigloquinina
- Ginocardina
- Linamarina
- (R)-Prunasina

2.4.3. FITOTOXINAS

Fitotoxinas son gruesas moléculas proteínicas, que generalmente pueden ser destruidas por un prolongado calentamiento. Se encuentran entre las plantas conocidas como de mayor toxicidad y no son destruidas por los procesos digestivos (García, 2011).

A. RICINA

La ricina es una fitotoxina presente en las semillas de *Ricinus communis L*. (familia *Euphorbiaceae*). Las semillas son ovaladas, con un tamaño entre 8 y 20 mm de largo y entre 4 y 12 mm de ancho (véase Figura 5), en función de la variedad. Estas semillas contienen un 46-53% de aceite. El aceite se utiliza en la fabricación de pinturas, jabones, barnices, productos de cosmética y lubricantes, entre otros. El prensado de la obtención del aceite tiene un alto contenido proteico y de ahí que se utilice como fertilizante orgánico, aunque no es apto para la alimentación del ganado porque contiene ricina. De hecho, se han dado casos de intoxicación en animales por su ingesta (Pita *et al.*, 2004).

El tratamiento térmico a 80 ºC por 10 minutos o a 50 ºC durante 1 hora es capaz de detoxificar la toxina. Este tratamiento tiene la desventaja de que puede alterar también los nutrientes (Burrows y Renner., 1999; citado por Pita *et al.*, 2004).

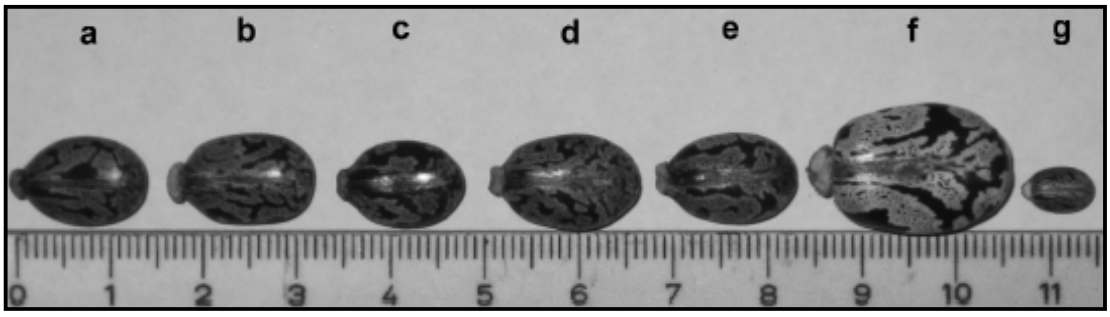


Figura 5: Semillas de distintas variedades de *Ricinus communis* L.: (a) carmencita roja; (b) carmencita rosa; (c) gibsonii; (d) impala; (e) sanguineus; (f) zanzibariensis; y (g) zanzi palm.
FUENTE: Pita *et al.* (2004)

Las semillas del ricino son venenosas para el hombre, los animales y los insectos. La ricina fue aislada en 1888 por Stillmark cuando observó que el extracto de las semillas aglutinaba las células sanguíneas. Hoy se sabe que la aglutinación por el extracto de las semillas de ricino se debe a otra toxina llamada RCA (Aglutinina del *Ricinus communis*). La ricina es un potente tóxico pero es una hemoaglutinina débil, mientras que la RCA es poco tóxica pero un potente aglutinante. En cualquier caso, la toxicidad de las semillas de ricino se debe sólo a la ricina ya que la RCA no se absorbe por vía oral (Capó, 2007).

La ricina es una de las toxinas más potentes conocidas. Basta un miligramo para matar a una persona adulta. Los síntomas de un envenenamiento por ricina son dolor abdominal, diarrea a veces sanguinolenta y vómitos. Posteriormente se produce una severa deshidratación e hipotensión. Los síntomas de envenenamiento comienzan a las pocas horas de la ingestión. Si la muerte no se produce en 3 a 5 días, la víctima se recupera. Una semilla es suficiente para matar a un niño si se rompe. Si se traga entera, lo más probable es que pase sin problemas por el tracto digestivo. Los niños son más sensibles que los adultos debido a que son más propensos a la diarrea y a la deshidratación (Capó, 2007).

a. ESTRUCTURA Y SÍNTESIS

La ricina pertenece a la familia de proteínas conocidas como proteínas inactivantes de los ribosomas "ribosome-inactivating proteins" (RIPs), que se unen de forma irreversible a los

ribosomas de las células eucarióticas impidiendo la síntesis de proteínas. Los RIPs de tipo I son monómeros N-glicosilados de un peso molecular de 30 kDa, también llamados cadena A de ricina. Sin embargo, para fijarse a los receptores galactósidos de la membrana de las células y entrar en el citoplasma para alcanzar el ribosoma, hace falta un segundo monómero, una lectina de 30 kDa que se fija a la galactosa, llamada también cadena B o RTB. Ambos monómeros se unen mediante un puente disulfuro formando la toxina de ricina (Capó, 2007).

La ricina y la RCA son sintetizadas en las células del endosperma de las semillas maduras y almacenadas en una vacuola. Cuando la semilla germina, las toxinas son destruidas en unos pocos días por hidrólisis. La síntesis de la ricina se inicia como un prepropolipéptido que contiene las dos cadenas A y B. La secuencia señal de la terminación amina del péptido se fija al receptor del canal de retículo endoplásmico donde es removida. Seguidamente se inicia la síntesis de la pro ricina. A medida que el polipéptido elonga en el lumen del retículo endoplásmico, las enzimas isomerasas catalizan la formación de puentes disulfuro a medida que la proteína se pliega. La proricina experimenta otras modificaciones en el complejo de Golgi y finalmente es transportada dentro de vesículas hacia la membrana plasmática. La ricina no es activa hasta que es modificada por endopeptidasas que dejan sólo las cadenas A y B unidas por un puente disulfuro. De esta forma, la planta evita que la ricina envenene sus propios ribosomas en el caso de que alguna molécula de proricina pasase accidentalmente al citoplasma (Cayó, 2007).

La cadena A ejerce su efecto N-glicosidasa sobre bases específicas del ARNr mayor (la adenina 4324 del ARNr 28S en el caso de la rata), impidiendo al ribosoma fijar los factores de elongación (EF2-GTP) necesarios en la síntesis de proteínas y por tanto colapsando dicho proceso (Jiménez *et al.*; 2012).

b. MECANISMO DE ACCIÓN

La cadena A del heterodímero de la ricina es la que tiene una acción enzimática eliminando una molécula de adenina del 28S-rRNA del ribosoma. El ribosoma queda inactivado y la síntesis de proteínas se detiene. Dado que la acción es catalítica, una única molécula de ricina puede inactivar cientos de ribosomas, acabando por matar a la célula. Para ejercer este efecto, la ricina debe penetrar en la célula lo que consigue uniéndose a la

cadena B, responsable de la unión selectiva de la proteína con azúcares presentes en ciertos receptores glicoprotéicos y glicolipídicos de las membranas de algunas células animales. Una vez en el interior, la ricina entra en el complejo de Golgi pasando después al retículo endoplásmico donde tiene lugar la síntesis de proteínas (Capó, 2007).

c. APLICACIONES TERAPÉUTICAS:

La acción catalítica de la ricina puede ser aprovechada para atacar determinadas células como las cancerosas, conjugando la cadena A con anticuerpos o factores de crecimiento que tienen preferencias hacia las células diana. Estas inmunotoxinas funcionan muy bien en aplicaciones "in vitro", por ejemplo en los transplantes de médula ósea. En efecto se han utilizado inmunotoxinas de ricina A para destruir linfocitos T de la médula ósea de donantes histocompatibles, con objeto de reducir los problemas del rechazo. También se utiliza en los trasplantes autólogos de médula ósea para destruir las células T malignas en leucemias y linfomas. La falta de especificidad de la inmunotoxina, la heterogeneidad de las células tumorales, y los efectos secundarios son algunos de los problemas que han hecho que este tipo de tratamiento todavía esté en fase de investigación. Uno de los efectos secundarios más importantes en pacientes tratados con inmunotoxinas es el síndrome de fugas vasculares, en el que los fluidos resuman de los vasos sanguíneos produciendo edema e hipoalbuminemia (Capó, 2007).

2.4.4. OXALATO

Las plantas producen los cristales de oxalato de calcio en una gran variedad de formas y tamaños, aunque la mayoría de los cristales pueden clasificarse dentro de cuatro tipos principales en base a su morfología: rafidios (cristales aciculares en agregados), drusas (agregados cristalinos esféricos), estiloides (cristales aciculares) y prismas (Jauregui y Moreno, 2004).

2.4.5. OTROS

Entre otros grupos tenemos Resinoides (Iridina - *Lirio Fétido, Iris Policromo*) y Bociógenos (coles).

Debido a que la proteína de origen animal es de difícil acceso en países pobres, se proponen como una solución más viable, aumentar la producción de alimentos de origen vegetal con un buen contenido de proteína. Liener y otros investigadores, consideran que una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de oleaginosas y leguminosas como soya, cacahuate, colza, frijol, haba y garbanzo entre otras (Bermejo y León, 1992; Bostid, 1989; citados por Valle y Lucas, 2000)

2.5. PROCEDIMIENTOS INSTRUMENTALES

2.5.1. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La movilidad de las partículas está determinada de forma proporcional al voltaje aplicado y la carga neta de la molécula y de forma inversamente proporcional a la fricción de la molécula; esta última depende de la forma y el tamaño de la misma (Lehninger *et al*., 2008).

La electroforesis se utiliza en bioquímica como un método de separación de proteínas analítico más que preparativo, es decir, es un método útil para la visualización y separación de preparaciones de proteínas en pequeña escala y no a gran escala. Tiene la ventaja de que ayuda al analista a determinar rápidamente cuántas proteínas existen en una preparación en particular o el grado de pureza de una preparación proteica específica. Además, la electroforesis permite la determinación experimental de propiedades como el punto isoeléctrico y el peso molecular (PM) de una proteína (Lehninger *et al*., 2008).

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis) debido a su buena resolución y gran versatilidad. Además, poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerzas iónicas y fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida. En la mayoría de los casos, el gel se dispone entre dos receptáculos independientes y separados que contienen tampón de electroforesis y los electrodos positivo y negativo, de forma que la conexión eléctrica entre ambos receptáculos sólo es posible a través del gel. Una vez que la electroforesis ha tenido lugar, el gel de poliacrilamida se puede teñir o documentar (Westermeier, 2001).

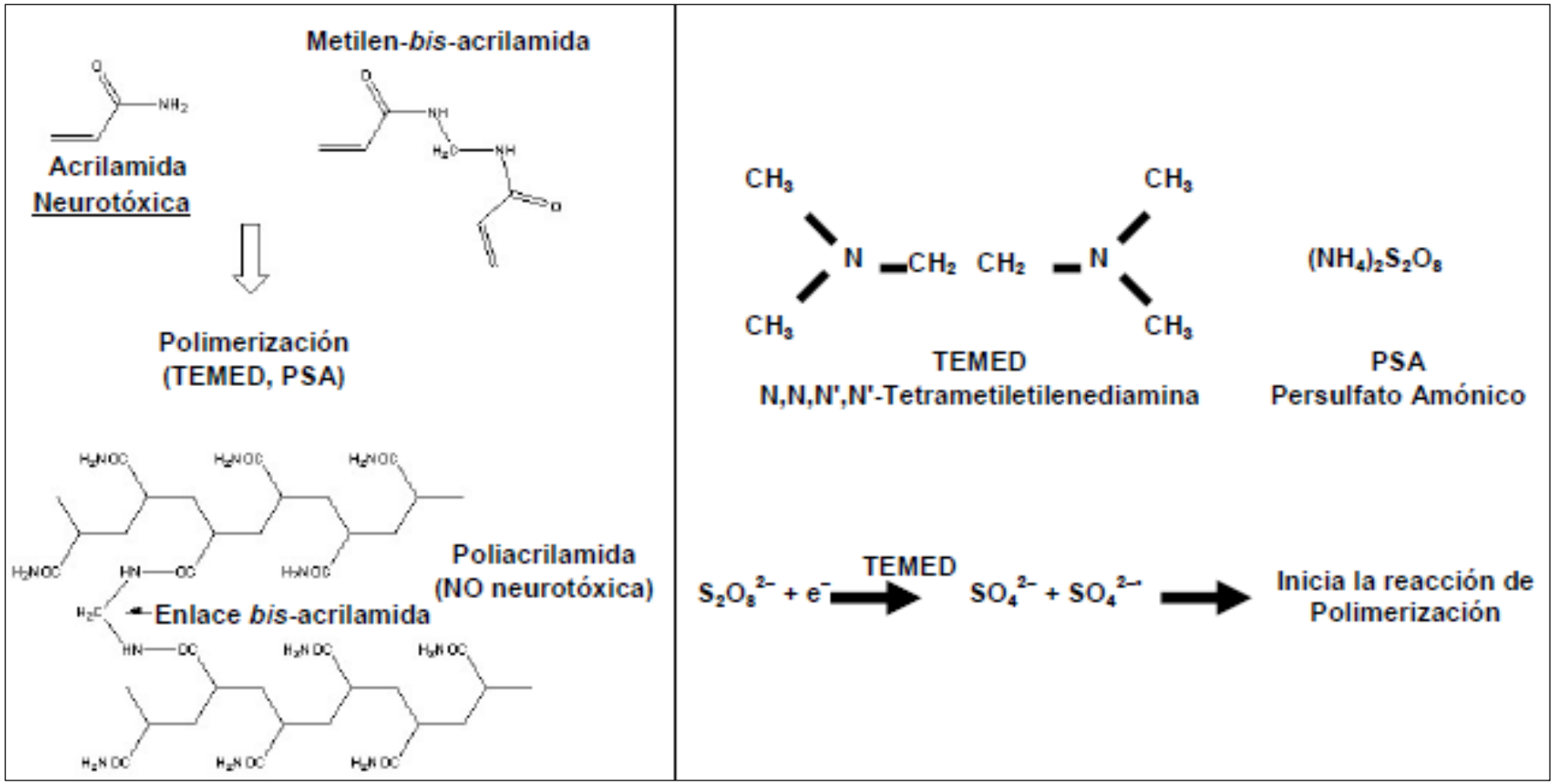


Figura 6: Reacción de polimerización de la acrilamida

FUENTE: Westermeier (2001)

En la Figura 6, se representa la reacción de polimerización de la acrilamida. Los geles de poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular retardando el movimiento de macromoléculas grandes mientras que permiten a moléculas más pequeñas moverse libremente, potenciando de esta forma la separación. El entramado de los geles de poliacrilamida se genera mediante la polimerización, a través de radicales libres, de monómeros de acrilamida en presencia de pequeñas cantidades de "bis-acrilamida" (N, N, N', N'-metilen-bis-acrilamida). Se forman enlaces cruzados entre los 2 polímeros de acrilamida, de manera que se generan geles con tamaño de poro determinado tanto por la concentración total (%T) como por la concentración relativa de acrilamida y de bisacrilamida. El tamaño del poro puede ser ajustado para optimizar la separación de la muestra de interés. Así, geles con un porcentaje alto de acrilamida (10-15%T) son óptimos para la separación de proteínas de pequeño tamaño (menores de 50KDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10%T) son los indicados para la separación de proteínas mayores. Generalmente la relación utilizada entre acrilamida y bisacrilamida es 37,5:1 (Westermeier, 2001).

La reacción de polimerización se inicia por un sistema redox de catálisis. El TEMED cataliza la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de APS y que actúa como iniciador (Westermeier, 2001).

2.5.2. WESTERN BLOTTING

Inmunotransferencia (Western Blotting) es un ensayo rápido y sensible para la detección y caracterización de proteínas que funciona mediante la explotación de la especificidad inherente en el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se trata de la solubilización y separación electroforética de las proteínas, glicoproteínas, o lipopolisacáridos por electroforesis en gel, seguida de la transferencia y unión irreversible a nitrocelulosa PVDF, o de nylon. La técnica de inmunotransferencia ha sido útil en la identificación de antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos policlonales o monoclonales y es altamente sensible (Gallagher y Chakavarti, 2008).

La electrotransferencia se basa en una corriente eléctrica y un tampón de transferencia para llevar las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello, se apilan en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o cátodo al positivo o ánodo): esponja, varios

papeles de filtro empapados en buffer de transferencia, gel, membrana, más papeles de filtro empapados y otra esponja. Este montaje, llamado coloquialmente sandwich, se dispone en el sistema de transferencia y se aplica una corriente eléctrica, de magnitud acorde a los materiales empleados y al tiempo disponible. Las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo y quedan atrapadas por la membrana (Towbin *et al*., 1979).

Tras la transferencia, se suele proceder a la tinción del gel con Coomassie Blue (un colorante de proteínas) para comprobar que en efecto una parte importante del material proteico ha pasado a la membrana. La electrotransferencia es hoy en día la técnica de transferencia más usada gracias a la velocidad del proceso y al elevado porcentaje de proteína que se transfiere (Towbin *et al*., 1979).

Luego se realiza el bloqueo, pues la membrana es elegida por su capacidad para unirse a proteínas y, como los anticuerpos y el objetivo son las proteínas, es preciso bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia. En caso contrario, el anticuerpo (de naturaleza proteica) empleado en la detección puede unirse a ellos, dificultando la distinción del complejo antígeno-antígeno que se forma con la proteína que se busca. En el bloqueo se incuba la membrana con una solución de proteínas, típicamente de albúmina de suero bovino o ASB (más conocida por sus siglas en inglés, BSA), leche en polvo o caseína, con una diminuta fracción de detergente, como Tween 20. Las proteínas en solución se unirán a todos aquellos lugares de unión de la membrana que no estén ya ocupados por las transferidas desde el gel. De este modo, el anticuerpo sólo podrá unirse a su antígeno específico, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos (Towbin *et al*., 1979).

Finalmente, en la detección se comprueba la presencia en la membrana de una determinada proteína. Para ello se emplea un anticuerpo específico contra ella unido a enzima que, en presencia de su sustrato, catalice una reacción colorimétrica (produce color). De esta forma, se hace patente la unión con el antígeno, la proteína, así como su localización. Un mecanismo de detección simple y rápida consiste en unir al anticuerpo secundario enzimas que catalicen la transformación de un sustrato soluble en un producto insoluble. De esta forma, en el posterior análisis quedará una mancha allí donde esté la proteína de interés.

Enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP) o una fosfatasa alcalina son válidas para este mecanismo (Kurien y Scofield, 2006).

Western Blotting se utiliza para identificar los antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos policlonales o monoclonales. Las proteínas se separan por SDS-PAGE y los antígenos se transfirió electroforéticamente a una membrana, un proceso que puede ser controlado por tinción reversible. Las proteínas transferidas se unen a la superficie de la membrana, proporcionando acceso a la reacción de inmunodetección. Después de que sitios de unión inespecíficos se bloquean, la membrana se sonda con el anticuerpo primario y se lava. Los complejos antígeno-anticuerpo se acoplaran a un anticuerpo secundario y se detectan utilizando sustratos cromogénicos apropiados o quimioluminiscente (Gallagher y Chakavarti, 2008).

2.5.3. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

La detección quimioluminiscente requiere la incubación de la membrana con un sustrato, que emitirá luminiscencia al ser expuesto al "reporter" que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida es captada por una película fotográfica o, más recientemente, por cámaras CCD, que toman una imagen digital del Western blotting. Se analiza la imagen por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantifica el resultado en términos de densidad óptica. Actualmente hay programas que permiten realizar análisis más profundos si se aplican ciertos estándares, como la obtención del peso molecular (Gallagher y Chakavarti, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

El sacha inchi fue proporcionado por la agencia cooperante (ONG – Perú Biodiverso), desde el departamento de San Martin – Perú, provincia Lamas (Categoría: silvestre.).

- Torta, obtenida como remanente de la extracción en frio de aceite de sacha inchi, procedente de INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) y tamizada en malla N° 10.
- Semilla procedente de INIA molida y tamizada en malla N° 10.

Los tratamientos térmicos a los que fueron sometidas las muestras utilizadas en el fraccionamiento electroforético de proteína se describen a continuación:

- Semilla procedente de INIA secada a 60 ºC por 4 horas en bandejas, molida artesanalmente y tamizada en malla N° 10.
- Semilla procedente de INIA tostada en pailas a 150 ºC por 30 segundos, luego molida artesanalmente y tamizada en malla N° 10.
- Semillas procedentes de con tostado casero, en sartén, molidas en mortero y tamizadas en malla N° 10

3.2. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (SIGMA ALDRICH)
- Albúmina sérica bovina – BSA (THERMO)
- Azul de bromofenol (SIGMA ALDRICH)
- Benzoil-DL-Arginina-Nitroanilide Hydrocloride (SIGMA ALDRICH)
- Estándar conteniendo albumina de suero bovino (THERMO)
- Carbonato de sodio - Na_2CO_3 (SIGMA ALDRICH)

- Coomassie – Bradford (THERMO)
- Cloruro de calcio - $CaCl_2$ (SIGMA ALDRICH)
- Cloruro de sodio – NaCl (SIGMA ALDRICH)
- Cloruro de potasio – KCl (SIGMA ALDRICH)
- Dimetil Sulfóxido (SIGMA ALDRICH)
- Reactivo de Folin Ciocalteu (MERCK)
- Fosfato dibasico de potasio - K_2HPO_4 (SIGMA ALDRICH)
- Fosfato monobásico de sodio - NaH_2PO_4 (SIGMA ALDRICH)
- Gelcode Blue Stain Reagent (THERMO)
- Glicina (SIGMA ALDRICH)
- Hexano - C_6H_{14} (MERCK)
- Hidróxido de sodio – NaOH (MERCK)
- PierceECL Western Blotting substrate (THERMO)
    - Detection reagent 2, luminal enhacer solution (Prod # 1859698)
    - Detection reagent 1, peroxide solution (Prod # 1859701)
- Kit Kodak Rayos X (Anexo 4)
    - Liquido fijador (KODAK)
    - Liquido revelador (KODAK)
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (THERMO)
- Mem Code reversible Protein stain Kit (THERMO)
- 2-Mercaptoethanol (SIGMA)
- Neutral red (SIGMA)
- Solución Alsever's (SIGMA)
- Sulfato de amonio (SIGMA)
- Tripsina porcina cristalina (tipo IX, SIGMA)
- TRIZMA – base (SIGMA)
- Per sulfato de amonio - APS (THERMO)
- Pierce anti-Ricin A Chain mouse monoclonal Antibody - RA999 - Prod # MA1-74225 (THERMO)
- Pierce Destain - Prod # 1858785 (THERMO)
- Pierce Réversible Stain - Prod # 1858784 (THERMO)
- Pierce Stain Eraser - Prod # 1858786 (THERMO)
- Proteína L peroxidasa conjugada (THERMO)
- Proteína G peroxidasa conjugada (THERMO)

- Sodium Dodecyl Sulfate – Lauryl - Sequanal Grade (THERMO)
- Suero de paciente alérgico a Maní cod. 274 Título >100 IgE (2 - Historia clínica convincente y el resultado positivo de la prueba)proveniente de "Food Allergy Research & Education"
- Suero de paciente alérgico a Soya cod. 587 Título 33.3 IgE (desafío positivo) proveniente de "Food Allergy Research & Education"
- Sulfato de cobre pentahidratado - $CuSO_4.5H_2O$ (SIGMA)
- Tartrato de Sodio (SIGMA)
- Tetra-methyl-ethylenediamine - TEMED (THERMO)

3.3. MATERIALES

- Bandejas de plástico: 20 x 8 x 5 cm.
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios
- Cassete para films de Rayos X
- Ependorfs
- Erlenmeyer de 10, 25, 50 y 250 ml.
- Films de Rayos X
- Fiolas y probetas de 10, 50, 250 y 1000 ml.
- Goteros de 1, 0.5 y 0.1 ml
- Micro pipetas de 5 ul, 10 ul, 20:200 ul y 100:1000 ul.
- Viales para micro pipetas
- Papel filtro
- Placas de 96 micro pozos
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Membranas de nitrocelulosa, 0.45 µm.
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcón de 15 y 50 ml.

