



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



Evaluación del grado de Digestibilidad gastrointestinal, Actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de Aislados proteicos de torta de sésamo (*Sesamum indicum*).

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

Este trabajo es parte del proyecto: “**Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de *Amaranto* y *Quinoa* para la elaboración de un alimento funcional**” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1373-CU-P-2014. Coordinado por el Dr. Ismael Carrillo PhD.

Autora: Tatiana Nathaly Poveda Loayza
Tutor: PhD. Willman Ismael Carrillo Terán

AMBATO – ECUADOR

Julio - 2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

Wilman Ismael Carrillo Terán, PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 14 de junio del 2016



Carrillo Terán, Wilman Ismael Ph.D

C.I. 17570800-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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



Tatiana Nathaly Poveda Loayza

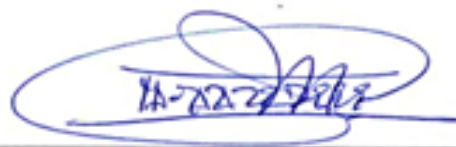
C.I.172050620-1

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dra. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I. 180413557-0



Mg. Yunys Pérez Betancourt

C.I.175647274-0

Ambato, 6 de julio del 2016.

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Tatiana Nathaly Poveda Loayza

C.I.172050620-1

AUTORA

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a toda mi familia, pilar fundamental en mi vida:

A mis padres por todo su esfuerzo y amor incondicional que me han brindado para
cumplir mis sueños.

A mis hermanos: Andre, Sofi, Rodri y karencita que son los regalos más importantes y
hermosos que mis padres me han regalado.

A mi abuelita Marthita que ha estado presente en cada momento con su cariño y ternura.

A Jonathan, que ha mas de ser mi novio, es mi mejor amigo que me ha aconsejado y
brindado mucho apoyo en todo este tiempo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que he recibido a lo largo de mi vida.

A mi familia, que han confiado en mí y me han apoyado para llegar a cumplir mis metas, en especial a mi mamá que siempre estuvo presente con su sacrificio y amor, también a mi papi que con su ejemplo de lucha y constancia me ha inspirado para seguir adelante.

A mis tíos Mary y Pablo, por sus consejos y por brindarme su cariño en todo momento.

Al Doctor Ismael Carrillo, que depositó en mí su confianza para desarrollar este trabajo bajo su tutoría y que además de ser un excelente profesional es una gran persona lleno de virtudes dignas de admirar.

A todos mis amigos y compañeros por todas las vivencias y lo que hemos compartido dentro y fuera de las aulas de clase que siempre estarán en mi memoria.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA	1
1.1 TEMA DE LA INVESTIGACIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	1
1.3 OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	4
2.2 HIPÓTESIS	8
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO III	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 MATERIALES	9
3.1.1 Materia prima.....	9
3.1.2 Equipos	9
3.1.3 Reactivos.....	10
3.1.4 Insumos y utensilios	11
3.2 MÉTODOS:	11
3.2.1 Obtención de la torta de sésamo	11
3.2.2 Desengrasado de la torta de sésamo	11
3.2.3 Análisis proximal.....	12
3.2.4 Obtención de aislados proteicos de sésamo:.....	12
3.2.5 Caracterización de los aislados proteicos:	15
3.2.5.1 Cuantificación proteica:	15
3.2.5.2 Electroforesis SDS-PAGE y Native- PAGE:.....	16
3.2.5.3 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro:.....	18
3.2.6 Actividad antioxidante de los aislados proteicos:.....	18
3.2.7 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos:.....	19
3.2.8 Análisis estadístico y Diseño experimental:	20
CAPÍTULO IV	22

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
4.1.1 Análisis proximal.....	22
4.1.2 Obtención de aislados proteicos y cálculo del rendimiento.....	23
4.1.3 Caracterización de los aislados proteicos	26
4.1.3.1 Cuantificación proteica	26
4.1.3.2 Electroforesis Native-PAGE y SDS-PAGE:.....	27
4.1.4 Digestibilidad gastrointestinal in vitro.....	32
4.1.5. Actividad antioxidante de los aislados proteicos de sésamo	35
4.1.6 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de sésamo.	38
CAPÍTULO V	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
5.1 CONCLUSIONES.....	42
5.2 RECOMENDACIONES	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos aplicados para el análisis proximal de la torta de sésamo.....	12
Tabla 2. Análisis proximal de la torta de sésamo.....	22
Tabla 3. Rendimiento de los aislados proteicos de sésamo sin dializar y dializados obtenidos mediante