3.4. EQUIPOS

- Agitador orbital
- Agitador magnético
- Balanzas analíticas y de precisión.

- Baño maría
- Cámara electroforética
- Campana extractora
- Centrífuga con sistema de refrigeración de 13000 RPM.
- Centrifuga de 1000 RPM.
- Equipo de captura de imágenes para electroforesis.
- Equipo de corrida de geles para Electroforesis
- Equipo de Sohxlet para análisis de grasas
- Estufa para determinación de humedad
- Lector de micropozos
- Mufla para prueba de cenizas
- Ph-metro
- Termoblock

3.5. ANÁLISIS FISICO QUIMICO

3.5.1. HUMEDAD.

Se colocó una muestra en un recipiente de aluminio y se secó en un horno calentado previamente hasta obtener peso constante (AOAC, 1990). Cada muestra se analizó por triplicado.

3.5.2. CENIZAS.

La muestra se incinero a 550ºC (AOAC, 1990). Cada muestra se analizó por duplicado.

3.5.3. GRASA.

Se determinó empleando el método Soxlet (AOAC, 1990). Cada muestra se analizó por duplicado.

3.5.4. PROTEÍNA SOLUBLE

Se determinó las proteínas solubles en los extractos de la actividad hemoaglutinante utilizando el método Bradford (1976) y se muestra en el Anexo A-1. Cada muestra fue convenientemente diluida y se analizó por duplicado.

Se determinó las proteínas solubles en los extractos para electroforesis SDS-PAGE utilizando el método Lowry *et al*. (1951) y se muestra en el Anexo A-2. Cada muestra fue convenientemente diluida y se analizó por duplicado.

3.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE TRIPSINA

La determinación de la actividad del inhibidor de tripsina se realizó en las muestras de semilla y torta de sacha inchi (véase Anexo A – 3). La extracción del inhibidor se realizara utilizando hidróxido de sodio (NaOH), por ser la forma más eficiente de extracción (Aliaga, 2001; Aliaga, 2007). Para cada muestra se realizaron tres extracciones del inhibidor y en cada muestra de extracción se medirá la actividad enzimática por duplicado.

3.7. DETERMINACION DE ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

Se determinó la actividad hemoaglutinante en semillas y torta de sacha inchi desgrasadas (ver Anexo A – 4). En la preparación de muestras y en la obtención de eritrocitos de conejo se siguió la metodología descrita por Gómez y Aragón (1986), citados por López *et al*. (2011), y en el esquema de diluciones seriadas se adaptó la metodología de Matson *et al*. (2005).

3.8. WESTERN BLOTTING

La unión de la Ig E a fracciones proteicas del sacha inchi en suero de pacientes alérgicos a maní y a soya, permite evaluar la reacción alérgica (reactividad cruzada). Se evaluó la presencia de alérgenos proteico, y la presencia de cadena A de ricina en las fracciones proteicas de semilla y torta de sacha inchi, utilizando la metodología de Western Blotting

adaptada de Dooper (2009). Esta metodología empieza con la preparación de la muestra, electroforesis, seguida de inmuno transferencia, bloqueo y detección (véase Anexo A – 5).

3.9. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La determinación de actividad del inhibidor de tripsina y de actividad de hemoaglutinante se realizó para conocer los niveles de anti-nutrientes. Los análisis proximales se realizaron para conocer previamente el contenido de proteína y grasa. Las corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE, fueron utilizadas en el Western Blotting (inmuno-trasferencias) para determinar las fracciones proteicas que presentan reacción alergénica en sueros de pacientes alérgicos a maní y a soya. Asimismo, se utilizó el Western blotting para conocer la ausencia/presencia de fracciones proteicas que reaccionen con el anticuerpo cadena A de ricina (véase Figura 7).

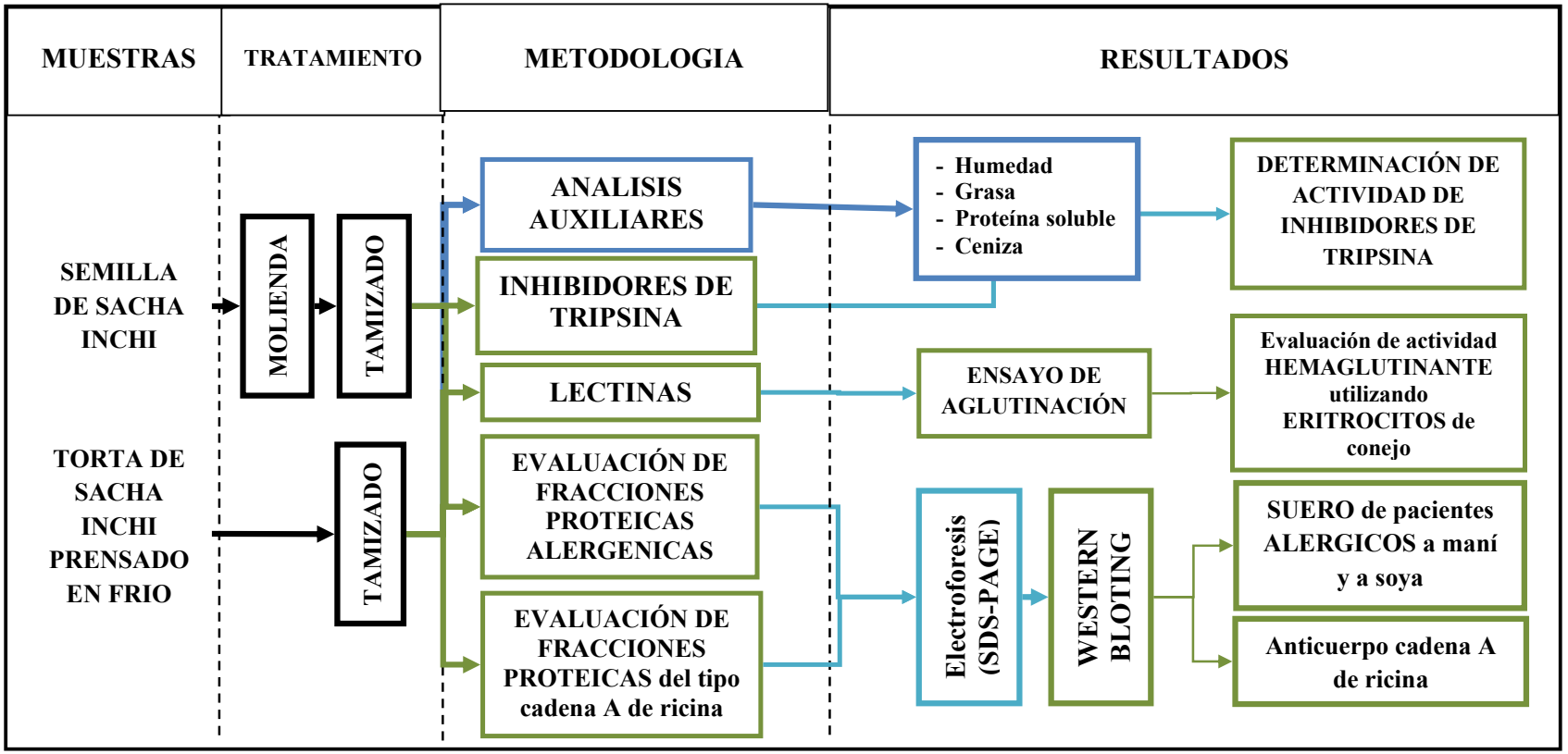


Figura 7: Procedimiento experimental seguido para evaluar los inhibidores de tripsina, lectinas, cadena A de ricina y alérgenos en torta y semilla de sacha inchi.

3.10. SENSIBILIZACION DE PACIENTE A SACHA INCHI

En los pacientes la sensibilización se da por un mecanismo mediado por IgE contra alérgenos. La existencia de cuadros producidos por la sensibilización a sacha inchi es recientemente conocido (Pita *et al*., 2004).

3.10.1. PRICK TEST

La prueba cutánea "Prick test", se realizó aplicando una gota del extracto de sacha inchi y soluciones control sobre la piel a una distancia mayor a 2 cm. con una lanceta descartable, que atraviesa la piel hasta la epidermis, luego de 15 minutos se retira el extracto y se observa la reacción de sensibilización. Metodología adaptada de Pepys (1975), citado por Morris (2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. COMPOSICION DE GRASA, HUMEDAD Y CENIZAS

En la Tabla 2 se observan el contenido de humedad (%), grasa total (%) y cenizas (%), presentes en semilla y torta de sacha inchi, así como en torta a 60ºC por 4 horas y semilla de sacha inchi tostada a 150ºC por 30 segundos.

Tabla 2: Contenido de humedad, grasa y cenizas en sacha inchi

	HUMEDAD b.h. (%)[(a)]	**GRASA b.h. (%)[(b)]**	**CENIZAS b.h.(%)[(b)]**
Semilla	6,66 % ± 0,31% [(c)]	49,14% ± 2,87 %	2,66% ± 0,01%
Torta	3,92 % ± 0,45%	16,28% ± 0,12%	3,50% ± 0,09 %

[(a)] Para el porcentaje de humedad, n=3. [(b)] Para el porcentaje de grasa y cenizas, n=2. [(c)] Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar.

El promedio de humedad de sacha inchi procedente de INIA fue de 6,66 % ± 0,31% y de torta fue de 3,92% ± 0,45%. El contenido de humedad obtenidos en semilla de sacha inchi fue ligeramente mayor al reportado por Sathe *et al*, (2012), quienes usando el mismo método en semillas provenientes de Cobiosa, Industrias Asociadas S.L. (Madrid), obtuvieron 6,46 ± 0,05 % de humedad. El contenido de humedad de semillas de sacha inchi (6,66 % ± 0,31%) se encuentra dentro del intervalo de 0-13% adecuado para el almacenamiento y el procesamiento sin degradación de microorganismos de los triacilgliceroles (James, 1995; citado por Gutiérrez *et al*., 2011).

El contenido de ceniza presentes en la semilla de sacha inchi fue de 2,66% ± 0,01%, mayor al 1,03 ± 0,06 % obtenido por Sathe *et al.* (2012), pero menor a los 4,0 % ± 0,07% reportados por Gutiérrez *et al*., 2011.

El contenido de grasa resulto 49,14% ± 2,87 % en semillas de sacha inchi, mayor al reportado por Gutiérrez et al. (2011), quien obtuvo 42,0 % ± 1,1 % de grasa en la extracción con hexano ligeramente más altos, pero no significativamente diferentes a los alcanzados usando cloroformo-metanol, lo que indica un bajo contenido de lípidos polares, tales como fosfolípidos (Gutiérrez *et al*., 2008; citados por Gutiérrez *et al*., 2011). El contenido de grasa obtenido en este estudio se encuentra dentro del intervalo de 35-60% reportado por Guillén *et al*. (2003) para el sacha inchi, superior al 34,42% obtenida por Bondioli y Della Bella (2006); citados por Gutiérrez *et al*. (2011), pero inferior a los reportados por Hamaker et al. (1992). Las diferencias en el contenido de aceite de las semillas podrían ser atribuidas a las diferentes subespecies, las condiciones geográficas y el clima, el tiempo de la cosecha de las semillas, así como el método de extracción (Yang y Kallio, 2002; citados por Gutiérrez *et al*. 2011).

Por otro lado, el tratamiento térmico disminuyó el contenido de humedad y aumento el contenido de grasa total. Los datos individuales no promediados se pueden ver en el Anexo B – 1.

4.2. ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Los resultados de actividad del inhibidor de tripsina (AIT) para las semillas y torta de sacha inchi se muestran en la Tabla 3, observándose en la Tabla 4 que el tratamiento térmico disminuyó la actividad de inhibidores de tripsina en las semillas y torta de sacha inchi con tratamiento térmico. Los datos individuales no promediados se observan en el Anexo B – 2.

Tabla 3: Actividad del inhibidor de tripsina en muestras sin desgrasar y sin tratamientos térmicos de sacha inchi

	UTI/mg (b.s.)[(a)]	UTI/mg (b.h.)[(a)]	MINIMO[(b)]	MAXIMO[(b)]
SEMILLA	29,83 ± 13,47 %	31,96 ± 13,47 %	16,63	41,88
TORTA	41,50 ± 10,03 %	43,19 ± 10,03 %	35,38	54,50

[(a)]UTI/mg (unidades de tripsina inhibida por mg de muestra) media ± desviación estándar, n=3. [(b)]Valor mínimo y máximo de UTI en base húmeda.

Tabla 4: Determinación de actividad de inhibidor de tripsina en muestras desgrasadas y con tratamientos térmicos en semilla y torta de sacha inchi

	UTI/mg (b.s.)[(a)]	UTI/mg (b.h.)[(a)]	MINIMO	MAXIMO
TORTA	32,43 ± 6,21	34,74 ± 6,21	27,3	42,24
SEMILLA	35,58 ± 11,71	37,73 ± 11,71	22,25	48,7
TORTA 60ºC	21,04 ± 2,26	21,9 ± 2,26	20,55	23,25
SEMILLA TOSTADA	2,78 ± 4,63	2,88 ± 4,63	=-0,4 = 0	6,15

[(a)]UTI/mg (unidades de tripsina inhibida por mg de muestra) media ± desviación estándar; para torta y semilla, n=4; para torta tratada a 60ºC y semilla tostada a 150ºC por 30 segundos, n=2. [(b)]Valor mínimo y máximo de UTI en base húmeda.

En la prueba de inhibidores de tripsina realizada a la soya (como control positivo) se obtuvo un rango más alto y variable (desde 125,375 – 817,5 UTI/mg), en comparación con el sacha inchi (desde 16,63 a 41,88 UTI/mg b.h.). En base seca se obtuvo 29,83 ± 13,47 % UTI/mg en sacha inchi, menor al 170,37 UTI/mg en soya reportado por Aliaga y Gómez (2007), quienes encontraron en la soya un rango de 137,76 a 184,81 UTI/mg de materia seca.

Los resultados de las muestras desgrasadas presentan menor variabilidad que las muestras sin desgrasar. La torta desgrasada presenta un promedio de 34,74 UTI/mg menor a la actividad inhibitoria de la semilla desgrasada cuyo promedio es de 37,73 UTI/mg. La torta presenta menor actividad inhibitoria de tripsina.

Bilbao *et al*. (2000), indica que en el frijol se observan incrementos aparentes de la actividad inhibitoria de tripsina entre el primero y último muestreo, aumentando en un año desde 6,04 ± 0,12 UTI/mg hasta 8,35 ± 0,25 UTI/mg. Mientras en la alverja, disminuyo desde 2,98 ± 0,12 UTI/mg hasta 2,13 ± 0,05 UTI/mg. Además, los valores medios de inhibidores de tripsina presentaron variaciones significativas en todo el año. La semilla (35,58 ± 11.71 UTI/mg de materia seca) presenta mayor contenido de actividad inhibitoria de tripsina que el frejol y la alverja.

En la presente investigación se probaron dos tratamientos térmicos por recomendación de Aliaga, quien indica que el tratamiento térmico disminuye los valores de UTI por miligramo de muestra. Es así, que la semilla tostada con cascara hasta llegar a una temperatura de 150ºC por 30 segundos, presento la disminución significativa de los inhibidores de tripsina, llegando hasta un valor de 0 UTI/mg. Esto indica que el proceso de tostado permite la destrucción efectiva de este anti nutriente. De modo similar el tratamiento térmico a la torta realizado en un secador de bandeja a 60ºC por 4 horas, disminuyo los inhibidores de tripsina hasta 20,55 UTI/mg. Además, el secado a 60ºC no modifico las cualidades sensoriales (color, olor y sabor) de la torta de sacha inchi, lo que si ocurrió en el tostado de semilla mostrando oscurecimiento del color, sabor amargo y olores desagradables.

Los inhibidores de tripsina por su propia naturaleza proteica pueden sufrir desnaturalización modificando su actividad. Bilbao *et al*. (2000) indica que el tiempo de cocción mínimo para el frijol es de 40 minutos y para la arveja es de 20 minutos. Asimismo, existen evidencias que los inhibidores presentes en frijol negro (*P. vulgaris*) pueden ser eliminados en un 80 % a los 9 minutos de cocción (Bonilla *et al*., 1991; citados por Bilbao *et al*., 2000).

Bilbao *et al*. (2000), logro disminuir los inhibidores de tripsina hasta un rango no detectable en granos remojados por 12 horas, cocinados en una olla a presión (121ºC) durante 30 minutos el frijol y 20 minutos la arveja.

Estudios realizados por Egbe y Akinyele (1990); citados por Bilbao *et al*. (2000), en el frijol de lima indicaron la disminución total de los inhibidores de tripsina después de la cocción. Bishoi y Khetarpaul (1994); citados por Bilbao *et al*. (2000), obtuvieron resultados similares en diferentes variedades de arveja. En la presente investigación un tostado severo disminuye totalmente los inhibidores de tripsina en el sacha inchi.

4.3. ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

La actividad hemo-aglutinante promedio en extractos crudos de proteínas tipo lectinas de sacha inchi, se observa en el Tabla 5, mientras los valores no promediados se pueden ver en el Anexo B - 3. La torta de sacha inchi prensada en frio presento aglutinación (hasta la

dilución 1/32), menor a la semilla de sacha inchi sin ningún tratamiento (hasta la dilución 1/64).

Calderón *et al.* (2000), reporto que la pasta de soya (Gamesa, S.A.) con un tamaño de partícula semejante al de una harina comercial, con una concentración de proteína 46,3%, presenta actividad hemoaglutinante hasta en la dilución 1/64. También reporto una fracción hidrolizada 10 kDa< F1, con actividad hemoaglutinante de 1/32, mientras las fracciones hidrolizadas 3<F2<10 kDa y 0.5<F3<3 kDa, no presentaron hemaglutinación. La actividad hemoaglutinante se perdió por completo en todas las fracciones restantes (menores de 10 kDa).

4.3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN EXTRACTOS PARA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LECTINAS

Tabla 5: Proteína soluble en la dilución hemoaglutinante de sacha inchi

	Ultima dilución hemoaglutinante[(a)]	Concentración promedio de proteína soluble (µg/ml)[(b)]
TORTA	**1/32**	120,26 ± 23,63
SEMILLA	**1/64**	50,35 ± 1,90
RICIN	**1/4**	107,59 ± 0,04
SOYA	**1/32**	1644,35 ± 0,07

[(a)] Ultima dilución hemoaglutinante expresada en moda por ser una prueba cualitativa, n=3. [(b)] Concentración de proteína soluble en ultima dilución que presento hemoaglutinación (media ± desviación estándar).

La mínima cantidad hemoaglutinante en extracto crudo de torta de sacha inchi se observó cuando las proteínas solubles en los extractos eran de 145, 72; 99,03 y 116,02 µg/ml. En semilla la mínima cantidad hemoaglutinante en extracto crudo se observa cuando las proteínas solubles son 49,01; 218,06 y 51,69 µg/ml.

En semillas de *ricinus* la mínima actividad hemaglutinante en extracto crudo fue a 729,25 µg/ml de proteína soluble. En soya la mínima actividad hemaglutinante 215,34 µg/ml de proteína soluble.

Barca *et al.* (1991), analizaron el contenido de lectina de soja natural y procesada. Encontrando los niveles más altos de lectina en soja cruda (3 600 mg / g) y el más bajo (3,75 a 12,92 g / g) en los productos de proteína de soya texturizada. Como era de esperar, los niveles de actividad de lectina de soja dependían de procesamiento térmico (Silva y Silva, 2000)

Tabla 6: Actividad Hemaglutinante

Muestras	**Actividad hemoaglutinante**[(a)]
TORTA	5
SEMILLA	6
RICIN	2
SOYA	5

[(a)] Los resultados se expresaron como el: $-\log_2$ (última dilución aglutinante). Se consideró como resultado en cada muestra la moda de las repeticiones.

El sacha inchi presento mayor actividad hemoaglutinante que las semillas de ricina, y que la soya (véase Tabla 6). Siendo la soya una de las semillas con mayor diluciones necesarias para aglutinar soluciones de eritrocitos al 3%, se encontró actividad hemoaglutinante en la dilución 1/32, menor al reportado por Calderón *et al.* (2000), quienes encontraron actividad hemoaglutinante en la dilución 1/64.

Bilbao *et al*. (2000), indica que la actividad hemoaglutinante de las lectinas varia con el tiempo de almacenamiento, disminuyendo la actividad hemoaglutinante de la arveja en un año desde la dilución 1/32 hasta 1/4. Debido a esto se debe considerar el tiempo de almacenamiento de las semillas en estudio. Asimismo, se presentó disminución de actividad hemoaglutinante en la torta de sacha inchi, suponiendo que el tratamiento de prensado en frio modifica la actividad hemoaglutinante.

Bilbao *et al*. (2000), logro eliminar lectinas usando tratamientos caseros en granos remojados por 12 horas, cocinados en una olla a presión (121ºC) durante 30 minutos el frijol y 20 minutos la arveja.

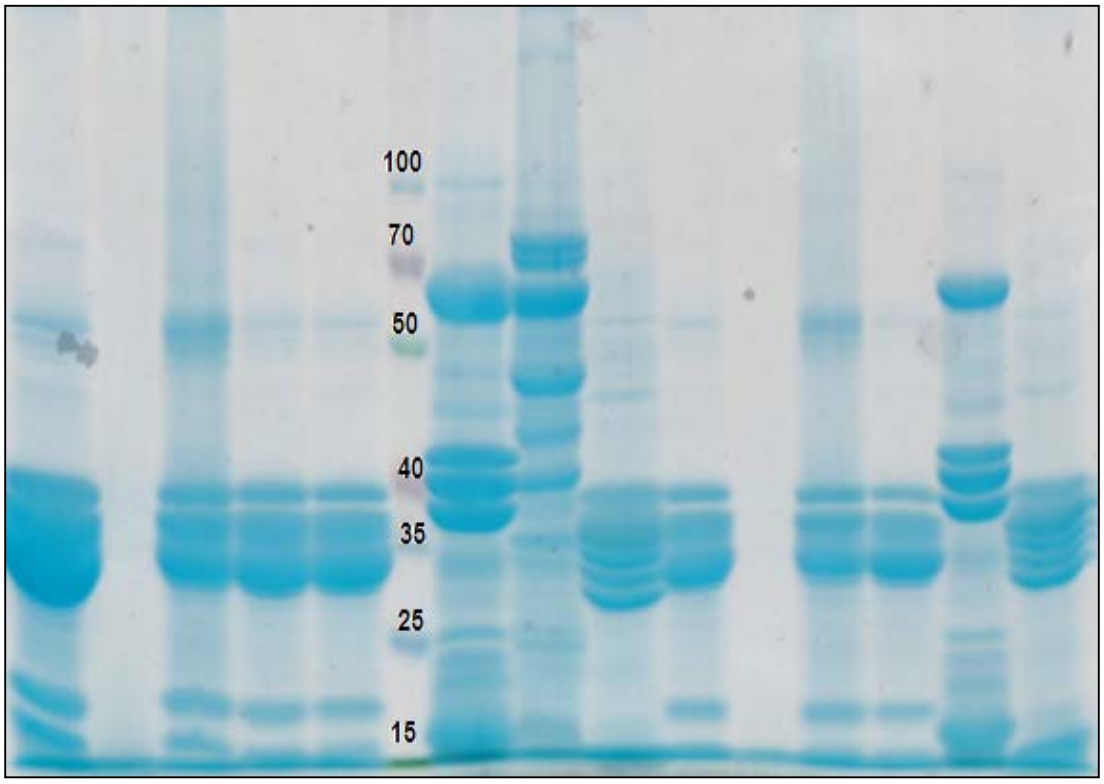
4.4. FRACCIONES ELECTROFORÉTICAS DE SACHA INCHI

En los geles SDS-PAGE (Figura 8), se observa bandas de fracciones proteicas correspondientes a los pesos moleculares de 12, 15, 17, 32, 35, 38 ~ kDa y bandas proteicas de menor intensidad a 52 ~ kDa en semilla y torta de sacha inchi, agrupándose en dos sectores de 12 – 17 y de 32 – 38 KDa. Hay que resaltar que en el carril (2) de la semilla tostada a 150ºC por 30 segundos, no se observa bandas de fracciones proteicas debido a que el tratamiento térmico fue extremo, porque degrado las proteínas.

En maní se observan bandas de fracciones proteicas correspondientes a los pesos moleculares de 12, 15, 18, 20, 22, 25, 32, 37, 40, 42, 58, 60 y 63 ~kDa, y bandas proteicas de menor intensidad a 30, 45, 48 y 100 ~kDa. Estos con los mismo pesos moleculares reportados por Dooper (2009), quien encontró bandas en maní a 18 kDa, 20 kDa, 40 kDa, 44 kDa, 45 kDa y 63 kDa, indicando que su unidad poli peptídicas básica es a 20 kDa.

En tarwi se observan bandas a los pesos moleculares de 25, 32, 40, 43, 48, 60, 63, 70 y 72 ~kDa y bandas proteicas de menor intensidad a 23, 35, 37 y 50 ~kDa.

Mientras, que en *ricinus communis* se observan bandas a los pesos moleculares de 10, 12, 30, 32, 35, 37, 38 y 40 ~kDa y bandas proteicas de menor intensidad a 47 y 55 ~kDa. Es notorio ver que las fracciones proteicas de ricina se agrupan en dos sectores de 10- 12 y de 30 – 40 KDa, semejantes a los pesos moleculares del sacha inchi.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	7	9

Figura 8: Fraccionamiento electroforético de proteínas de (1) Sacha inchi, (2) Semilla de sacha inchi tostada a 150 por 30 segundos, (3) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (4) Semilla de sacha inchi secada a 60ºc por 4 horas, (5) Torta de sacha inchi, (6) Marcador de peso molecular, (7) Maní. (8) Tarwi y (9) Ricin.

No se observa fraccionamiento proteico en las semillas tostadas de sacha inchi a 150 ºC por 30 segundos, porque este tratamiento térmico fue muy extremo degradando proteínas e impidiendo observar bandas de fracciones proteicas durante la electroforesis. Sin embargo el tostado moderado o casero, si permite observar los mismos pesos moleculares que la semilla sin tratamiento térmico, es decir un tratamiento térmico moderado al sacha inchi permite conservar sus fracciones electroforéticas.

En la Figura 9 se observa las fracciones proteicas del sacha inchi, caracterizándose por polipéptidos principalmente de dos especies moleculares, de 10-15 y de 32-37 kDa, tal como lo indica Bueso *et al*. (2010).

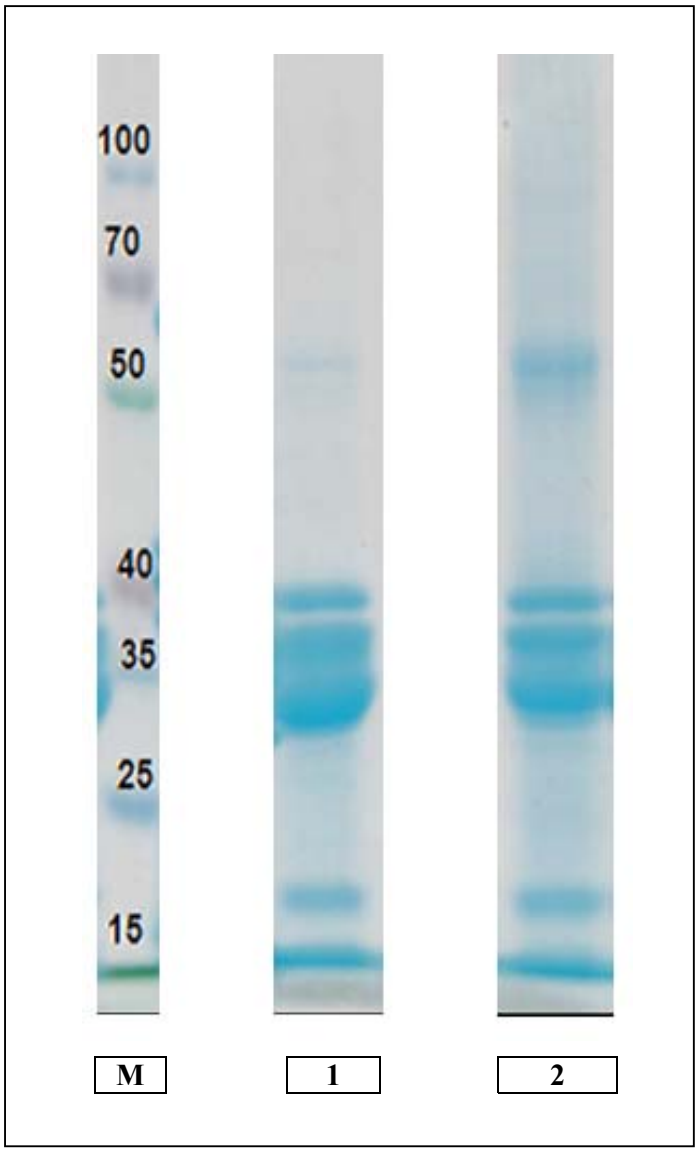


Figura 9: Fraccionamiento electroforético de proteínas. (M) Marcador de pesos moleculares. (1) Semilla de sacha inchi. (2) Torta de saha inchi

4.4.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY EN EXTRACTOS DE ELECTROFORESIS

Se determinó proteína soluble en muestras de semillas y torta de sacha inchi mediante el método de Lowry con rango de 0 a 1 mg/ml (Ver Anexo B – 4). Los resultados promedios obtenidos se observan en el Tabla 7.

Tabla 7: Cantidad de proteína en extractos para electroforesis

MUESTRAS	SEMILLA	TORTA	SEMILLA TOSTADO CASERO	TARWI	MANI	SEMILLA 60 X 4 H.	RICINA	SEMILLA TOSTADA 150ºC X 30 SEG.
Muestra (mg) en 5 ml de Buffer muestra [(a)]	126,52	53,23	126,52	70,54	105,93	126,52	156,25	100,81
Proteína soluble en extractos (mg/ml) [(b)]	2,23 ± 0,28	1,24 ± 0,08	0,20 ± 0,01	3,64 ± 0,24	2,12 ± 0,15	3,30 ± 0,55	2,46 ± 0,23	1,11 ± 0,38
Proteína soluble (µg) en 20 µl de extracto[(c)]	44,53	24,82	3,97	72,81	42,39	66,10	49,24	22,11

[(a)] Muestra en miligramos extraído en 5 mililitros de buffer de muestra modificado, equivalente a 125 miligramos de proteína total en 20 micro litros de buffer muestra, para determinar las proteínas solubles en los extractos electroforéticos. [(b)] Proteína soluble determinada por el método de Lowry (media ± desviación estándar). [(c)] Proteína soluble (µg) en 20 micro litros, equivalente al contenido cargado en cada micro pozo de los geles SDS-PAGE.

4.5. PRESENCIA DE CADENA A DE RICINA EN SACHA INCHI

En las Figuras 10, 11, 12 y 13 el anticuerpo cadena A de ricina reconoce epítopes en las fracciones proteicas de 30 a 32 KDa de semilla y torta de sacha inchi, así como en los tratamientos de sacha inchi a 60º por 4 horas y semilla de sacha inchi con tostado casero, pero con menor nitidez que en la semilla sin tratamiento, lo que sugiere que este péptidos disminuye con el tostado.

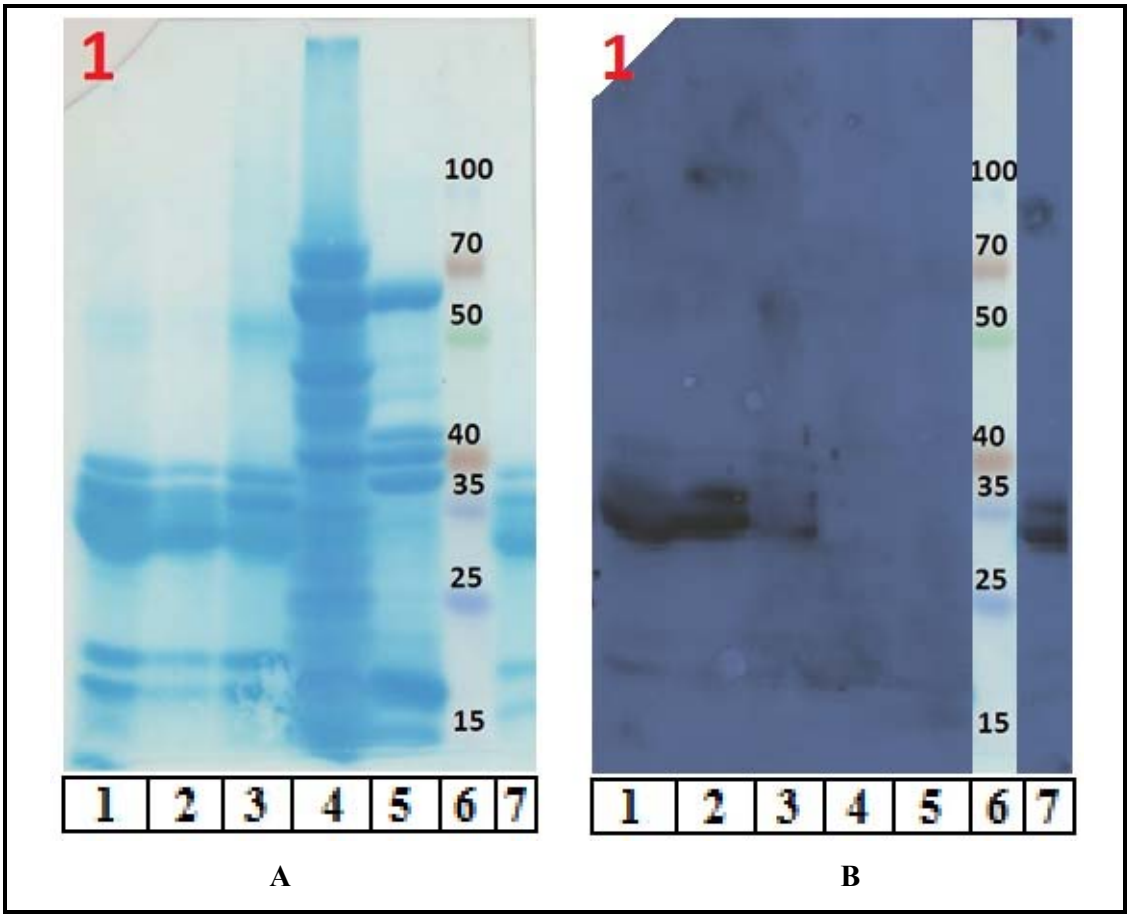


Figura 10: Resultado del inmunoblotting usando anticuerpo cadena A de ricina con 4 minutos de exposición. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting. (1) Sacha inchi, (2) Torta de sacha inchi, (3) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (4) Tarwi, (5) Maní, (6) Marcador de Pesos Moleculares y (7) Sacha inchi secada a 60ºC por 4 horas

Puesto que un antígeno puede presentar un número variable de epítopes de estructura única o repetitiva y la complejidad estructural de las proteínas favorecen que éstas presenten por lo general un número elevado de epítopes distintos, se observa que la reacción quimio luminiscente está presente.

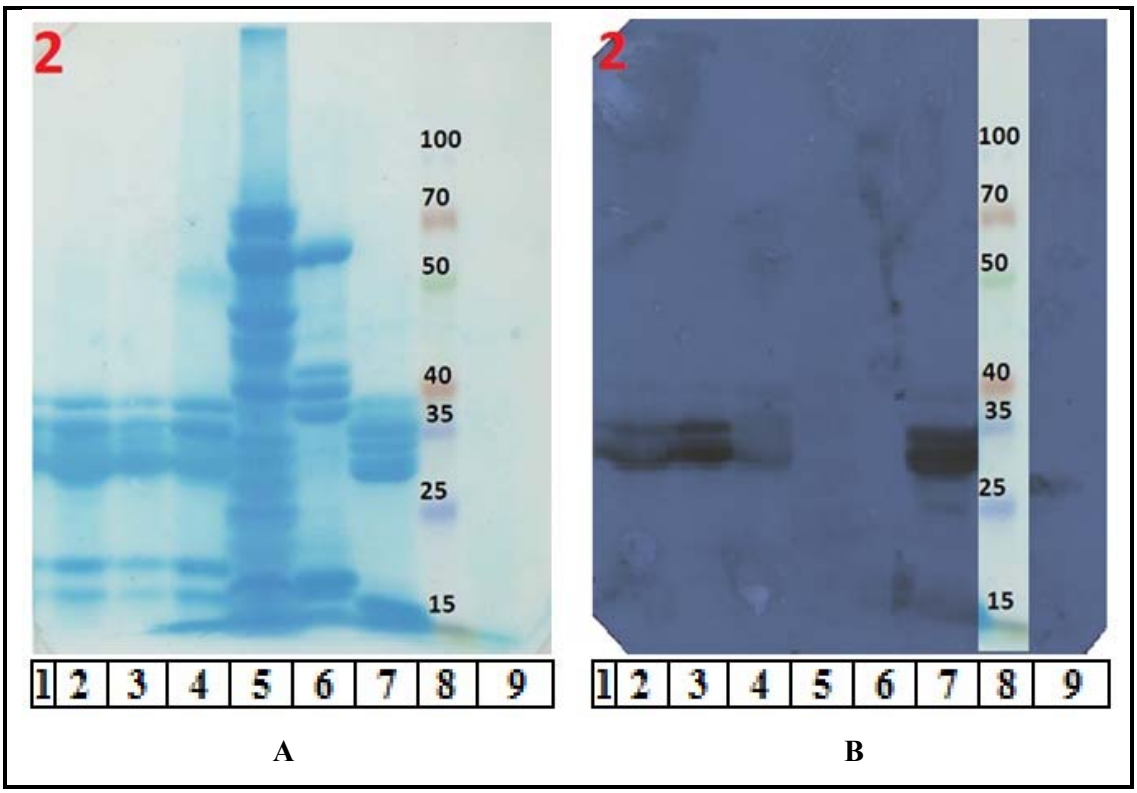


Figura 11: Resultado del inmunoblotting usando anticuerpo cadena A de ricina con 4 minutos de exposición. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting (Film con 4 minutos de exposición luminiscente). (1) Semilla de sacha inchi secada a 60ºc por 4 horas, (2) Sacha inchi, (3) Torta de sacha inchi, (4) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (5) Tarwi, (6) Maní, (7) Ricina, (8) Marcador de peso molecular y (9) Semilla tostada de sacha inchi. Incluyendo control positivo de ricina.

Es notorio que las bandas de fracciones proteicas más resaltantes del *ricinus communis* se encuentran entre los pesos moleculares de 30 a 38 ~kDa, semejándose a los pesos moleculares de sacha inchi de 32 a 37 kDa.

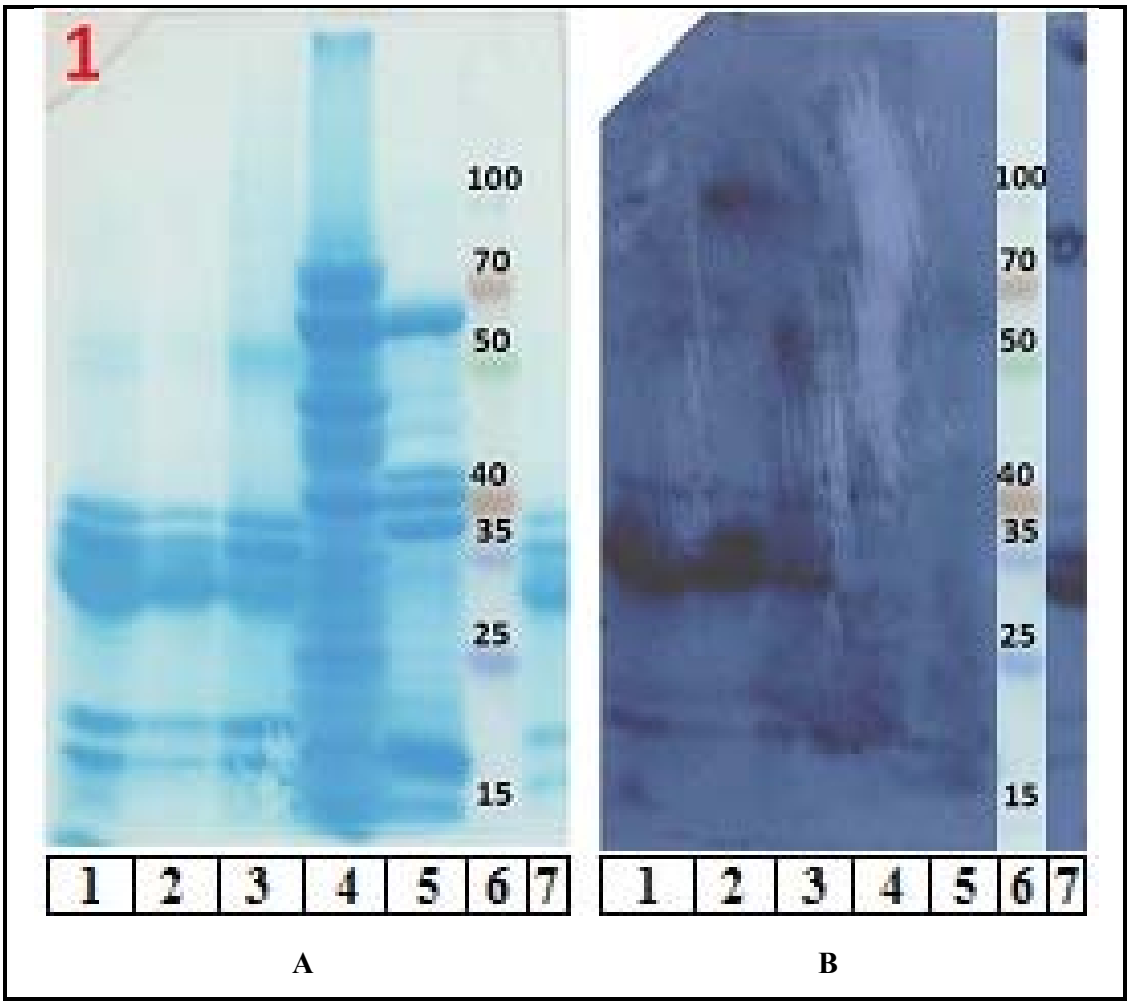


Figura 12: Resultado del inmunoblotting usando anticuerpo cadena A de ricina con 15 minutos de exposición. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting (Film con 15 minutos de exposición luminiscente). (1) Sacha inchi, (2) Torta de sacha inchi, (3) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (4) Tarwi, (5) Maní, (6) Marcador de Pesos Moleculares y (7) Semilla de sacha inchi secada a 60°c por 4 horas

El tiempo de exposición luminiscente de 15 minutos aumenta la nitidez de las fracciones proteicas que reaccionan con el anticuerpo cadena A de ricina, aunque a 4 minutos se observa la reacción a 15 minutos se observa mejor. La reacción en las fracciones proteicas de la semillas de ricino es más nítida que en las semillas de sacha inchi.

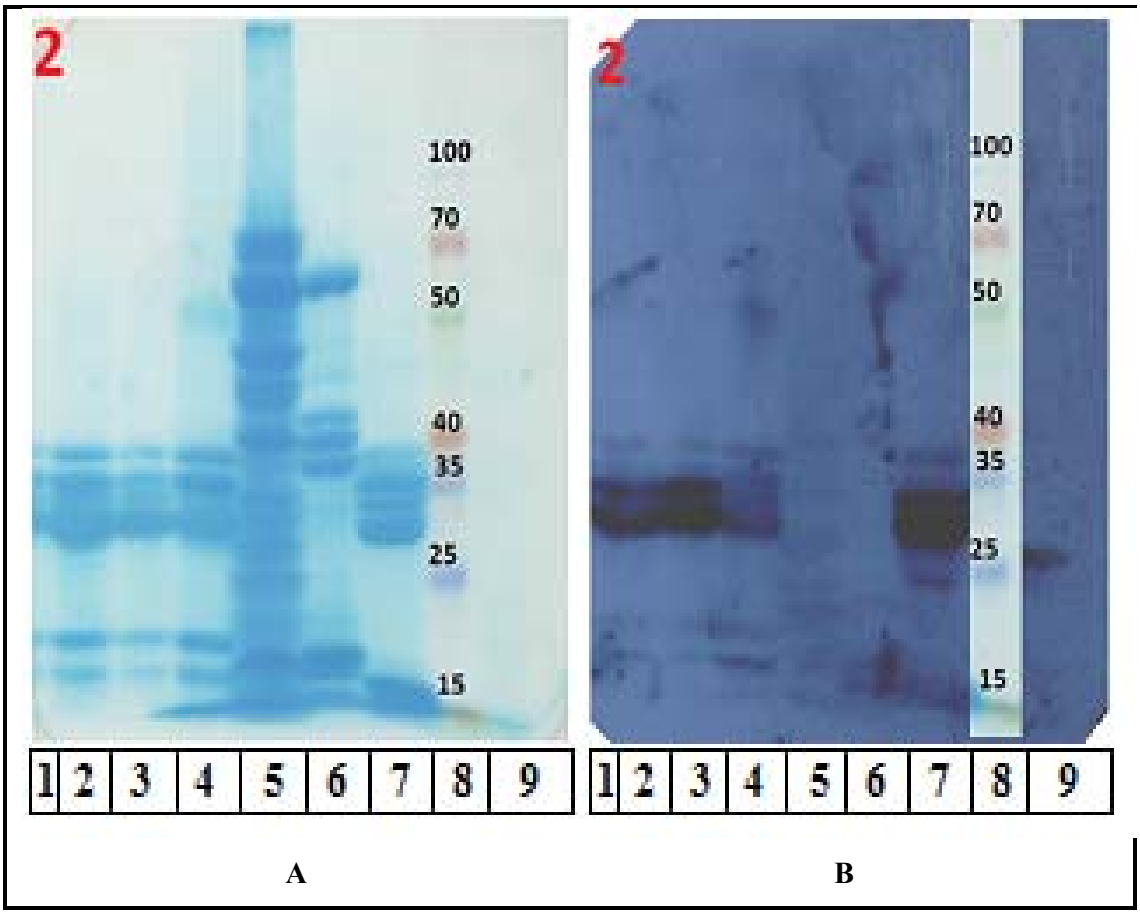


Figura 13: Resultado del inmunoblotting usando anticuerpo cadena A de ricina con 15 minutos de exposición. Incluyendo control, positivo de ricina. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting (Film con 15 minutos de exposición luminiscente) de (1) Semilla de sacha inchi secada a 60ºc por 4 horas, (2) Sacha inchi, (3) Torta de sacha inchi, (4) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (5) Tarwi, (6) Maní, (7) Ricina, (8) Marcador de peso molecular y (9) Semilla tostada de sacha inchi a 150ºC por 30 segundos.

No hubo reacción en las fracciones proteicas del maní ni en las del tarwi con el anticuerpo de la cadena de ricina A.

Sin embargo, la reacción positiva entre un epítopo de 30 KDa con el anticuerpo cadena A de ricina no significa necesariamente que la semilla de sacha inchi sea toxica, puesto que para ser toxica se requiere de la presencia de una lectina de 30 KDa, llamada cadena B.

Solo la unión de ambos monómeros mediante un puente disulfuro forman la toxina ricina (Capó, 2007). Por esto se recomienda pruebas posteriores para identificar la toxicidad de ricina.

Una de las funciones de la cadena B es permitir que la cadena A tenga rápido acceso al citoplasma. La inyección en ratones de una cadena de ricina A no toxica, seguida 4 – 8 horas por la inyección de la cadena B de ricina no toxica, produce la muerte inducida por ricina, por consiguiente la cadena B de ricina juega un papel activo en la potenciación de la actividad toxica de la cadena A de ricina.

La ricina está constituida por una cadena A (RTA), de 267 aminoácidos y 30-32 kDa, unida por un puente disulfuro a una cadena B (RTB), de 262 aminoácidos y 32-34 kDa. La RTA puede inhibir la síntesis de proteínas al tener actividad enzimática de N-glicosidasa (ARNr Nglicosilasa, ARNr N-glicosidasa), hidrolizando el enlace N-glicosídico entre una adenina y una ribosa del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 28 S de las células eucariotas (Pita *et al*., 2004)

Por otro lado, el tostado casero reacciono en el inmunoblotting con el anticuerpo cadena A de ricina, pero con menor nitidez que la semilla de sacha inchi sin tratamiento. Aun cuando en los geles SDS-PAGE se observan mejor las bandas de fracciones proteicas de semilla con tostado casero (Figura 10, carril 3) respecto a la semilla sin tratamiento térmico (Figura 10, carril 1).

Burrows y Renner., 1999; citados por Pita, *et al.*, 2004, recomiendan realizar un tratamiento térmico a 80 ºC por 10 minutos o a 50 ºC durante 1 hora para detoxificar la toxina.

4.6. REACTIVIDAD CRUZADA DE FRACCIONES PROTEICAS EN SACHA INCHI CON IgE DE PACIENTES ALERGICOS A SOYA

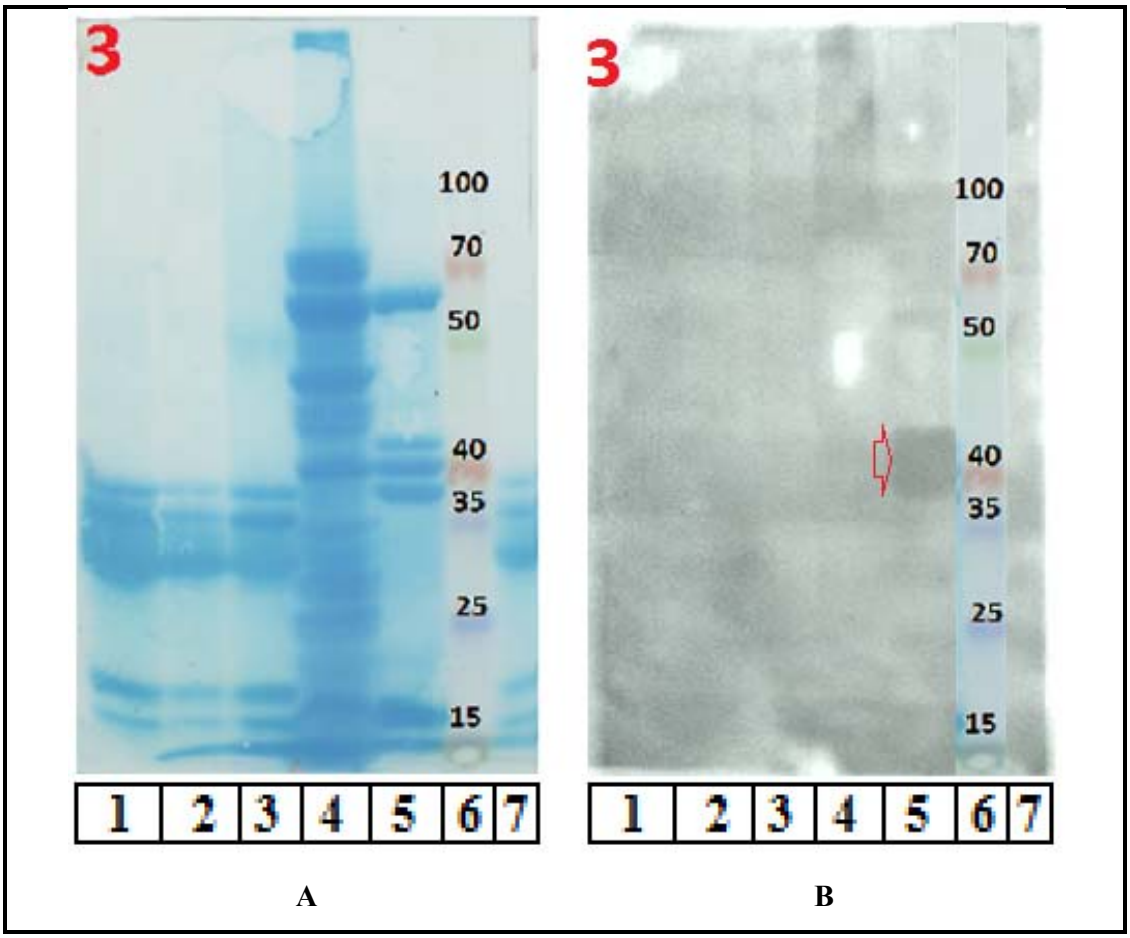


Figura 14: Resultado del inmunoblotting usando sueros con 30 segundos de exposición. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting (usando suero de paciente alérgico a Soya cod. 587 Título 33.3 IgE). (1) Sacha inchi, (2) Torta de sacha inchi, (3) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (4) Tarwi, (5) Maní, (6) Marcador de Pesos Moleculares y (7) Semilla de sacha inchi secada a 60ºc por 4 horas. Film con 30 segundos de exposición luminiscente.

En inmunoblotting del paciente con alergias a soya (Figura 14) se observó que el paciente con 33.3 IgE (desafío positivo), presento reactividad cruzada IgE con el maní a 38, 40 y 42 KDa, aproximadamente. No se observó reacción alérgica con las semillas o torta de sacha

inchi, ni con el tarwi. Aunque se esperaba alguna reacción de las fracciones proteicas del tarwi con las de soya, no se observó ninguna.

4.7. REACTIVIDAD CRUZADA DE FRACCIONES PROTEICAS EN SACHA INCHI CON IgE DE PACIENTES ALERGICOS A MANI

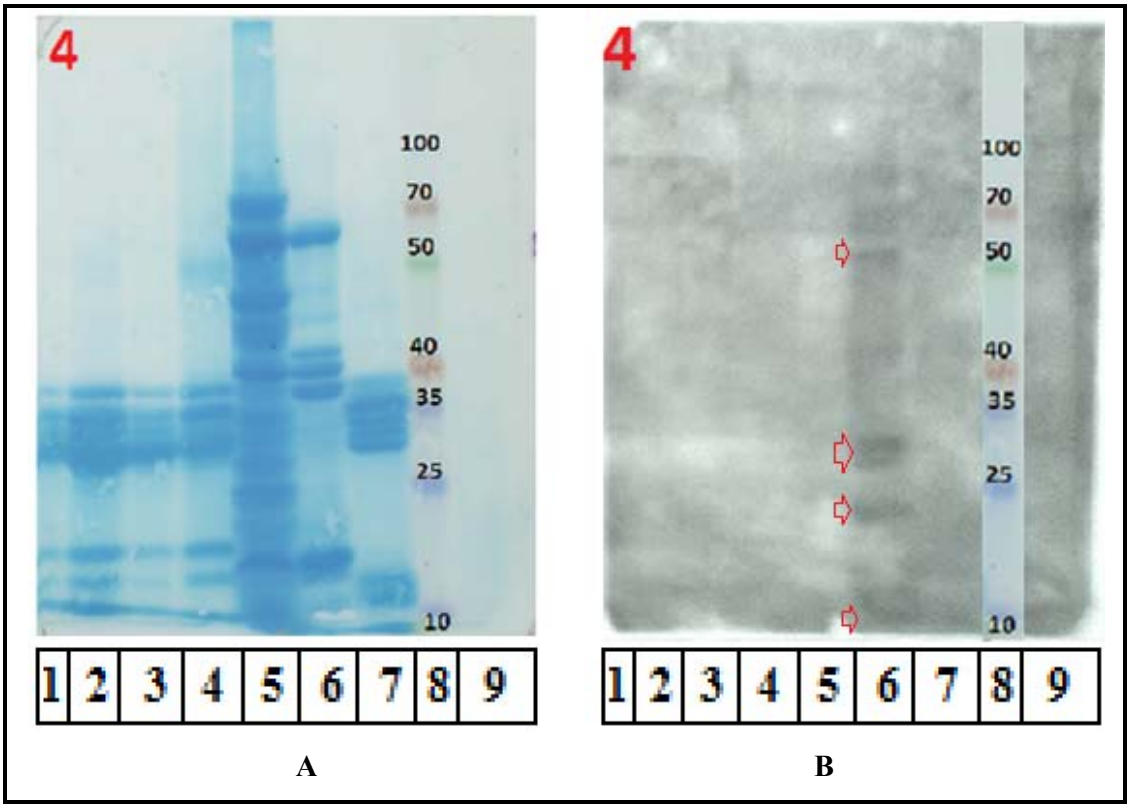


Figura 15: Resultado del inmunoblotting usando sueros con 30 segundos de exposición. A) Membrana nitrocelulosa con transferencia de proteínas y B) Immunoblotting (usando suero de paciente alérgico a Maní cod. 274 Título>100 IgE). (1) Semilla de sacha inchi secada a 60ºc por 4 horas, (2) Sacha inchi, (3) Torta de sacha inchi, (4) Semilla de sacha inchi con tostado casero, (5) Tarwi, (6) Maní, (7) Ricin, (8) Marcador de peso molecular y (9) Semilla tostada de sacha inchi a 150ºC por 30 segundos. Film con 30 segundos de exposición luminiscente.

En la Figura 15 se observa que el paciente con >100 IgE (2 - Historia clínica convincente y el resultado positivo de la prueba), presento reacción alérgica con las fracciones proteicas

de maní correspondientes a 10, 12, 20, 22, 27, 29, 30 y 59 KDa, aproximadamente. Dooper (2009), en inmuno-transferencia utilizando proteínas desnaturalizadas, presento la unión de IgE a proteína de maní en las fracciones proteicas correspondientes a 63 kDa (denominada Ara h 1), 18 kDa y 20 kDa (denominada Ara h 2) y 40 kDa, 44 kDa, y 45 kDa (denominada Ara h 3). Coincidiendo en la fracción proteica de peso molecular de 20 kDa, denominadas Ara h 2, del paciente alérgico a Maní código 274 Título>100 IgE.

No se observó reacción alérgica con las semillas o torta de sacha inchi, ni con el tarwi. Estos film se observaron a tras luz pues la reacción de quimioluminiscencia fue muy fuerte, provocando film más oscuros mientras se mantiene a más tiempo de exposición.

Se debe tener en cuenta que se emplearon las inmunoglubulinas E presentes en el suero, aunque estas son menos específicas que los anticuerpos monoclonales, son de utilidad para determinar los antígenos. Sin embargo, debido a que la fracción de inmunoglobulinas del antisuero contiene una multitud de anticuerpos dirigidos a una amplia variedad de antígenos divergentes se observaron film más oscuros.

4.8. CASO DE SENSIBILIZACION A TORTA Y SEMILLA DE SACHA INCHI

Se usaron los sueros donados del instituto "Food Allergy Research & Education", por presentar las Ig E aisladas, facilitando la metodología Western Blotting. Sin embargo, se debe reportar un caso de alergenicidad a sacha inchi en un trabajador de la Universidad Nacional Agraria, al cual se le realizó la prueba cutánea (Prick test), resultados que se puede ver en el Anexo B – 6. El resultado fue positivo para la prueba de semilla, torta y cascara de sacha inchi, pero no para el aceite de sacha inchi. Considerando la prueba cutánea a alergia con resultados positivos para torta de sacha inchi, más lo reportado por Bueso *et al*., (2010) quien analizó fracciones proteicas de sacha inchi por IgE-inmunotrasferencia con suero de un paciente alérgico a sacha inchi y observo que causaron reacción alérgica, hace comprender que la reacción alérgica es causada por las proteínas presentes en el sacha inchi. El contenido de proteína en el aceite no es significativo, pues las proteínas se quedan en la torta luego de la extracción del aceite.

V. CONCLUSIONES

- La semilla de sacha inchi presenta actividad de inhibidores de tripsina y actividad hemoaglutinante moderada, indicando la presencia de estos anti nutrientes proteicos.

- La actividad de inhibidores de tripsina en sacha inchi sin tratamiento resulto ser menor al de la soya, disminuyendo considerablemente con el tratamiento térmico, llegando incluso a eliminarse con el tostado.

- El tostado a 150ºC por 30 segundos disminuye los inhibidores de tripsina; sin embargo, es un tratamiento térmico extremo que afecta las características sensoriales de color, olor y sabor.

- La actividad hemoaglutinante en sacha inchi es semejante a la soya, pero mayor a la actividad de ricin.

- Las fracciones proteicas del sacha inchi no presentaron reactividad cruzada con los sueros de pacientes alérgicos a maní ni a soya.

- Se observó que el anticuerpo cadena A de ricina reconoce epítopes en las fracciones proteicas de 30 a 32 KDa de semilla y torta de sacha inchi. Sin embargo, la presencia de este péptido no significa necesariamente que el sacha inchi sea toxico, pues se reportó que la cadena A de ricina por sí sola no es toxica.

- Se confirmó que para el caso clínico de un paciente sensibilizado al sacha inchi, la reacción alérgica está asociada a la presencia de proteínas de sacha inchi, ya que se encuentro ausente en el aceite.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudiar diferentes temperaturas de tostado o de otro tratamiento térmico que permitan conocer la combinación optima de temperatura-tiempo necesaria para la eliminación de inhibidores de tripsina y lectinas del sacha inchi.

- Se recomienda seguir tratamientos caseros, tales como el tostado, para disminuir y/o eliminar inhibidores de tripsina en sacha inchi.

- Se recomienda examinar la actividad toxica en el sacha inchi asociada a la presencia de la toxina ricina activa (interacción cadena A + cadena B), es decir, se debe buscar un método que detecte la actividad de ricina como inhibitoria de la síntesis de proteínas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALIAGA, P. y GÓMEZ, B. (2007). Efecto del desgrasado sobre la actividad del inhibidor de tripsina en raíces de camote. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Anales científicos UNALM 68(2), 2007. Lima-Perú.

2. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemist. Agriculture chemical; Contaminants; Drugs. Vol. 1 and 2. Virginia, EEUU.

3. ARANGO, G. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Colombia.

4. BARRÓN, H. J. M. (1984). Textural, Nutritional and Toxicological Qualities of Pinto Bean Phaseolus vulgaris (UI-III). Ph.D. Thesis. Queen Elizabeth Collage. University of London, London, UK.

5. BASHIR, M.E.H.; HUBATSCH, I.; LEINENBACH, H.P.; ZEPPEZAUER, M.; PANZANI, R.C.; HUSSEIN, I.H. (1998). Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of Ricinus communis: complete primary structures and phylogenetic relationships. Int Arch Allergy Immnunol 115: 73-82.

6. BELMAR, R. y NAVA, R. (2007). Factores anti nutricionales en la alimentación de animales mono gástricos. Universidad autónoma de Yucatán y centro Regional universitario península de Yucatán. Universidad Autónoma chapingo. México.. Consultado el 12 de marzo del 2013. Disponible en: http://www.sian.info.ve/ porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.htm.

7. BILBAO R., T.; HAMPE A., S.; ADDAE S., R.; PUERTA G., F. y LEDESMA R., L. (2000). Ocurrencia de Tóxicos Naturales en frijol colorado (Phaseolus vulgaris) Y ARVEJA (Pisum sativum). Efecto del tiempo de almacenamiento y los tratamientos caseros. de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.53, No.1. p. 901-912.

8. BOYD, W.C. y SHAPLEIGH, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). Science Mar 26; 119: 419

9. BRACK, A. (1999). Plukenetia volubilis L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú. pp. 550

10. BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

11. BREESE, D. (1947). Proteins of Castor Bean – Their Preparation, Properties and Utilization. The Journal of the American Oil Chemists' Society, July, 1947. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. E.E.U.U.

12. BUESO, A., RODRÍGUEZ-PÉREZ, R., RODRÍGUEZ, M., DIONICIO, J., PÉREZ-PIMIENTO, A. y CABALLERO, M.L. (2010). Occupational allergic rhinoconjunctivitis and bronchial asthma induced by Plukenetia volubilis seeds. Occupational and Environmental Medicine 67(11):797-798.

13. CALDERÓN, A.M; WALL, A.; JARA, M.; AARÓN F. CÓRDOVA, G.; Y RUÍZ, A. (2000). Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. Dirección de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México, ALAN v.50 n.1 Caracas mar. 2000. Consultado el 03 de agosto del 2013. Disponible en: http://www.scielo.org. ve/scielo.php?pid=S0004-06222000000100003&script=sci_arttext

14. CAPÓ, M.A. (2007). Toxinología clínica, alimentaria y animal. Premio U. C. M. de investigación 2006. Línea 3000. pp. 87. Editorial Complutense S. A. España.

15. CASTAÑEDA, B.; MANRIQUE, R.; GAMARRA, F.; MUÑOZ, A. Y RAMOS, F. (2009). Formulación y elaboración preliminar de un yogurt mediante sustitución parcial con harina de tarwi (lupinus mutabilis Sweet). Medicina Naturista, 2009, vol. 3 – Nº º. 2-9. Universidad de San Martin de Porres. Lima – Perú.

16. CELIS, A. (2007). Calidad betweenas de soya mexicanas y su relación con el síndrome de transito rápido en pollos de engorda. Colima: México, 2000, 57p. Tesis (Maestría en ciencias pecuarias). Universidad de colima. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Postgrado interinstitucional en ciencias pecuarias

17. CARDONA, V. y GUILARTE, M. (2007). Alergia a alimentos. Revista Española de Enfermedades Digestivas, v.99 n.3 Madrid mar. 2007. Consultado el 04 de setiembre del 2013. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-01082007000300011&script= sci_arttext

18. DOOPER, M.M.; PLASSEN, C.; HOLDEN, L.; LINDVIK, H. Y FÆSTE, C.K. 2009. Immunoglobulin E Cross-Reactivity between Lupine Conglutins and Peanut Allergens in Serum of Lupine-Allergic Individuals. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; Vol. 19(4): 283-291

19. GALLAGHER, S. y CHAKAVARTI, D. (2008). Immunoblot Analysis. J. Vis. Exp. (16), e759, doi:10.3791/759 (2008)

20. GARCÍA, H. (1992). Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988-1992. Tomo I. Proyecto de transformación de la tecnología agropecuaria. TTA. Lima. p.61-63

21. GARCÍA, M. del C. (2011). Rehabilitación de un suelo con bajo perfil de nutrientes aplicando biosolidos como fertilizante. Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura. México, D.F. consultado el 03 de

abril del 2013. Disponible en: http://tesis.bnct.ipn.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/11345/1/349.pdf

22. GRDC (Grains Research and Development Corporation). (1997). The chemical composition and nutritive value of Australian pulses. Canberra, Australia.

23. GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADA, L.M. y JIMÉNEZ, A. (2011). Chemical composition of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid. International Journal of Fats and Oils Volumen 62. N. ° 1 enero-marzo2011. Sevilla – España. ISSN: 0017-3495, Pag. 76- 83.

24. HAMAKER, B. R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R. M.; CLARK, D.; GARCÍA, H. H.; GONZALES, A. E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRÍGUEZ, T.; LESCANO, M. (1992). Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). American Association of Cereal Chemists. Note, Vol. 69 Nº 4. Pages 461 – 463.

25. HERNÁNDEZ, P.; PÉREZ, E.; MARTÍNEZ, L.; ORTIZ, B.; y MARTÍNEZ, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB 24 (1): 21-27, 2005.

26. HIGUCHI, S. (2004). Proyecto de Ley N° 11367/2004 – C12: Ley que declara al sacha inchi como patrimonio genético Nacional y producto alternativo en la lucha contra la pobreza. Lima, 08 septiembre 2004.

27. INIESTRA, J.J.; IBARRA, F.C.; GALLEGOS, J.A; ROCHA, N.E. Y GONZÁLEZ, R.F. (2005). Factores Anti nutricionales y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Agrociencia. Volumen 39, Número 6, 603-610. 2005.

28. JÁUREGUI-ZÚÑIGA, D. y MORENO, A. (2004). La biomineralización del oxalato de calcio en plantas: retos y potencial. REB 23 (1): 18-23, 2004. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM. Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria. 04510 México D. F. Consultado el 3 de abril del 2014.

Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb /numeros/2004/03/2004 _107_18-23_David_Jauregui.pdf

29. JIMÉNEZ, P.; CÓRDOBA, D.; CÓRDOBA, M.; ARACIL, M.; GIRBÉS, T. (2012). Las toxinas Shiga de *Escherichia coli* y su convergencia enzimática con ricina, ebulina y nigrina (y II). Farmacología/Bioquímica. España. Consultado el 04 de agosto del 2013. Disponible en: https://www5.uva.es /guia_docente/uploads/2012/470/45820/1/Documento31.pdf

30. KURIEN, B.T. y SCOFIELD, R.H. (2006). Western blotting. Methods for Analyzing Cytokines. Volume 38, Issue 4, April 2006, Pages 283–293.

31. LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. EJB Electronic Journal of Biotechnology 5(1):93-109.

32. LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M. (1993). 2nd edition. Principles o Biochemistry. Worth publishers, New York.

33. LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M. (2008). 5th edition. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York.

34. LÓPEZ, L.; FARIÑAS, M.; AMARO, M.E. (2011). Evaluación de la actividad hemaglutinante y hemolítica de las esponjas marinas *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) y *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814). Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 23 Nº 2: 113-119. Venezuela.

35. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

36. MATSON, K.A.; RICKLEFS, R.E.; KLASING, K.C. (2005). A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. Developmental and Comparative Immunology 29, 275–286. U.S.A.

37. MAYA, K. (2009). Características física, nutricional y no- nutricional de haba sometida a tratamiento térmico. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para optar el título de Maestro en ciencias Químico biológicas. México D.F.

38. MELCION, J.P., VAN DER POEL, A.F.B. (1993). Process technology and antinutritional factors: Principles, adequacy and process optimization. in: A.F.B. van der Poel, J. Huisman, H.S. Saini (Eds.) Proc. 2nd Int. Workshop on Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. ; 1993:419–434.

39. MÉNDEZ, J.R.; BRITO, J.; CEDEÑO, J.R.; GIL, J.A. y KHAN, L. (2000). Efecto de tres frecuencias de riego sobre algunos caracteres vegetativos y agronómicos de cuatro cultivares de maní (*Arachis hypogaea L.*) tipo erecto. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 12. Nº 2: 13-22. (2000)

40. MERINO, C.; SOTERO, V.E.; DEL CASTILLO, D.; VÁSQUEZ, G., CACHIQUE, D.; VÁSQUEZ, P.G. (2008). Caracterización química de nueve ecotipos de *Plukenetia volubilis L*. de los departamentos de Loreto y San Martin. Folia Amazónica, vol. 17, Nº 1-2. 2008, 39-45.

41. MICUCCI, H.A. y CAMPS, E. (1987). Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. Acta Farm. Bonaerense 6 (1): 35-54 (1987).

42. MONDRAGÓN, G. (2009). Estudio farmacognóstico y bromatológico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis L*. (Sacha inchi). Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Peru.

43. MONTOYA, H.H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Segunda edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellin – Colombia.

44. MORRIS, A. (2006). Allsa Position Statement: Allergen Skin-Prick Testing. Current Allergy & Clinical Immunology, March, Vol 19, No.1

45. NELSON, D.L Y COX, M.M. (2008). Lehninger: Principles of Biochemistry, 5th edition. Worth Publishers, New York.

46. NESTLÉ NUTRITION INSTITUTE WORKSHOP LATAM. (2011). Nutrición y enfermedades del aparato digestivo en niños Vol. 2. Programa de Pediatría. Larrosa A. y Vásquez E.M. Capítulo 8. Alergia a los alimentos, pp 133 – 164. México D.F.

47. OBREGÓN, A. (1996). Obtención de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) en polvo secado por atomización. Tesis para optar el título de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina - UNALM. Escuela de Post Grado. Especialidad Tecnología de Alimentos. Lima – Perú.

48. PASCUAL, G.; y MEJÍA, M. (2000). Extracción y caracterización del aceite de sacha inchi. Anales Científicos UNALM. Lima. Enero-Marzo (42): 144 – 158.

49. PITA, R.; ANADÓN, A.; y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2004). Ricina: una fito toxina de uso potencial como arma. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Revista de Toxicología, vol. 21, núm. 2-3, pp. 51-63. Asociación Española de Toxicología. España.

50. RODRÍGUEZ, A.; CORAZON-GUIVIN, M.; CACHIQUE, D.; MEJÍA, K.; DEL CASTILLO, D.; RENNO, J.F.; GARCÍA-DÁVILA, C. (2010). Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) de especies del género Plukenetia (*Euphorbiaceae*) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. Revista Peruana de Biología, vol.17, no.3, p.325-330. ISSN 1727-9933.

51. RODRÍGUEZ, R. (2005). Enfermedades alérgicas. Asma. Dermatitis atópica. Publicación del Sitio Web "Policlínico Universitario Vedado". Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pdvedado/articulo_alergia_asma1.pdf

52. ROSS, M.H.; y PAWLINA, W. (2007). Histología. 5a Edición. Editorial medica Panamericana. Madrid – España.

53. SAMPSON, H.A.; MUÑOZ-FURLONG, A.; CAMPBELL, R.L.; ADKINSON, N.F. JR.; BOCK, S.A.; BRANUM, A.; BROWN, S.G.A.; CAMARGO, C.A.JR.; CYDULKA, R.; GALLI, S.J.; GIDUDU, J.; GRUCHALLA, R.S.; HARLOR, A.D.JR.; HEPNER, D.L.; LEWIS, L.M.; LIEBERMAN, P.L.; METCALFE, D.D.; O'CONNOR, R.; MURARO, A.; RUDMAN, A.; SCHMITT, C.; SCHERRER, D.; SIMONS, F.E.R.; THOMAS, S.; WOOD, J.P.; y DECKER, W.W. (2006). Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network Symposium. J Allergy Clin Immunol. Journal of Allergy and Clinical Immunology Volume 117, Issue 2, February 2006, pp. 391–397.

54. SATHE, S.K.; KSHIRSAGAR, H.H.; y SHARMA, G.M. (2012). Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (Plukenetia volubilis L.) Proteins. Plant Foods for Human Nutrition September, Volume 67, Issue 3, pp 247-255.

55. SILVA, M.R. y SILVA, M.A.A.P. (2000). ANTINUTRITIONAL FACTORS: PROTEASE INHIBITORS AND LECTINS. Rev. Nutr., Campinas, 13(1): 3-9, jan./abr.

56. SOUKUP, J. (1970). Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana. Imprenta Colegio Salesiano, Lima.

57. STILLMARK, H. (1888). "Uber Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Sumen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen". Inaug. Diss., Dorpat.

58. THERMO SCIENTIFIC. (2013). Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit. Consultado el 03 mayo de 2013. Disponible en el http://www.piercenet.com/instructions /2160129.pdf

59. TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; y GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76 (9): pp. 4350–4354.

60. TORAL, T. y MORAL, L. (2004). Interpretación de las pruebas alérgicas: pruebas cutáneas e Inmunoglobulina E específica. A Pediatr Contin 2004; 2(4):230-3.

61. ULLOA, J.A.; ROSAS, P.; RAMÍREZ, J.C. Y ULLOA, B.E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fotoquímicos. Revista Fuente Año 3 No. 8. Consultado el 03 de abril del 2013. Disponible: http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf

62. VALENCIA, D.G., SERRANO, M.P., CENTENO, C., LÁZARO, R. Y MATEOS, G.G. (2008). Pea protein as a substitute of soya bean protein in diets for young pigs: Effects on productivity and digestive traits. Liv. Sci. 118: 1-10.

63. VALLE P. y LUCAS B. (2000). Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

64. VALLES, C. (1995). Sacha Inchi, Importante Oleaginosa Selvática. Ciudad, Pura Selva, pág. 40-41.

65. VAN DER POEL, A.F.B., BLONK, J., VAN ZUILICHEM, D.J., VAN OORT, M.G. (1990). Thermal inactivation of lections and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (Phaseolus vulgaris L.) and effects on protein quality. J. Sci. Food Agric. 1990;53:215–228

66. WESTERMEIER, R. (2001). Electrophoresis in practice. Third edition, Wiley-VCH, ISBN, 3-527-30300-6, Weinheim, Germany.

VII. ANEXOS

ANEXO A – 1: MÉTODO BRADFORD PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

a) Preparación de Estándares de Albúmina diluida (BSA)

Se usó el Tabla A – 1.1 para preparar los estándares proteicos en el rango de 100 a 1500 µg/ml, para trabajar en placa de micropozos.

Tabla A-1.1: Esquema de dilución para rango de trabajo de 100 a 1500 µg/ml de soluciones de estándares (Bradford).

Vial	Diluyente (µl)	Volumen y fuente de BSA	Concentración de BSA
A	0	300 µl de stock	2000 µg/ml
B	125	375 µl de stock	1500 µg/ml
C	325	325 µl de stock	1000 µg/ml
D	175	175 µl de dilución del vial B	750 µg/ml
E	325	325 µl de dilución del vial C	500 µg/ml
F	325	325 µl de dilución del vial E	250 µg/ml
G	325	325 µl de dilución del vial F	125 µg/ml
H	400	100 µl de dilución del vial G	25 µg/ml
I	400	0	0 µg/ml = Blanco

b) Protocolo para micropozos del método de Bradford (100-1500 ug/ml)

1. Se pipeteó 5 µl de cada estándar o muestra en los pozos adecuados.
2. Se agregó 250 µl de Reactivo de Coomassie a cada pozo y mezcló con el agitador de platos por 30 segundos.
3. Se removió el plato del agitador. Se incubó el plato por 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 595nm por el lector de placas.
4. Se usó la curva estándar para determinar la concentración proteica de cada muestra (Thermo Scientific, 2013).

c) Preparación de muestras

Se usó 125 µg de proteína total referencial en 20 µl de buffer muestra 1X modificado, la misma relación usada en la electroforesis. Se agitaron 15 ml por 45 minutos, se colocó 100 µl de todos los extractos en eppendorf por 5 minutos a 95ºC. Luego se centrifugan las muestras a 10 000 RPM por 5 minutos. Se recupera el sobrenadante para la determinación de proteínas. Para esta determinación se modificó el buffer de muestra (Sample Buffer 1X), en las siguientes cantidades: 5 ml de buffer trizma base pH 6,8; 1 g de SDS y se enraso con agua a 50 ml.

ANEXO A – 2: MÉTODO LOWRY PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLES

a) Preparación de Reactivos

- Reactivo A: Se preparó una solución de Carbonato de sodio (Na2CO3) al 2%.
- Reactivo B1: Se preparó una solución de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$) al 0.5%
- Reactivo B2: Se preparó una solución de Tartrato de Sodio al 1%
- Reactivo C: Se combinó las soluciones A, B1, B2 en proporción 100:1:1.
- Reactivo de Folin 1N: Se diluyó con agua destilada a partir de una solución 2N.
- Solución BSA (1mg/ml): Se pesó 10 mg de BSA y disolvió en 10 ml de suero fisiológico.

b) Protocolo de preparación de estándar para micropozos

Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución de trabajo 0.5 mg/ml de la siguiente manera:

Tabla A – 2.1: Esquemas de soluciones de estándares utilizados en las estimaciones proteína (Lowry).

Concentración de BSA (mg/ml)	Volumen de solución de trabajo (µl)	Volumen de H_20 (µl)
1	200	0
0,75	150	50
0,5	100	100
0,25	50	150
0,125	25	175
0,0625	12,5	187,5
0	0	200

1. Se colocó 200 µl de muestra diluida (1:10) o estándar y se siguió de acuerdo a los pasos de 2 a 4.
2. Se agregó 1ml del reactivo C e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
3. Se agregó 100 µl de reactivo de Folin 1N, agitó bien e incubó a temperatura ambiente.
4. Se leyó la absorbancia a 550 nm.
5. Se realizó una curva colocando la concentración en el eje X y las absorbancias en el eje Y.
6. Se calculó la concentración de proteína de las muestras mediante la ecuación de la recta.

ANEXO A – 3: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA

a. FUNDAMENTO

El sustrato cromogénico Benzoil-DL-Arginina-Nitroanilide Hydrocloride – BAPNA (amida), al ser hidrolizado por la tripsina, libera un compuesto coloreado de *p*-nitroanilina (amina), cuya absorbancia se midió a una longitud de onda (λ) de 410 nm a los 10 min de incubación a 37ºC en el extracto. Si existe inhibidor en la muestra, este inhibe la acción de la tripsina sobre el BAPNA. El inhibidor de tripsina presente en la muestra, se une al lugar activo de la tripsina produciendo una inhibición competitiva, limitando así las posibilidades de actuación de esta enzima sobre el sustrato de la reacción, liberándose así menos *p*-nitroanilina y desarrollándose menos color que en la reacción control de tripsina (Maya, 2009).

b. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

- Buffer Triz 50 mM, pH 8.2
- Solución Stock de tripsina. Se preparó pesando 10mg de tripsina porcina cristalina (tipo IX, sigma) en 50 ml de HCl 1 mM, conteniendo 2.5 mM $CaCl_2$. La solución se mantuvo en refrigeración. Para preparar la solución estándar se tomaron 0.8 ml de la solución stock agregándose la solución de HCl con $CaCl_2$ hasta completar un volumen de 10 ml.
- El benzoil-DL-arginina-nitroanilide hydrocloride-BAPNA. Se preparó pesando 4 mg disolviéndose en 0.1 ml de dimetil sulfóxido y completando el volumen a 10 ml con buffer triz.
- Ácido acético al 35%. Se utiliza opcionalmente para detener la actividad enzimática.

c. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

- Se pesó 1g de muestra en un matraz y se agrega 50 ml de solución NaOH 0.01 M. Se agita utilizando un agitador magnético a una velocidad de 400 rpm por 6-7 minutos.

- Se reguló el pH a 9.4 – 9.6 con NaOH 1M o HCl 1N.
- Se refrigeró por 16 horas en matraz tapado.
- Después de la extracción se filtró a través de papel Whatman Nº 2.
- Del filtrado se tomaron 40 ml que se diluyeron a 100 ml con agua destilada helada.
- Se debe lograr una dilución tal que 1 ml del mismo alcance en el ensayo enzimático un grado de inhibición entre 30 a 70%.

d. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR.

Se adaptó la metodología para realizar el ensayo enzimático en micro pozos.

- Se realizó el diagrama, ubicando el blanco estándar (BE), estándar (E), repetición del estándar (RE), blanco muestra (BM), muestras y repetición de las muestras en los micropozos.
- Se adicionó 100 µl de BAPNA a todos los micropozos.
- Se adicionó 50 µl del filtrado diluido (muestra) para analizar las muestras y el BM, y 50 µl de agua para el BE, E, y RE.
- Se colocó a 37ºC por 5 min en el lector de micropozos. Se agita.
- Se colocó 25 µl de estándar tripsina a 37ºC, se agita. Se deja incubar por 10 min.
- Si no se realiza la lectura después de 1 min, se adiciona 25 µl de ácido acético, a todos los tubos.
- Se realizó la lectura de absorbancia a 410 nm.

La absorbancia del estándar después de restar el blanco debe ser a 0.42 ±0.05. Para calcular el grado de inhibición se considera las UE, obtenidas en el tubo estándar como 100% de actividad y a partir de este se determina el % correspondiente para la muestra. La resta de ambos representa el grado de inhibición (GI). El GI debe ser entre 30 – 70% de lo contrario se repite el ensayo diluyendo la muestra hasta lograr el valor indicado.

La AIT se expresó en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra seca y se calculó de la siguiente manera (Liu y Markakais, 1989; citado, por Aliaga, 2007):

$$UTI / mg\ muestra = \frac{(Ast - Am)\,x100 / ml\ \ filtrado\ diluido}{mg\ muestra / ml\ \ filtrado\ diluido}$$

Ast = absorbancia promedio de tubo estándar (después de restar blanco)

Am = absorbancia de muestra (después de restar blancos)

mg muestra = cantidad de muestra que se encuentra en cada ml. De filtrado diluido.

ANEXO A –4: DETERMINACION DE ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

a. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se desgrasó las muestras de semilla y torta con n-heptano.

- Se pesó 19.5 gramos de semilla y torta, se agregó NaCl 0.15 M hasta enrasar a 90 ml. Se preparó la soya y ricin, como controles positivos, utilizando 19.5 g en 90 ml de NaCl 0.15 M.
- Se agitó por 2 horas a temperatura ambiente en agitador orbital.
- Se centrifugó a 2500 g por 1 hora a 4ºC. se conserva el sobrenadante y se centrifuga este a 8500 g (10 000 RPM) por 30 minutos a 4ºC.
- Se descartó el precipitado.
- Se agregó al sobrenadante solución saturada de sulfato de amonio hasta llegar a un 75% de saturación.
- Se dejó sedimentar las proteínas por toda la noche en refrigeración a 4ºC.
- Se centrifugó a 4500 RPM por 20 minutos a 4ºC.
- Se conservó las muestras que presentaron precipitado, utilizando el precipitado y disolviéndolo en 7 ml de 0.15 M de NaCl.
- Se centrifugó a 10 000 RPM por 5 minutos a 4ºC. se conserva el sobrenadante para la prueba de hemaglutinación.

b. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE UTILIZANDO ERITROCITOS DE CONEJO.

- Una muestra de 2 ml de sangre se extrajo de un conejo, dicha muestra es recogida en una jeringa conteniendo igual volumen de solución Alsever (50% sangre y 50% solución de Alsever's -Sigma). Inmediatamente se homogeneizo la muestra suavemente por 30 minutos.
- En un tubo de prueba de 3 ml de capacidad conteniendo la mezcla de sangre con solución Alsever's, (Sigma), se dejó toda la noche a 4ºC y luego se centrifuga a 1300 RPM durante 5 minutos para obtener los eritrocitos compactos de conejo.
- Luego, se agregó 1 ml de buffer fosfato 0.11M pH 7.4 (PBS 1X). Repetir esta operación dos veces más a fin de obtener cuatro lavados consecutivos. Cada vez

que se agrega 1ml se mide los eritrocitos en capilares llegando hasta 3% de eritrocitos.

- Después de los tres lavados con PBS 0.11M, se le agrego 1 ml de PBS 0.11M a los eritrocitos compactos, y se midió el nivel de hematocritos dando como resultado 21%.
- Se le agrego 4 ml a la muestra anterior y se midió el nivel de hematocritos dando como resultado 21%.

- Finalmente, se obtuvo 5 ml a un 3% (0.3 ml de eritrocitos en 10 ml de PBS).
- Siguiendo la metodología de Matson, *et al*. (2004), en una Placa de 96 micropozos se usó el esquema de diluciones seriadas.

Tabla A-4.1: Distribución de diluciones en la placa de micropozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluciones de muestra	**1**	**1/2**	**1/4**	**1/8**	**1/16**	**1/32**	**1/64**	**1/128**	**1/256**	**1/512**	**1/1024**	**SOLO PBS**

1. Luego en cada pocillo, colocar 25 ul de solución de eritrocitos al 3% en PBS. Sellar la placa con Parafilm y colocar luego la tapa de la placa. Agitar por 10 segundos suavemente. Se incubo en Baño María por 37 °C durante 90 minutos (Por flotación). Inclinar el eje más largo de cada placa unos 45° durante 20 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de facilitar la visualización de la aglutinación.
2. Luego se escaneo la placa. Settings en scanner 300 dpi (Transparencias). Los resultados se registran como el $\log_2$ negativo de la última dilución de plasma exhibiendo el comportamiento (Matson, *et al*., 2004).

ANEXO A – 5: METODOLOGIA WESTERN BLOTTING

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS PROTEICA

A. Preparación de solución A: Solución acrilamida/bis-acrilamina, 250 ml

- Se pesó 45 g. de acrilamida y 1.2 g de bis-acrilamida en un beacker y se colocó el agitador magnético.
- Se agregó 150 ml de agua destilada y se disolvió. Enrasar con agua destilada hasta 250 ml. Almacenar en refrigeración con fecha rotulada.

B. Preparación de solución B: 250 ml pH 8.8 (1.5 M)

- Se pesó 45.5 g. de TRIZMA-BASE.
- Se agregó agua destilada hasta 175 ml y añadir el agitador magnético. Agitar hasta disolver. Calibrar el pH-metro (pH 7 a pH 10) ± 0.05.
- Se agregó gota a gota* el ácido clorhídrico (HCl) diluido a 6 N hasta 8.75 – 8.85 de pH. Si la solución se calienta con la adición de ácido esperar que se enfrié.
- Se enrasó hasta 250 ml y se almaceno en refrigeración con fecha rotulada.

*Si el pH desciende demasiado, no se debe agregar NaOH porque produce gases tóxicos durante las corridas electroforéticas.

C. Preparación de solución C: 250 ml pH 6.8 (0.5 M)

- Se pesó 15.14 g. de TRIZMA-BASE
- Se agregó agua destilada hasta 175 ml y añadir el agitador magnético. Agitar hasta disolver. Calibrar el pH-metro (pH 7 a pH 10) ± 0.05
- Se agregó gota a gota el ácido clorhídrico (HCl) diluido a 6 N hasta 6.75 – 6.85 de pH. Si la solución se calienta con la adición de ácido esperar que se enfrié.
- Se enrasó con agua destilada hasta 250 ml. Almacenar en refrigeración con fecha rotulada.

D. Buffer de muestra (1x LAEMMLII SAMPLE BUFFER): 200ml

- Se preparó 20 ml. de solución 1M TRIZMA-BASE pH 6.8:
  a. Se pesó 2.42 g. de TRIZMA-BASE
  b. Se agregó agua destilada hasta 15 ml y agitar hasta disolver. Calibrar el pH-metro (pH 7 a pH 10) ± 0.05
  c. Se agregó gota a gota el ácido clorhídrico (HCl) diluido a 6 N. Si la solución se calienta con la adición de ácido esperar que se enfrié. Una vez frio seguir agregando hasta 6.75 – 6.85 de pH.
  d. Llevar a una fiola y enrasar con agua destilada hasta 20 ml.
- Se agregó en vaso de precipitado 4 g de SDS, 20 ml de glicerol, 10 ml de mercaptoethanol y 100 mg de Bromofenol Blue. Agitar hasta disolver.
- Se llevó a una fiola envuelta en papel aluminio y enrasar con agua destilada hasta 200 ml.
- Almacenar en refrigeración con fecha rotulada

E. Buffer de corrida (1x Runing Buffer): 1000ml

- Se agregó en un bicker 14.4 g de glicina, 3 g de TRIZMA-BASE, 0.5 g de SDS y 500 ml de agua destilada. Agitar hasta disolver.
- Se llevó a una fiola y se enrasó con agua destilada hasta 1000 ml (1L.).

F. Solución de AGAROSA 0.8%

Se preparó una solución de agarosa al 0.8% en 100 ml de agua, la cual se calienta 1 minuto en el horno microondas, agitar y volver a colocar el recipiente en el horno microondas (aprox. 30 segundos más) hasta que se disuelva todo esto ocurre cuando se ve traslucido, si es necesario se deja en el microondas hasta que hierva.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS

- Se usó 125 µg de proteína total (de los datos reportados en el Tabla 1) en 20 µl de buffer muestra. Por ejemplo: la semilla de sacha inchi tiene 24,7% de proteína,

entonces se colocan 126.52 mg de semilla de sacha inchi molida y se enrasan en 5 ml de Laemmlii Sample Buffer modificado 1X en Falcón de 15 ml.

- Se agitaron los Falcón de 15 ml por 45 minutos en un agitador orbital.
- Se colocó 100 µl de muestras en eppendorf a 95ºC por 5 minutos en TERMOBLOCK.
- Se centrifugó las muestras a 10 000 RPM por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

3. ELECTROFORESIS PROTEICA

- Se desmontó el equipo y limpió con alcohol los vidrios, los separadores y los peines con papel.
- Se colocó los vidrios limpios con sus separadores pegados a los jebes presentes en las paredes internas del equipo. De tal manera que quede el vidrio con la hendidura en la parte interna de la cámara (Figura A-5.1).

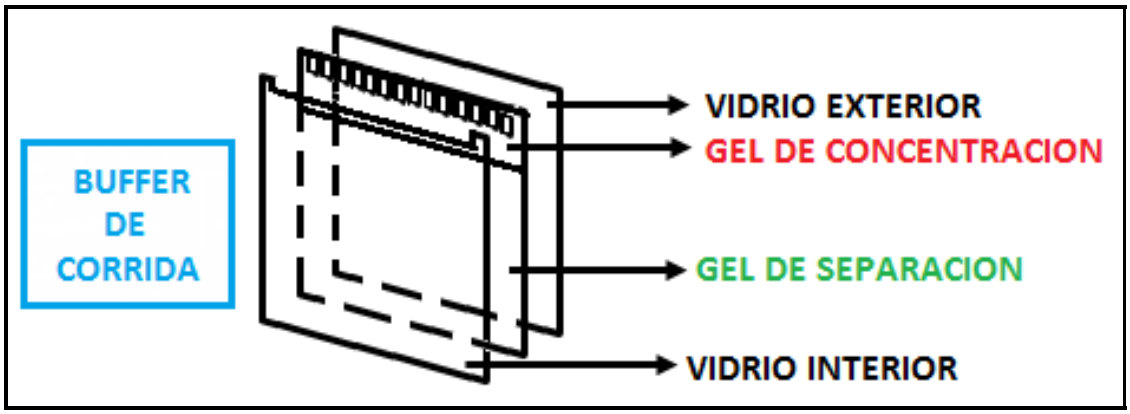


Figura A – 5. 1: Esquema para colocar el gel de poliacrilamida

- Se ajustó todos los pernos, se colocó el peine entre ambos vidrios y se marcó a 1.3 cm por debajo de los dientes del peine.
- Se agregó 25 ml de agarosa al 0.8% dejándose correr hasta que tape completamente la hendidura presente en la base de los vidrios.
- Se dejó secar por 15 minutos aproximadamente. Se agrega 10 ml de agarosa a una segunda capa de agarosa sobre la anterior capa, se deja gelificar sin que pierda la humedad, colocando un paño con agua fría empapado.

- El gel de separación se deja preparado: empezando con las cantidades grandes (para un gel se necesita: 10.85 ml. agua, 7.5 ml. solución A, 6.25ml. solución B, y 0.25 ml. De SDS al 10%) dejando al último el APS al 10 % (0.125 ml.) y TEMED (0.025 ml). Se agrega el gel de separación con una pipeta hasta la marca en el vidrio.
- Se agrega pequeñas cantidades de agua destilada por el borde de los separadores. Se observa que desaparecen las burbujas y se forman dos capas (debajo el gel de separación y encima el agua). Se deja secar el gel de separación por aproximadamente 30 minutos.
- Se dejó preparado el gel de concentración: empezando con las cantidades grandes (para un gel se necesita: 7.25 ml. agua, 1.85 ml. solución A, 3.15ml. solución C, 0.0335 ml de neutral red 0.5%-en etanol y 0.125 ml. De SDS al 10%).
- Se retiró el agua que se encuentra por encima del gel de separación y se limpian las paredes internas del vidrio por donde correrá el gel de concentración.
- Se agregó al gel de concentración APS al 10 % (0.0625 ml.) y TEMED (0.0285 ml) justo antes de ser colocado. Se coloca el gel de concentración con una pipeta hasta el borde superior del vidrio y colocar el peine inmediatamente. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 a 20 minutos, usando como control polimerización el remanente en el matraz de preparación del gel.
- Cuando el gel de concentración solidifico mover el peine suavemente. Se retira la agarosa de la base y se coloca los soportes dentro de la cámara.
- Se llenó la base de la cámara y el espacio interno a los vidrios hasta el borde con Runing Buffer.
- Luego se lavaron todos los pocillos ya formados con ayuda de goteros.
- Las muestras centrifugadas y el marcador (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder) se colocan en los micropozos (20 ul) del gel de concentración, suavemente con micropipetas.
- Se tapó la cámara, y se acomodaron los electrodos adecuadamente, luego se prendio el equipo. Empezando en 50 voltios (20 mA), por aproximadamente 90 minutos. Hasta que la franja azul este por debajo del gel de concentración.
- Luego se subió el voltaje hasta 75 voltios, por 3 horas más, luego se aumenta a 90 voltios por unos 45 minutos más y se apaga el equipo de electroforesis.
- Por la noche, se retiraron los soportes de la cámara y dentro del caño se desmontan los vidrios, eliminando el Runing buffer.

- Se retiró el vidrio superior con ayuda de una pinza, se coloca el gel en un recipiente con agua destilada y se enjuaga tres veces el gel con agua blanda o de caño para que no se parta.
- Se trasfirieron las bandas de proteínas a las membranas de nitrocelulosa inmediatamente se agrega GelCode al recipiente con los geles de poliacrilamida y se agita por 15 minutos en un agitador orbital hasta que se observan las bandas. Luego se coloca el recipiente en el refrigerador sin eliminar el GelCode hasta la mañana del día siguiente.
- Se retiró el recipiente del refrigerador y se recuperó el GelCode (rotulando que es recuperado), luego se enjuaga tres veces más con agua blanda. Se coloca en una transparencia para tomarle foto y escanearlo.

4. ELECTROTRANSFERENCIA

A. PREPARACIÓN DE BUFFER DE TRANSFERENCIA

Tabla A – 5. 1: Preparación de buffer de transferencia

LITROS DE BUFFER DE TRANSFERENCIA		3
1X Tris Glicina	GLICINA (g)	43,2
	TRIS (g)	9
0,037% SDS (g)		1,11
20% metanol (ml)		600
AGUA (enrasar)		3

B. PASOS PARA LA ELECTROTRANSFERENCIA

- Se colocó el buffer de transferencia en una bandeja.
- Se desmontó el equipo de electroforesis, se separaron los geles de poliacrilamida de los vidrios y se humedecieron los geles en el buffer de transferencia (BT). Se separó con una cuchilla el gel de concentración y la agarosa. Colocar los geles en la bandeja con el BT.

- Se cortó las membranas en 6x10 cm y 8x10 cm, a la medida de los geles, y colocarlo en el buffer de trasferencia, junto a los geles. Tener en cuenta que no se debe mojar las membranas de nitrocelulosa. Se recomienda secarse bien las manos para secarse cada vez que toquemos alguna solución. No le debe caer ni una gota de agua a las membranas.

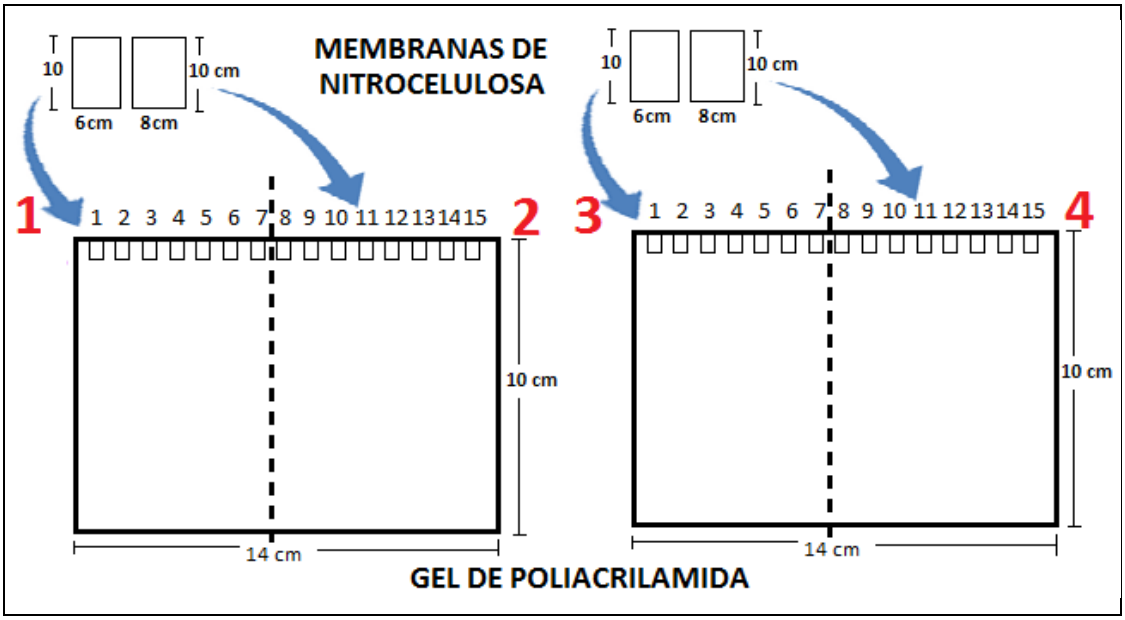


Figura A – 5. 2: Medidas de las membranas de nitrocelulosa

- Se cortaron los papeles filtro (tipo cartulina secante) en 10x15 cm. Se cortan 4 papeles en total y no se mojan hasta preparar las capas para la transferencia.
- Se abre el equipo tipo sándwich y se coloca de tal manera, que quede en la mesa como base la pared negra. Encima se coloca la primera esponja, que ha sido remojada previamente en el buffer de transferencia, luego se agrega BT empapando más la esponja. Se mojan los papeles filtro completamente y se coloca encima de la esponja.

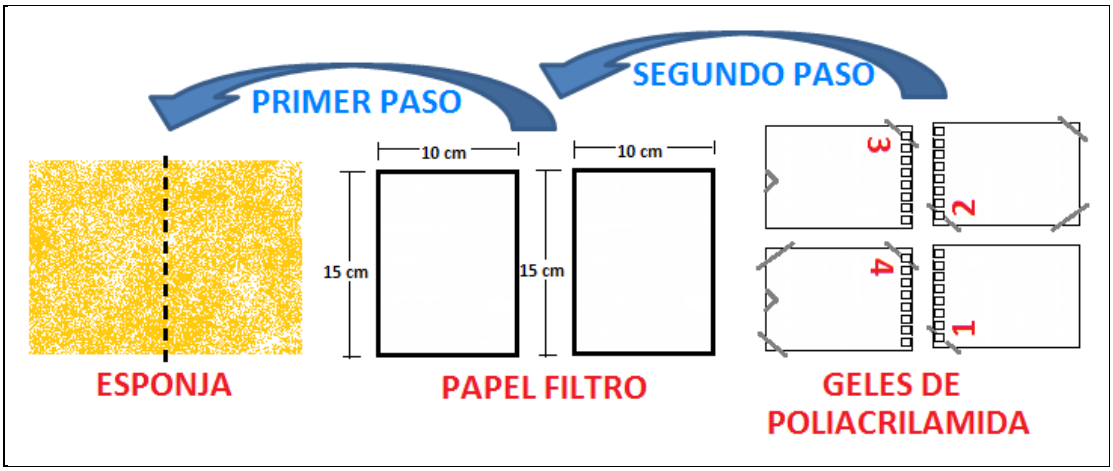


Figura A – 5. 3: Primeros pasos para colocar las membranas de nitrocelulosa en el equipo de transferencia

- Se mojaron con buffer de transferencia el papel filtro y se quita la espuma a medida que se van colocando uno encima de otro. Se colocan los geles encima de los papeles filtro, se agrega un chorro de BF y se quita la espuma con ayuda de un tubo de ensayo de vidrio de 15 cm de lado, haciendo girar el tubo suavemente del centro hacia los lados.
- Se colocaron dos papeles filtro encima de los geles y se agrega BT, se quitan las burbujas con el tubo de ensayo y se agrega la otra esponja mojada con BT.

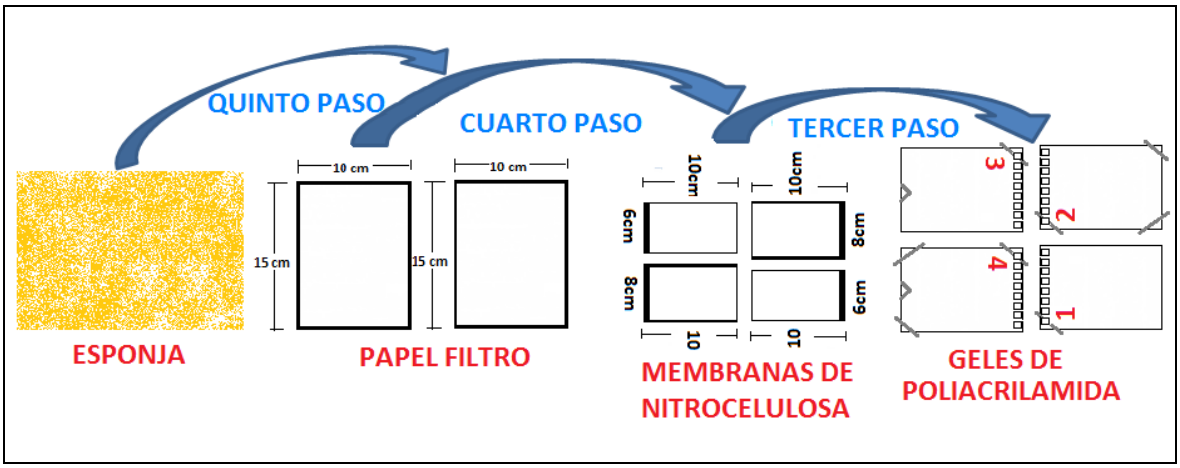


Figura A – 5. 4: Últimos pasos para colocar las membranas de nitrocelulosa en el equipo de transferencia

- Se cerró el equipo tipo sándwich y se aseguró. Luego se colocó las placas cerradas justo en el centro dentro del equipo de trasferencia, quedando la pared negra del lado del electrodo negro.

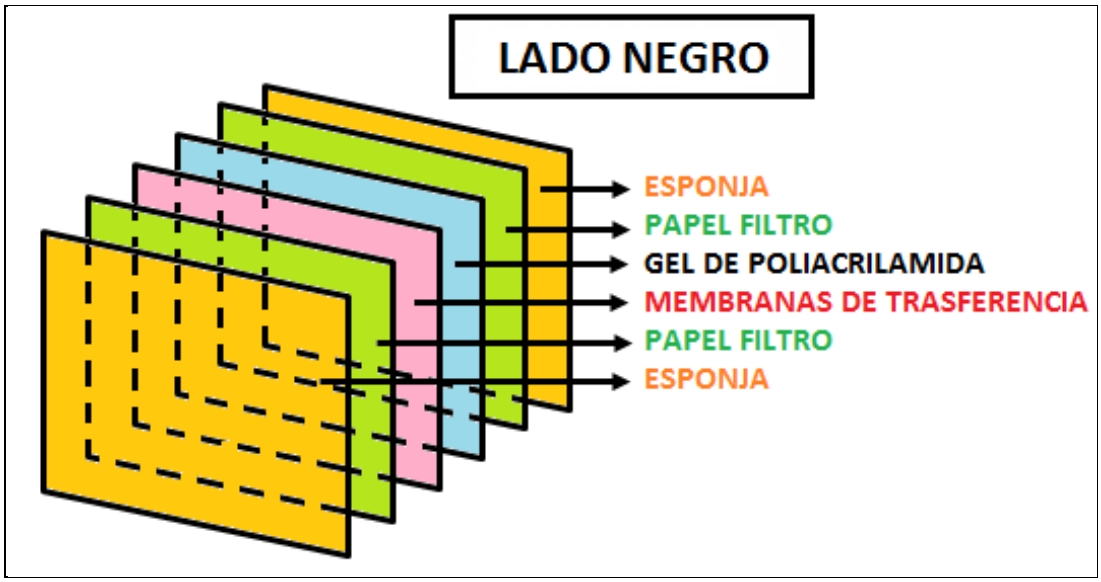


Figura A – 5. 5: Capas para colocar las membranas de nitrocelulosa en el equipo de transferencia

- Se llenó el tanque con el buffer de trasferencia y se cierra, colocando negro con negro y rojo con rojo en la tapa.

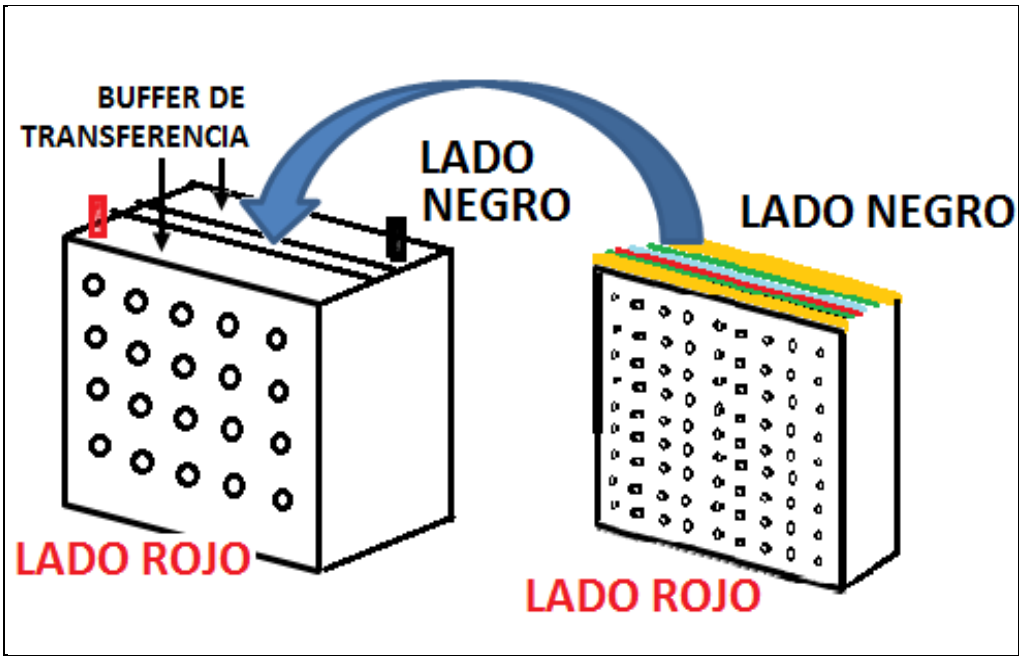


Figura A – 5. 6: Introducción de los geles de poliacrilamida en el equipo de transferencia

- Se colocó por 12 horas a 7 voltios. Luego de las 12 horas se destapó el equipo y se desmontó. Se marcaron las esquinas de las membranas para saber el lado por donde se encuentran las proteínas.

Figura A – 5. 7: Rotulado de membranas para almacenamiento posterior

- Se colocaron las membranas en agua destilada para lavarles el buffer de trasferencia, luego se agrega una pequeña cantidad de MemCode (Pierce) hasta que tape las membranas.
- Se enjuagó con Destained (Pierce) y se colocó en transparencias para escanearlas. Una vez escaneada se colocan las membranas en Eraser (Pierce) por 5 minutos en agitación.
- Finalmente se enjuagó las membranas 3 veces con agua destilada y se colocaron en un tapper con Tris-Buffer Salino (1X). Se almacenó en refrigeración.

5. BLOQUEO

A. PREPARACIÓN DE BUFFER PARA EL BLOQUEO

a. Tris – Buffer Salino (TBS – T) 20 X

Tabla A – 5. 2: Preparación de tris – Buffer Salino Twenn 20

LITROS de Buffer	1	0,25
Tris base (g)	48,4	12,1
NaCl (g)	160	40
HCl (12 N) (ml)	6,4	1,6
Tween 20	22	5,5

Se ajustó el pH a 7,6 con HCl. Antes de enrasar se agregó en Tween 20.

b. Solución de Leche en polvo descremada(LPD)(5% en TBS – T.1X)

- Se llevó 10 ml de TBS – T (20 X) a una probeta y se enraso con agua destilada.
- Se pesó 10 g. de leche en polvo descremada y se incorpora a los 200 ml de TBS-T 1X. Se agito por 15 minutos en el agitador orbital.
- Luego se almacenó esta solución en refrigeración (4ºC).
- Se preparó por lo menos una hora antes para facilitar la sedimentación y favorecer el usar siempre la parte superficial.

B. BLOQUEO PARA USAR ANTICUERPO CADENA A DE RICINA

- Se colocó las membranas 1 y 2 espalda con espalda, dejando las proteínas libres para lavado.

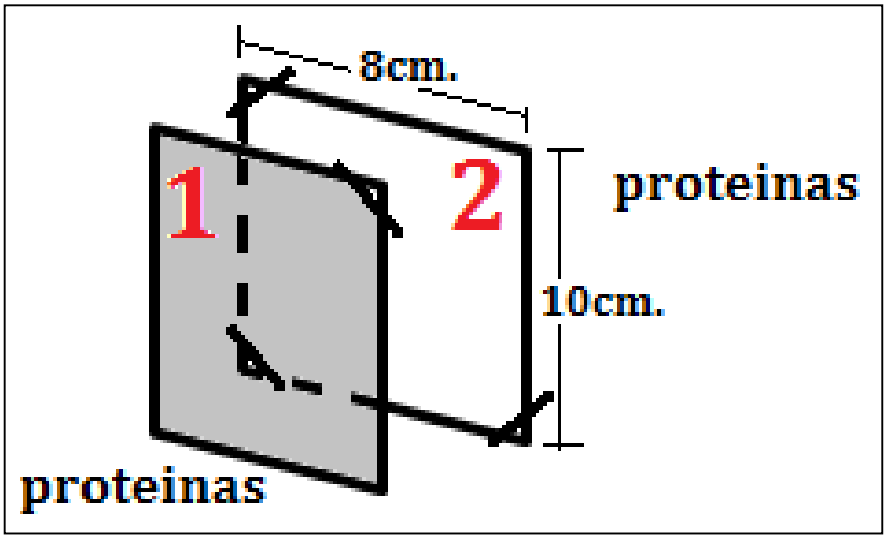


Figura A – 5. 7: Esquema de posiciones para las membranas

- Se agito por media hora. Volteando las membranas cada 15 minutos. Colocándolas siempre espalda con espalda, con una pinza metálica.

C. BLOQUEO PARA USAR SUEROS DE PACIENTES ALERGICOS A SOYA Y MANI (REACTIVIDAD CRUZADA CON SACHA INCHI).

- Se colocó las membranas 3 y 4 espalda con espalda, dejando las proteínas libres para lavado (Figura A – 5. 8.).

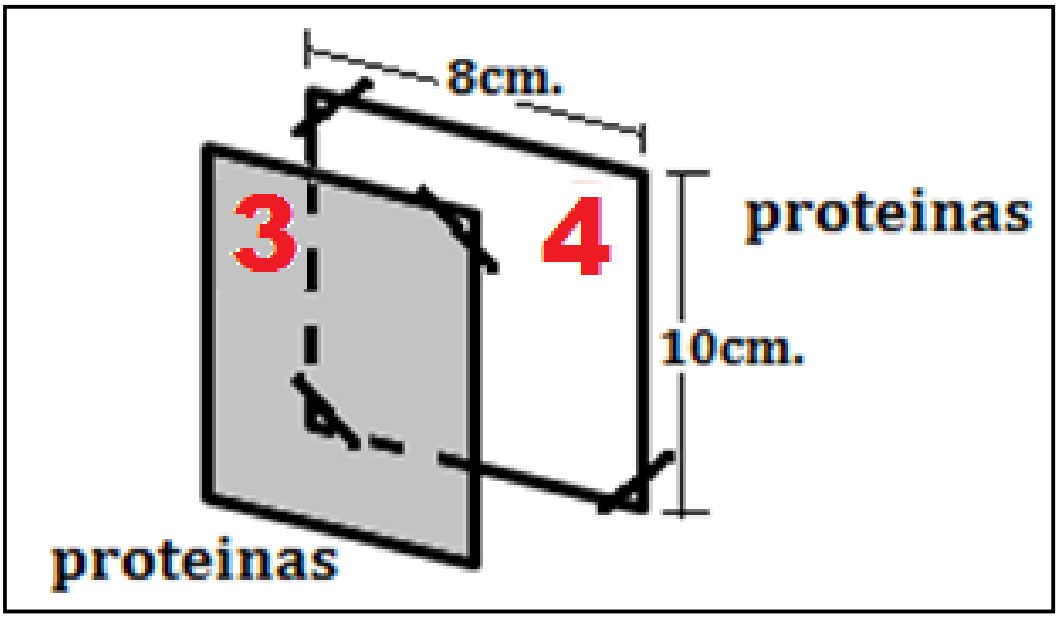


Figura A – 5. 8: Esquema de posiciones para las membranas

- Se agito por media hora en la solución de leche en polvo al 5%en TBS-T 1X, volteando las membranas cada 15 minutos. Colocándolas siempre espalda con espalda, con una pinza metálica cuyas puntas estaban protegidas con petrifilm.

6. DETECCION

A. PREPARACIÓN DE BUFFER PARA DETECCIÓN

a. Pierce ECL Western Blotting Substrate

ECL Western Blotting Substrate, es un sustrato de la peroxidasa de nivel de entrada de bajo precio para un aumento de quimioluminiscencia o Substrate for Enhanced Chemiluminescence (ECL). Este kit presenta dos soluciones: luminol y peróxido. Solo se debe mezclar estas soluciones en proporción 1:1 antes de su uso.Thermo Scientific Pierce Kit ECL Western Blotting substrate:

- Prod # 1859701. Detection Reagent 1.

Peroxide solution

- Prod # 1859698.Detection Reagent 2

Luminol Enhacer Solution

b. Preparar líquidos para revelado manual de films Rayos X

Se utilizó cantidad suficiente para cubrir completamente los films de rayos X, en las bandejas. Se usaron bandejas de 5 cm de alto, 30cm. de largo y 20 cm. de ancho. Ambos líquidos se almacenan a temperatura ambiente en un lugar oscuro.

- **Liquido Revelado**

Para 100 cm^3, se prepara la dilución en el siguiente orden y las siguientes cantidades:

Tabla A – 5. 3: Proporciones para la preparación del líquido revelador

Agua (cm^3)	Liquido A (cm^3)	Liquido B (cm^3)	Liquido C (cm^3)	Agua (cm^3)	TOTAL (cm^3)
50	25	2.5	2.5	20	100

- **Liquido Fijador.**

Para 100 cm^3, se prepara la dilución en el siguiente orden y las siguientes cantidades:

Tabla A – 5. 4: Proporciones para la preparación del líquido fijador

Agua (cm^3)	Liquido A (cm^3)	Liquido B (cm^3)	TOTAL (cm^3)
70	25	5	100

B. DETECCION USANDO ANTICUERPO CADENA A DE RICINA

- Se formó una bandeja rectangular con las dimensiones de las membranas. Se colocó anticuerpo cadena A de ricina en proporción 1ul/500ml de solución de LPD. La leche en polvo se deja reposar y se toma solo la parte superior de la solución. Se colocó un papel toalla mojado debajo de parafilm y se tapó el tapper.

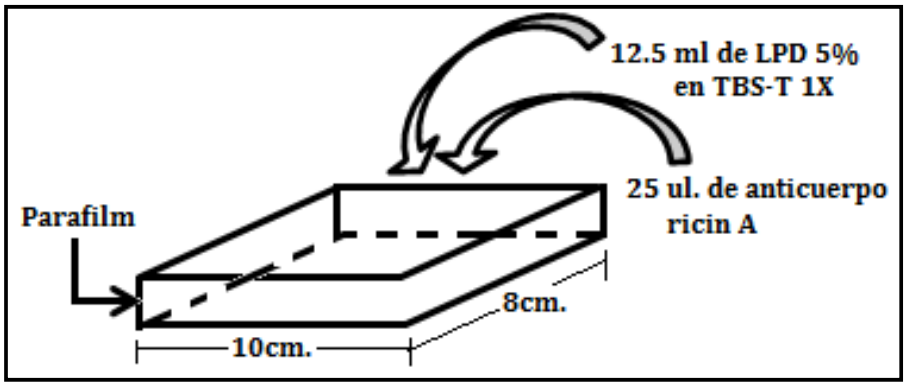


Figura A – 5. 9: Preparación de pozo de parafilm donde se realizó la reacción con el anticuerpo cadena A de ricina

- Se agitó por media hora y se volteó las membranas, siempre espalda con espalda. Y se dejó media hora más en el agitador orbital.

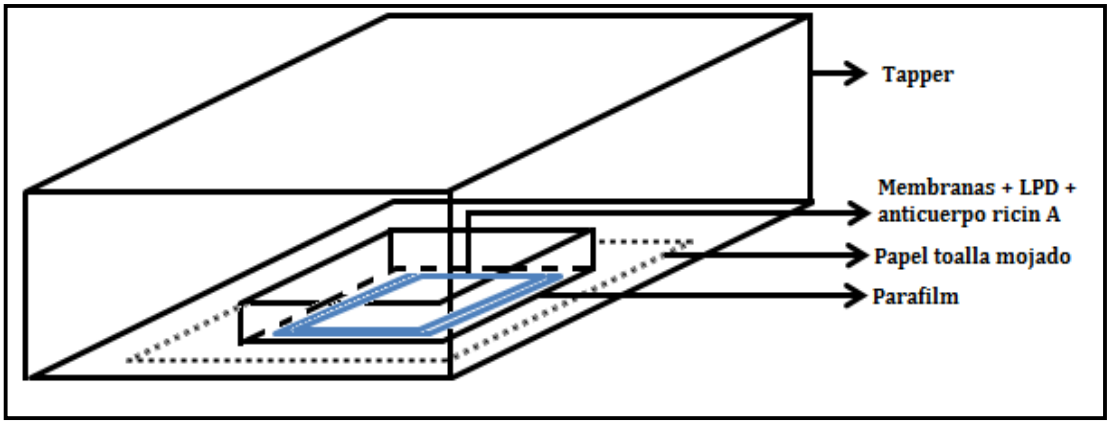


Figura A – 5. 10: Distribución de membranas dentro del recipiente que se colocó en el agitador orbital.

- Luego de la hora de agitación se retiró con la pinza las membranas y se colocó en TBS-T (1X) para enjuagar las membranas.
- La LPD + anticuerpo cadena A de ricina (1 µg: 500 ml) se conservó en congelación en un tubo de prueba (tapa azul), cerrado herméticamente.
- Las membranas en el TBS-T (1X) se agito por 10 minutos, luego se desechó agarrando las membranas con las pinzas, se agregó TBS-T (1X) inmediatamente (recordar que las membranas nunca deben secarse), se agito por 10 minutos y se

desechó el TBS-T (1X). se agregó TBS-T (1X) por tercera vez y se agita 10 min, esta vez el TBS-T (1X) se almacena para el siguiente lavado.

- Se coloca las membranas en un tapper con 15ml de LPD+15 ul de proteína G (1mg/ml). De tal manera que tenemos proteína G 1ug/ml de LPD.

$$(1\mu g/ul) \times (15\ \mu l) = X \times (15000\ \mu l)$$

- Se agito por una hora en el agitador orbital, volteando cada 15 minutos las membranas.
- La proteína G (1mg/ml) se almaceno en congelación en ependorf (cada ependorf contiene 100 µl).
- Se escurrió y coloco las membranas en TBS-T (1X) por 10 minutos. Se desechó la proteína G en LPD. Se desechó el TBS-T (1X) después de los 10 minutos y se coloca las membranas en otro TBS por 10 minutos. Son 3 enjuagues con TBS-T por 10 minutos cada uno.
- Se agregó 15 ml del kit ECL: Luminol / Enhancer en proporción 1:1. Se empieza usando la botella blanca y luego la negra. Solo se debe mezclar estas soluciones antes de su uso.
- Se escurrió las membranas cuidadosamente con las pinzas y se colocaron sobre un plástico para envolver alimentos. Inmediatamente, se agregó la mezcla de ECL 1:1 sobre toda la membrana y se esperó 5 minutos.
- Finalmente, se colocó las membranas escurridas en una transparencia y se envolvieron en láminas de plástico para envolver alimento, sin dejar burbujas y limpiando el excedente de agua hasta que la superficie del plástico estuvo seca.

7. DETECCION USANDOSUEROS DE PACIENTES ALERGICOS A SOYA Y MANI (REACTIVIDAD CRUZADA CON SACHA INCHI).

- Se formó un barquito rectangular con las dimensiones de cada membrana. Se colocó el suero en estudio (Soya cod. 587 Título 33.3 IgE possitive challenge y Maní cod. 274 Título >100 IgE) en proporción (1:40), es decir, 0.25 ml de suero en 10 ml de solución de LPD al 5% en TBS-T 1X. Se colocó un papel toalla mojado debajo de parafilm y se tapó el tapper.

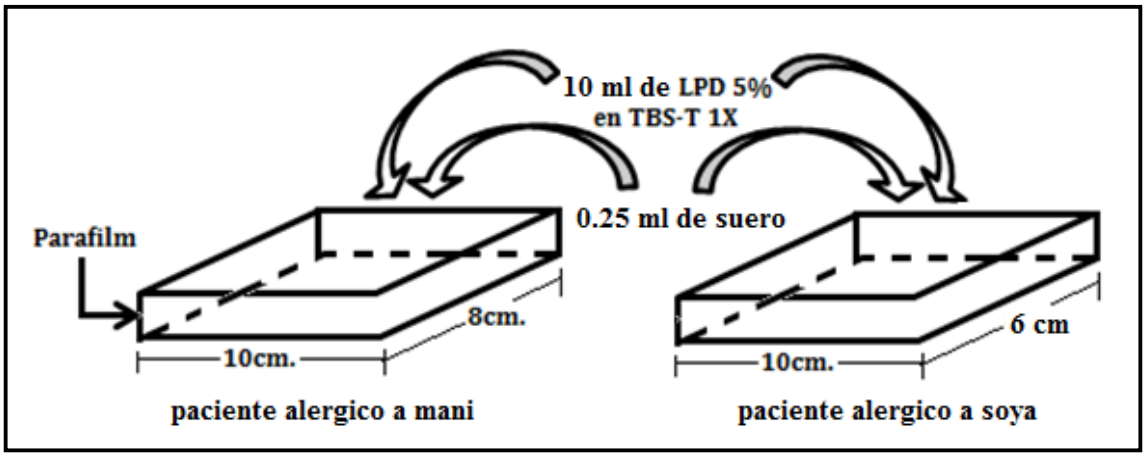


Figura A – 5.11: Preparación de pozo de petrifilm donde se realizó la reacción con el suero de los pacientes alérgicos a soya y a maní

- Se agito por una hora en el agitador orbital, para cada antisuero se usó un táper diferentes (Dooper, *et al*.; 2009). Se mantiene el táper cerrado para evitar la evaporación de agua.

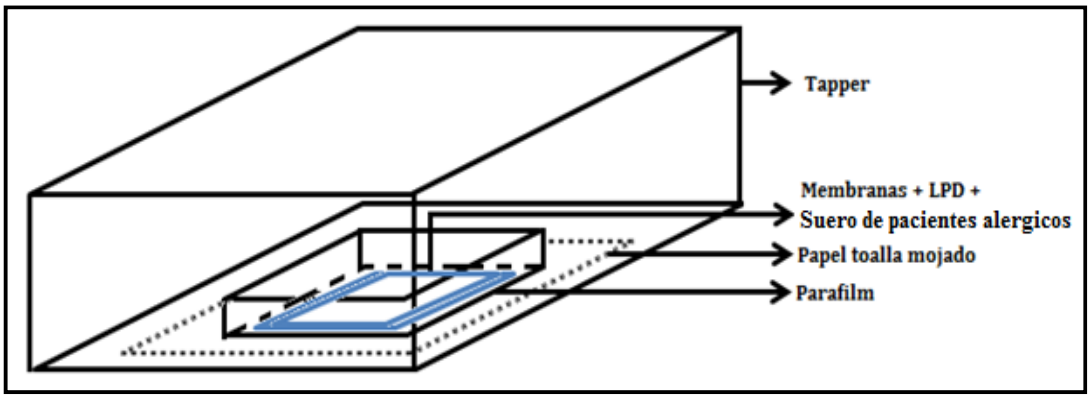


Figura A – 5.12: Distribución de membranas dentro del recipiente que se colocó en el agitador orbital.

- Luego de la hora de agitación se retiró con la pinza las membranas y se colocó en TBS-T (1X) para enjuagar las membranas. (Aquí las dos membranas se enjuagaron juntas y espalda con espalda) 10 minutos en agitador orbital. Luego se elimina el buffer y se enjuaga 2 veces.

- La LPD + antisuero (1/40) se conservó en congelación en eppendorf debidamente rotulados y cerrados herméticamente.
- Las membranas son lavadas nuevamente en el TBS-T (1X), agregando inmediatamente (recordar que las membranas nunca deben secarse) se agito por 10 minutos más, luego se desechó el buffer TBS-T agarrando las membranas con las pinzas, se enjuago dos veces y se escurrió para luego seguir inmediatamente con la adición de la proteína L como se indica a continuación.
- Se coloca las membranas en un táper con 15ml de LPD+15 µl de proteína L (1mg/ml). Se diluyo la ampolla conteniendo 0.5 mg con 0.5ml de PBS-Glicerol De tal manera que tenemos proteína L 1ug/ml de LPD.
- Se agito por una hora en el agitador orbital, volteando cada 15 minutos las membranas.
- La proteína L (1mg/ml) se almaceno en congelación en ependorf (cada ependorf contiene 90 µl).
- Se escurrió y coloco las membranas en TBS-T (1X) por 10 minutos para lavar. Se desechó la proteína L en LPD utilizada. Se desechó el TBS-T (1X) después de los 10 minutos y se coloca las membranas en otro TBS-T (1X) por 10 minutos. Son 3 lavados con TBS-T por 10 minutos cada uno.
- Se agregó 15 ml del kit ECL: Luminol / Enhancer en proporción 1:1. Se empieza usando la botella blanca y luego la negra. Solo se debe mezclar estas soluciones en antes de su uso.
- Se escurrió las membranas cuidadosamente con las pinzas y se colocaron sobre un plástico para envolver alimentos. Inmediatamente, se agregó la mezcla de ECL 1:1 sobre toda la membrana y se esperó 5 minutos.
- Finalmente, se colocó las membranas escurridas en una transparencia y se envolvieron en láminas de plástico para envolver alimento, sin dejar burbujas y limpiando el excedente de agua hasta que la superficie del plástico estuvo seca.

8. REVELADO DE FILM DE RAYOS X

Se coloca aproximadamente 700 ml. de cada liquido en bandejas rotuladas previamente, no se debe mezclar el líquido fijador con el revelador, ni viceversa. Además los film de rayos X son muy sensibles a la luz por lo que se debe mantener siempre cerrado.

- En un lugar completamente oscuro, durante la noche, se colocó el film dentro de la placa cerrada. Las membranas envueltas en el plástico se colocan sobre el film y ya no se mueven más por ningún motivo porque si no la imagen sale borrosa. Se colocó dentro también una trasparencia con una escala centímetro, para facilitar la interpretación de las distancias en las fotos. las cuales muestran fluorescencia el film de rayos X.
- Se cerró el casete con el film y las membranas dentro y se dejó por diferentes tiempos. Para el revelado de las membranas conteniendo el anticuerpo cadena A de ricina se expuso el film 4 y 15 minutos. Mientras que, las membranas con sueros de pacientes alérgicos se expuso el film por 30 segundos.
- Dentro del ambiente oscuro se abrió el casete y se sacó el film, colocándolo cuidadosamente en el líquido revelador por 4 minutos (Revelador). Pasado este tiempo se escurre y se coloca en el agua, enjuagándose el film por 20 segundos mínimos. Luego, se escurre y se coloca en el líquido fijador por 10 minutos. Finalmente, se retira se escurre y se coloca en agua por 20 minutos.
- Finalmente, se seca las placas y escanea los resultados.

9. USO Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

- Mantener los buffer de electroforesis y extracción utilizadas en refrigeración, y los sueros, marcadores moleculares y anticuerpos en congelación debidamente rotulados. Para la electroforesis desechar cualquier solución o líquido que presente precipitación o sustancia.
- Los líquidos reveladores y fijador, pueden usarse hasta 3 meses después de su mezclado.
- El TEMED empeora después de su utilización hasta un año, incluso cuando se mantiene a 4ºC. desechar las botellas que se han utilizado durante más de un año o inmediatamente cuando los pozos no se forman adecuadamente.
- Desechar el APS (10%) después de descongelarse una vez, aun cuando están almacenados en refrigeración en ependorf. No congelar de nuevo, reservas congeladas trabajan bien, pero es mejor no correr riesgos.
- Se debe usar guantes de látex para trabajar y mezclar durante la electroforesis y transferencia de membranas de nitrocelulosa.

- Se debe observar la corrida electroforética periódicamente y dejar que la franja de recorrido quede debajo del gel para detener la electroforesis, asimismo se debe agregar un poco de buffer de corrida cuando se observa que el nivel baja.
- Se recomienda escanear la fluorescencia mediante el uso de un escáner de fluorescencia a la intensidad del láser 90%.

ANEXO B – 1: RESULTADOS DEL ANALISIS PROXIMAL

Tabla B – 1. 1. Determinación del contenido de humedad en sacha inchi

	SEMILLA	TORTA
Repetición 1	6,67%	4,37%
Repetición 2	7,02%	3,46%
Repetición 3	6,40%	3,94%
PROMEDIO	6,70 %	3,92 %
Desviación estándar	0,31%	0,46%
CV	0,05	0,12

Tabla B – 1. 2. Determinación del contenido de cenizas

	SEMILLA	TORTA
Repetición 1	2,62%	3,41%
Repetición 2	2,64%	3,55%
PROMEDIO	2,63%	3,48%
Desviación estándar	0,01%	0,09%
CV	0,01	0,03

Tabla B – 1. 2. Determinación del contenido de grasa

	SEMILLA	TORTA
Repetición 1	46,27%	16,73%
Repetición 2	52,02%	15,83%
PROMEDIO	49,14%	16,28%
Desviación estándar	2,87%	0,12%
CV	0,06	0,00

ANEXO B – 2: RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN SACHA INCHI

Tabla B – 2. 1: Actividad del inhibidor de tripsina en muestras sin desgrasar y sin tratamientos térmicos de sacha inchi

Muestra	Semilla 1	Semilla 2	Semilla 3	Torta 1	Torta 2	Torta 3
Repetición 1	0,36	0,54	0,37	0,30	0,39	0,39
Repetición 2	0,38	0,58	0,37	0,35	0,42	0,37
Blanco muestra	0,15	0,31	0,19	0,25	0,19	0,19
Promedio	0,37	0,56	0,37	0,33	0,41	0,38
Desviación estándar	0,02	0,02	0,00	0,04	0,02	0,01
CV%	4,60%	4,45%	0,19%	11,95%	4,60%	3,57%
Prom – Blanco	0,22	0,25	0,18	0,07	0,21	0,19
% Actividad con respecto a blanco	77,0%	65,03%	54,97%	24,7%	0,56%	57,38%
% Inhibicion	23,0%	34,97%	45,03%	75,3%	0,44%	42,62%
UTI/mg	16,63	41,88	37,38	54,5	39,69	35,375
PROMEDIO	31,96			43,19		
Desviación estándar	13,47			10,03		

Tabla B – 2. 2: Determinación de actividad de inhibidor de tripsina en muestras desgrasadas y con tratamientos térmicos en torta de sacha inchi

Muestra	Torta	Torta	Torta	Torta	Torta a	Torta a

	1	2	3	4	60ºC - 1	60ºC – 2
Repetición 1	0,41	0,49	0,36	0,47	0,34	0,46
Repetición 2	0,40	0,47	0,36	0,43	0,33	0,46
Blanco muestra	0,33	0,36	0,12	0,17	0,17	0,26
Promedio	0,40	0,50	0,36	0,45	0,33	0,46
Desviación estándar	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00
CV%	2,28%	1,01%	0,40%	5,19%	3,39%	0,31%
Prom- Blanco	0,07	0,13	0,24	0,28	0,17	0,20
% Actividad respecto al blanco	17,59%	32,84%	57,76%	67,66%	41,57%	49,45%
% Inhibición	82,41%	67,16%	42,24%	32,34%	58,43%	50,55%
UTI/mg	33,5	27,3	42,24	32,34	23,75	20,55
PROMEDIO	33,85				22,15	
Desviación estándar	6,21				2,26	

Tabla B – 2. 2: Determinación de actividad de inhibidor de tripsina en muestras desgrasadas y con tratamientos térmicos en semilla de sacha inchi

Muestra	Semilla 1	Semilla 2	Semilla 3	Semilla 4	Semilla tostada 1	Semilla tostada 2
Repetición 1	0,36	0,43	0,43	0,40	0,50	0,61
Repetición 2	0,36	0,42	0,44	0,42	0,51	0,60
Blanco muestra	0,44	0,24	0,20	0,14	0,16	0,20
Promedio	0,36	0,43	0,43	0,41	0,50	0,61
Desviación estándar	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
CV%	1,38%	2,32%	0,82%	2,58%	0,56%	0,35%
Prom- Blanco	-0,08	0,18	0,23	0,27	0,35	0,41
% Actividad respecto al blanco	-19,80%	45,26%	55,49%	64,56%	84,87%	100,98%
% Inhibición	119,80%	54,74%	44,51%	35,44%	15,13%	-0,98%
UTI/mg	48,7	22,25	44,51	35,44	6,15	-0,4
PROMEDIO	37,73				2,88	
Desviación estándar	11,71				4,63	

En la figura B – 2.1 se observan los extractos antes y después de las 16 horas en refrigeración a pH 9.4 a 9.6.

Extractos antes de las 16 horas de refrigeracion

Extractos despues de las 16 horas de refrigeracion

Figura B – 2. 1: Extractos de semilla y torta para determinar actividad del inhibidor de tripsina

ANEXO B – 3: RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Tabla B – 3. 1: Comportamiento hemaglutinante en semilla y torta de sacha inchi

Diluciones con PBS 0,011 M												
	DILUCIONES											BLANCO
TORTA 1	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
TORTA 2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
TORTA 3	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SEMILLA 1	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO
SEMILLA 2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SEMILLA 3	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO

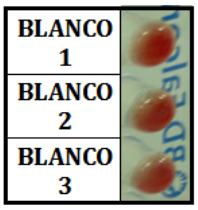


Figura B – 3. 1: PBS 0.011 M con sangre al 3% de eritrocito

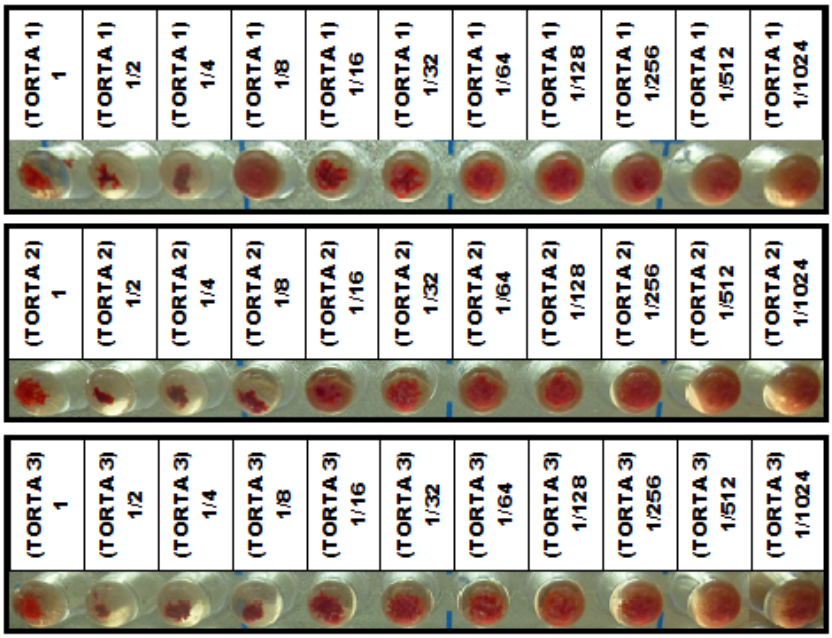


Figura B – 3. 2: Comportamiento hemaglutinante en torta de sacha inchi con diluciones de PBS 0.011 M

Figura B - 3. 3: Comportamiento hemaglutinante en semillas de sacha inchi con diluciones de PBS 0.011 M

Tabla B – 3. 2. Comportamiento hemaglutinante en semilla de soya y ricina

Diluciones con PBS 0,011 M												
	DILUCIONES											BLANCO
RICINA	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SOYA	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS
Comportamiento Hemaglutinante	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO

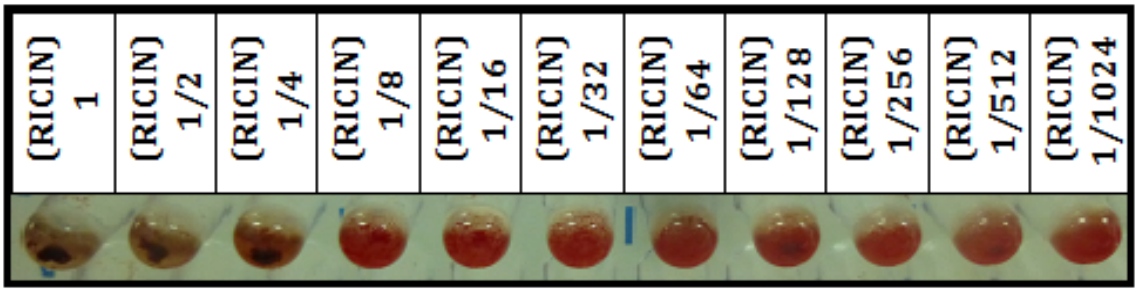


Figura B – 3. 4: Comportamiento hemaglutinante en ricina con diluciones de PBS 0.011 M

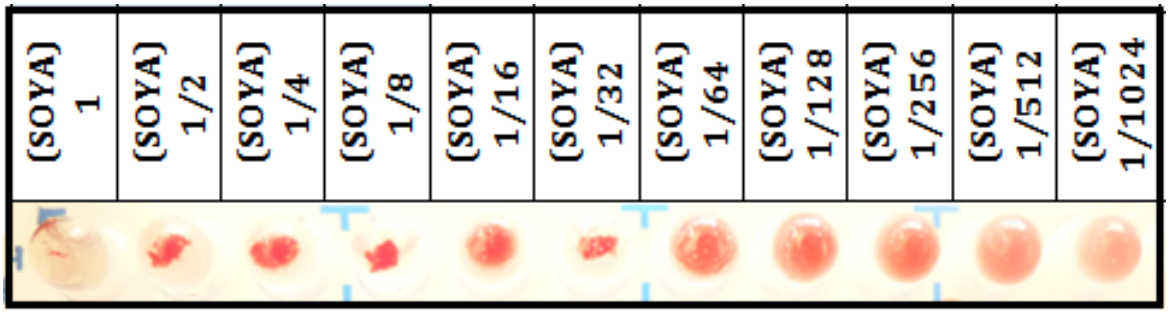


Figura B – 3. 5: Comportamiento hemaglutinante en soya con diluciones de PBS 0.011 M

ANEXO B – 4: RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE PROTEÍNAS SOLUBLE POR EL METODO BRADFORD EN EXTRACTOS PARA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LECTINAS

La proteína soluble en los extractos para determinar actividad hemaglutinante se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando las instrucciones descritas para el Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo scientific, 2013). Cada muestra fue típicamente convenientemente diluida y se analizó por duplicado.

Tabla B – 4.1: Curva estándar de albumina diluida (BSA) para el rango de 100 - 1500 ug/ml

	CONCENTRACION (ug/ml)	ABSORBANCIA			ABS. PROM.	ABSORBANCIA CORREGIDA
A	2000,0	1,497	1,501	1,492	1,497	1,121
B	1500,0	1,385	1,344	1,334	1,354	0,978
C	1000,0	1,216	1,240	1,166	1,207	0,831
D	750,0	1,070	1,104	1,081	1,085	0,709
E	500,0	0,908	0,902	0,933	0,914	0,538
F	250,0	0,668	0,687	0,645	0,667	0,291
G	150,0	0,531	0,540	0,555	0,542	0,166
H	25,0	0,497	0,493	0,483	0,491	0,115
I	0,0	0,376	0,376	0,376	0,376	0,000

***BSA, albumina de suero bovino.**

Se realizó un ajuste cuadrático como indica Thermo Scientific (2013) el cual se muestra en la Figura B – 4.1.

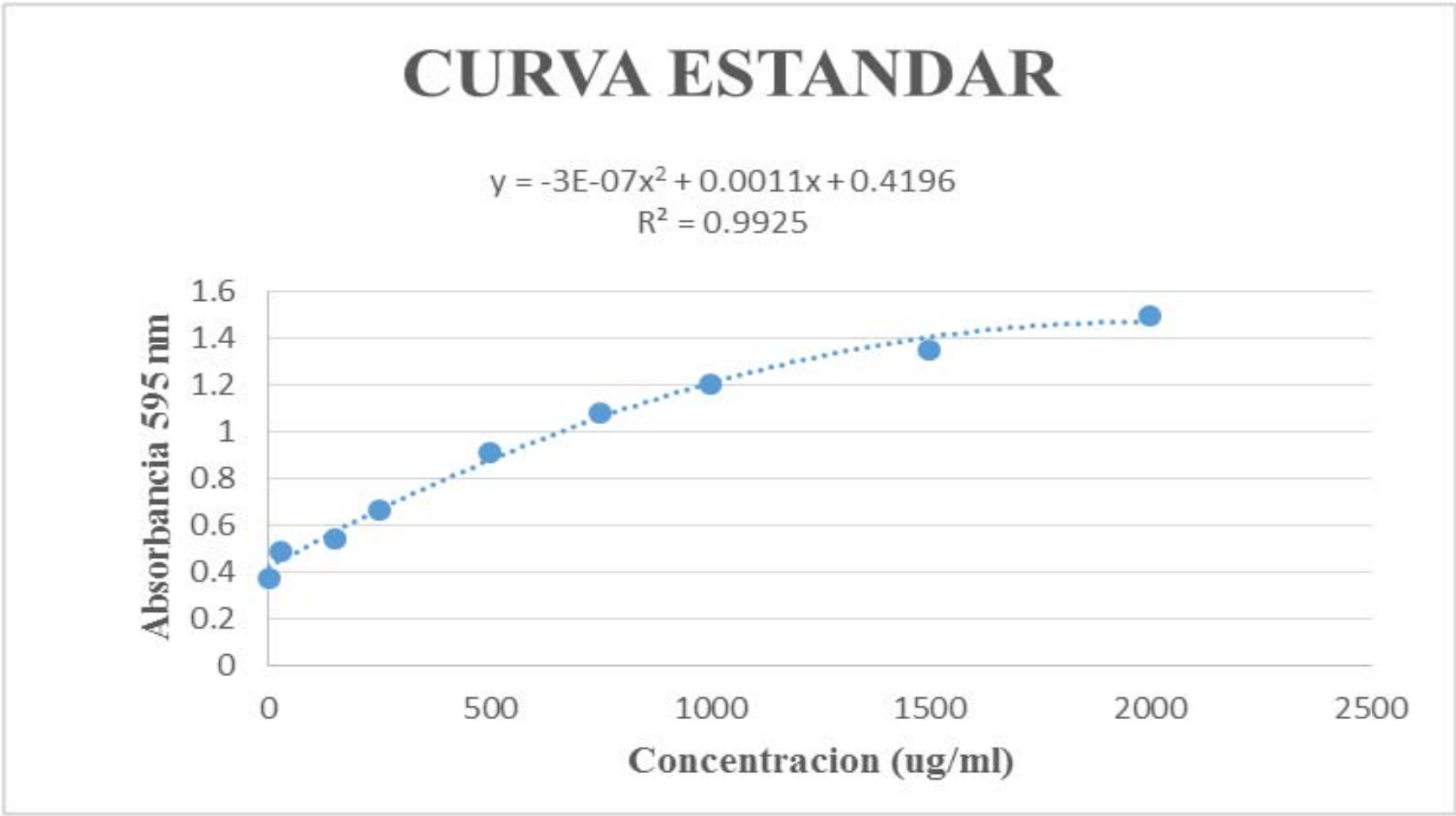


Figura B – 4. 1: Curva de absorbancia de albumina diluída (BSA)

Con la ecuación resultante de la Figura B – 4.1 se encontraron los valores de concentración de proteínas solubles en las muestras (ver Tabla B – 4.2).

Tabla B – 4. 2. Determinación de proteína soluble en sacha inchi

MUESTRA	Dilución	ABSORBANCIA		ABSORBANCIA PROMEDIO	ABSORBANCIA CORREGIDA	Rango de 100 - 1500
		REPETICION 1	REPETICION 2			Proteína soluble (µg/ml)
TORTA 1	1/8	0,842	0,864	0,853	0,477	449,217 ± 0.016
	1/16	0,726	0,703	0,715	0,339	291,437± 0.016
TORTA 2	1/8	0,842	0,853	0,848	0,472	442,610± 0.008
	1/16	0,674	0,577	0,626	0,250	198,062± 0.069
TORTA 3	1/8	0,837	0,838	0,838	0,462	430,677± 0.001
	1/16	0,662	0,655	0,659	0,283	232,049± 0.005
SEMILLA 1	1/8	0,767	0,767	0,767	0,391	349,270± 0.000
	1/16	0,619	0,628	0,624	0,248	196,025± 0.006
SEMILLA 2	1/8	0,718	0,781	0,750	0,374	329,745± 0.045
	1/16	0,631	0,659	0,645	0,269	218,059± 0.020
SEMILLA 3	1/8	0,689	0,746	0,718	0,342	294,683± 0.040
	1/16	0,626	0,642	0,634	0,258	206,749± 0.011

Tabla B – 4. 3: Determinación de proteína soluble en controles positivos

	Dilución	ABSORBANCIA		ABSORBANCIA PROMEDIO	ABSORBANCIA CORREGIDA	Rango de 100 - 1500
		REPETICION 1	REPETICION 2			Proteína soluble (µg/ml)
SOYA	1/16	1,071	1,171	1,121	0,745	822,173 ± 0.071
	1/64	0,661	0,646	0,6535	0,278	226,853 ± 0.011
RICIN	1/8	0,696	0,738	0,717	0,341	198,062 ± 0.030
	1/16	0,609	0,547	0,578	0,202	430,677 ± 0.044

Tabla B – 4.4. Proteína soluble en la dilución hemoaglutinante de sacha inchi

	Ultima dilución hemoaglutinante	Concentración de proteína soluble (µg/ml)	Concentración promedio de proteína soluble (µg/ml)
TORTA 1	**1/32**	145,7185	120,2581
TORTA 2	**1/32**	99,0312	
TORTA 3	**1/32**	116,0246	
SEMILLA 1	**1/64**	49,0063	106,2508
SEMILLA 2	**1/16**	218,0590	
SEMILLA 3	**1/64**	51,6872	

Tabla B – 4. 5: Proteína soluble en la dilución hemoaglutinante de ricina y soya

	Ultima dilución hemoaglutinante	Concentración de proteína soluble (µg/ml)
RICIN	**1/4**	792,2495
SOYA	**1/32**	215,3386

ANEXO B – 5: RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE PROTEÍNAS SOLUBLES POR EL MÉTODO LOWRY EN EXTRACTOS DE ELECTROFORESIS

Se determinó proteína soluble en muestras de semilla u torta de sacha inchi mediante el método de Lowry con rango de 0 a 1 mg/ml.

Tabla B – 5.1: Puntos de la curva estándar para la determinación Proteica con Método de Lowry

Concentración de BSA (mg/ml)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	ABSORBANCIA PROMEDIO	ABSORVANCIA CORREGIDA
1	0,2990	0,3220	0,2990	0,3067	0,2363
0,75	0,2700	0,2720	0,2800	0,2740	0,2037
0,5	0,2150	0,2150	0,2110	0,2137	0,1433
0,25	0,1550	0,1610	0,1680	0,1613	0,0910
0,125	0,1300	0,1320	0,1300	0,1307	0,0603
0,0625	0,0890	0,1040	0,0890	0,0940	0,0237
0	0,0710	0,0690	0,0710	0,0703	0,0000

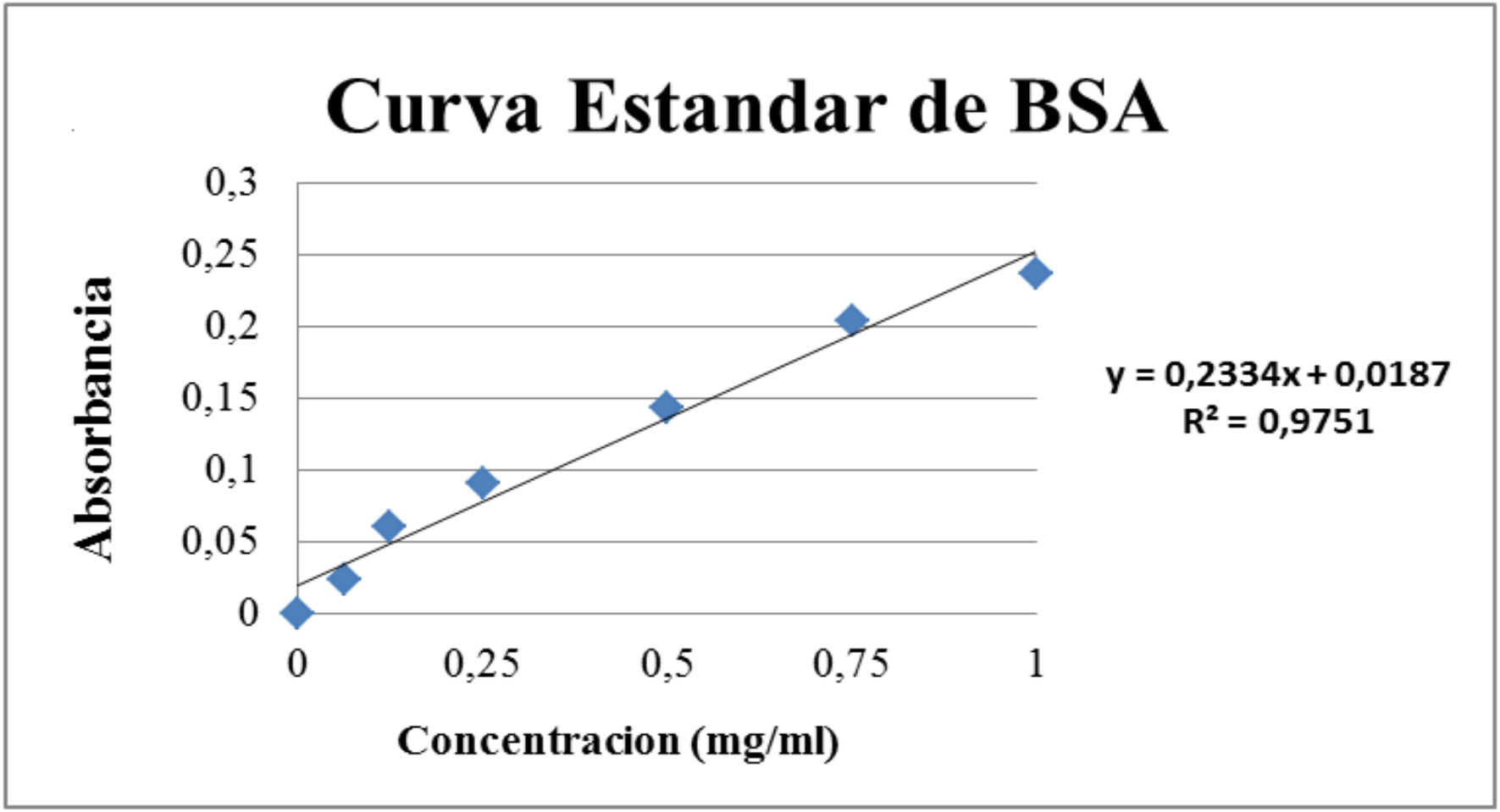


Figura B – 5. 1: Curva estándar de BSA para Método de Lowry (0 – 1 mg/ml)

Reemplazando los valores de absorbancia en la ecuación de la recta lineal de la Figura B – 5.1 para el método de Lowry se encontraron los valores de proteínas solubles en mg/ml.

Tabla B – 5. 2: Contenido de proteína soluble en semilla de sacha inchi y semilla a 60ºC por 4 horas

	SEMILLA			Semilla 60°C por 4 horas		
SOLUCION DILUIDA 1:10	**SEMILLA 1**	**SEMILLA 2**	**SEMILLA 3**	**SEMILLA 60°C 1**	**SEMILLA 60°C 2**	**SEMILLA 60°C 3**
Repetición 1	0,143	0,152	0,131	0,154	0,197	0,156
Repetición 2	0,149	0,135	0,136	0,166	0,165	0,159
Promedio	0,146	0,1435	0,1335	0,16	0,181	0,1575
Promedio corregido	0,0756	0,0731	0,0631	0,0896	0,1106	0,0872
Concentración (mg/ml)	0,2441	0,2334	0,1905	0,3041	0,394	0,2933
Concentración en EXTRACTO (mg/ml)	2,4407	2,3336	1,9052	3,0406	3,9403	2,9334
Promedio	2,2265			3,3048		
Desviación Estándar	0,2834			0,5530		

Tabla B – 5. 3: Contenido de proteína soluble en sacha inchi tostado a 150ºC y torta de sacha inchi

	SEMILLA TOSTADA			TORTA		
SOLUCIÓN DILUIDA 1:10	**TOSTADO 1**	**TOSTADO 2**	**TOSTADO 3**	**TORTA 1**	**TORTA 2**	**TORTA 3**
Repetición 1	0,113	0,125	0,133	0,127	0,119	0,112
Repetición 2	0,098	0,121	0,099	0,113	0,114	0,123
Promedio	0,1055	0,123	0,116	0,12	0,1165	0,1175
Promedio corregido	0,0352	0,0527	0,0457	0,0497	0,04617	0,0472
Concentración (mg/ml)	0,0705	0,1455	0,1155	0,1327	0,1177	0,1219
Concentración en EXTRACTO (mg/ml)	0,7055	1,4552	1,1554	1,3268	1,1768	1,2197
Promedio	1,1054			1,2411		
Desviación Estándar	0,3773			0,0773		

Tabla B – 5. 4: Contenido de proteína soluble en sacha inchi con tostado casero y ricina

	SEMILLA TOSTADO CASERO			RICINA		
SOLUCIÓN DILUIDA 1:10	**SEMILLA CASERA 1**	**SEMILLA CASERA 2**	**SEMILLA CASERA 3**	**RICINA 1**	**RICINA 2**	**RICINA 3**
Repetición 1	0,089	0,099	0,089	0,151	0,137	0,149
Repetición 2	0,098	0,089	0,098	0,143	0,166	0,133
Promedio	0,0935	0,094	0,0935	0,147	0,1515	0,141
Promedio corregido	0,0232	0,0237	0,0232	0,0767	0,0812	0,0707
Concentración (mg/ml)	0,0192	0,0213	0,0192	0,2484	0,2676	0,2227
Concentración en EXTRACTO (mg/ml)	0,1914	0,2128	0,1914	2,4836	2,6764	2,2265
Promedio	0,1985			2,4622		
Desviación Estándar	0,0124			0,2257		

Tabla B – 5. 5: Contenido de proteína soluble en maní y tarwi

	MANI			TARWI		
SOLUCIÓN DILUIDA 1:10	**MANÍ 1**	**MANÍ 2**	**MANÍ 3**	**TARWI 1**	**TARWI 2**	**TARWI 3**
Repetición 1	0,147	0,137	0,137	0,181	0,174	0,168
Repetición 2	0,138	0,137	0,135	0,18	0,168	0,173
Promedio	0,1425	0,137	0,136	0,1805	0,171	0,1705
Promedio corregido	0,0722	0,0667	0,0657	0,1102	0,1007	0,1002
Concentración (mg/ml)	0,2291	0,2055	0,2012	0,3919	0,3512	0,3491
Concentración en EXTRACTO (mg/ml)	2,2908	2,0551	2,0123	3,9189	3,5119	3,4904
Promedio	2,1194			3,6404		
Desviación Estándar	0,1500			0,2414		

ANEXO B - 6: RESULTADO DE PRUEBA CUTANEA DE ALERGIA A SACHA INCHI (PRICK TEST).

Dr. JAVIER R. PÉREZ ROJAS
Especialista en Inmunología y Alergia
CMP: 33995 RNE: 20090/20649

PRUEBA CUTÁNEA DE ALERGIA (prick test)

Nombre: Juan Ricardo Mathuira Chipana
Edad: 3 AÑOS. Diagnóstico: Hipersensibilidad a Sacha Inchi
Reactivo: Natural
Fecha: 12-04-13

ALIMENTOS : Sacha Inchi	RESULTADO
1. Torta	
2.	
3. Cáscara	
4.	
5.	
6. Semilla	
7.	
8. Aceite	0
9.	
10.	
11.	
12. Control negativo (ClNa 9%)	0
13.	
14. Histamina (10mg/ml)	

Comentario:
- Sensibilizando a Torta, cáscara y Semilla de Sacha inchi.
- No sensibilizado a aceite de Sacha inchi.

Atentamente

Javier R. Pérez Rojas
Inmunología Clínica y Alergia
CMP: 33995 RNE: 20090

Alergológica
Especialistas en Alergia e Inmunología Clínica
Calle Los Higos 166. La Molina (Esp. Metro La Molina). Teléfono: 436-2575

PRUEBA CUTÁNEA DE ALERGIA

Nombre: Juan Ricardo Maihuire Chipana Edad: 38 a.
Diagnóstico: IgE:
Fecha: 20/08/13

Alergeno	Resultado
ÁCAROS	
D. pteronyssinus	12mm
D. farinae	11 mm
Blomia tropicalis	4mm
Ácaros de depósito	4mm
EPITELIO	
Perro	(-) [illegible]mm
Gato	4mm
Conejo / Hámster	(-) / (-)
PLUMAS	
Canario / Periquito	(-) / (-)
HONGOS	
Alternaria / Cladosporium	(-) / (-)
Aspergillus / Penicillium	(-) / (-)
Pullularia / Rhizopus	(-) / (-)
Fusarium / Mucor	(-) / (-)
Phoma	(-)
POLENES	
Árboles de parque / Mz. 10 árboles	(-) / (-)
Olivo / Eucalipto	(-) / (-)
Gramíneas / Mz. Pastos	(-) / (-)
Ambrosía / Diente de León	(-) / (-)
CUCARACHA	
Blatella germánica / P. Americana	/ (-) 6mm
CONTROLES	
Positivo / Negativo	/ (-) 7mm / 0

Responsable del procedimiento y colegiatura:

Dr. Javier P. Perez Rojas
Medicina Interna - II
Inmunología y Alergia
20649

ANEXO C – 1: ANALISIS ESTADISTICO

Tabla C – 1.1: Análisis de varianza en el contenido de humedad en muestras de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Semilla	3	20.09	6.6967	0.09663
Semilla tostada	3	17.12	5.7067	0.12213
Torta	3	11.77	3.9233	0.20723
Torta 60°C	3	10.39	3.4633	0.05623

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	20.6627583	3	6.8876	57.1307	9.5577E-06	4.0662
Dentro de los grupos	0.96446667	8	0.1206			
Total	21.627225	11				

Conclusión:

F = 57.13 es mayor que 4.06

Por lo tanto existe diferencia significativa entre los tratamientos de sacha inchi

Tabla C - 1.2: Análisis de varianza en el contenido de cenizas en muestras de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Semilla	3	7.89	2.63	0.0001
Semilla tostada	3	9.3	3.1	0.0009
Torta	3	10.44	3.48	0.0049
Torta 60°C	3	8.1	2.7	0.0009

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	1.3958	3	0.4652	273.6912	2.1252E-08	4.0662
Dentro de los grupos	0.0136	8	0.0017			
Total	1.4095	11				

Conclusión:

F = 273.69 es mayor que 4.07

Por lo tanto, existe diferencia significativa entre los tratamientos de sacha inchi.

Tabla C – 1.3: Análisis de varianza en el contenido de grasa en muestras de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Semilla	3	147.43	49.1433	8.2656
Semilla tostada	3	158.34	52.78	7.0225
Torta	3	134.28	44.76	0.0144
Torta 60°C	3	144.63	48.21	0.5476

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	97.8134	3	32.6045	8.2282	0.0079	4.0662
Dentro de los grupos	31.7003	8	3.9625			
Total	129.5137	11				

Conclusión:

F = 8.22 es mayor a 4.066

Por lo tanto, existe diferencia significativa entre los tratamientos de sacha inchi.

Tabla C – 1.4: Análisis de varianza de Actividad del inhibidor de tripsina en muestras sin desgrasar y sin tratamientos térmicos de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Semilla	3	103	34.3333	121.6342
Torta	3	129.565	43.1883	100.6202

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	117.616	1	117.6165	1.0584	0.3617	7.7086
Dentro de los grupos	444.5088	4	111.1272			
Total	562.1253	5				

Conclusión:

F = 1.05 es menor que 7.708

Por lo tanto, no existe diferencia significativa entre la actividad inhibitoria de tripsina de la semilla desgrasada con la torta desgrasada.

Tabla C – 1.5: Análisis de varianza de actividad de inhibidor de tripsina en muestras desgrasadas de semilla de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Semilla	4	150.9	37.725	137.0612
Torta	4	135.38	33.845	38.5657

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	30.1088	1	30.1088	0.3429	0.5795	5.9874
Dentro de los grupos	526.8808	6	87.8135			
Total	556.9896	7				

Conclusión:

F = 0.3428 es menor que 5.98

Por lo tanto, no existe diferencia significativa entre la actividad inhibitoria de tripsina de la semilla desgrasada con la torta desgrasada.

Tabla C - 1.6: Análisis de varianza del ccomportamiento hemaglutinante en semilla y torta de sacha inchi

RESUMEN

Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
TORTA	3	15	5	0
SEMILLA	3	16	5.3333	1.3333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*	*Valor crítico para F*
Entre grupos	0.1667	1	0.1667	0.25	0.6433	7.7086
Dentro de los grupos	2.6667	4	0.6667			
Total	2.8333	5				

Conclusión:

F = 0.3428 es menor que 5.98

Por lo tanto, no existe diferencia significativa entre la actividad inhibitoria de tripsina de la semilla desgrasada con la torta desgrasada.

ANEXO D – 1: ESPECIFICACIONES DE LOS EQUIPOS UTILIZADO PARA WESTERN BLOTTING

a) Cámara de electroforesis vertical

La cámara vertical compacta es ideal para corridas de proteínas con un gel de 10x14cm, en dos lados. La cámara superior de buffer se extiende a todo lo largo del gel para distribuir el calor uniformemente ofreciendo excelentes resultados.

Incluye dos peines y juego de espaciadores de 0.8mm grosor. Los peines estándares son de 15 pozos de 0.5mm grosor. Cámara superior e inferior, Cubierta Super safe™ con cables, dos placas de vidrio y par de pinzas. Dimensiones de 18cm largo x 8cm de ancho x 13 cm de alto.

b) Pierce ECL Western Blotting Substrato, 32109 (kit 50 ml)

c) Cassette X-RAY

d) Liquido revelador - Marca KODAK

Fijador Kodak para máquinas automáticas. También puede utilizarse en reveladoras de sistema manual. Presentación: Liquido A x 4,75 Lts. +

Liquido B x 0,45 Lts + Liquido C x 0,45 Lts

Parte A

Componentes peligrosos:

Carbonato de potasio [%]: 5,0 - 10,0

Hidroquinona [%]: 5,0 - 10,0

Dietilenglicol [%]: 5,0 - 10,0

EDTA-sal de sodio [%]: 0,5 - 1,0

Estado físico: Líquido.

Color: Pardusco

Olor: Débil olor

Parte B

Componentes peligrosos

Dietilenglicol [%]: 60,0 - 80,0

Ácido acético [%]: 25,0 - 30,0

1-Fenil-3-pirazolidona [%]: 2,5 - 5,0

Estado físico: Líquido.

Color: Incoloro.

Olor: Olor a ácido acético

Parte C

Esta preparación no está clasificada como peligrosa según las Directivas de la CE y a la legislación nacional correspondiente. Normalmente no se dará ninguna situación peligrosa por el uso que un profesional haga de este producto siempre que siga las instrucciones para su correcto almacenamiento y manejo.

Estado físico: Líquido.

Color: Incoloro.

Olor: Casi sin olor

e) Liquido fijador - Marca KODAK

Fijador Kodak para maquinas automaticas. También puede utilizarse en reveladoras de sistema manual. Presentación: Liquido A x 4,75 Lts. + Liquido B x 0,95 Lts.

Parte A

Componentes

Agua: 45 – 50%

Tiosulfato de amônio: 35-40 %

Ácido acético: 1 – 5 %

Tiosulfato sódico: 1 – 5 %

Sulfito sódico: 1 – 5 %

Forma física: líquido

Color: amarillo claro

Olor: amoníaco

Parte B

Componentes

Agua: 85 – 90 %

Sulfato de alumínio: 10 – 15 %

Forma física: líquido

Color: incoloro

Olor: inodoro.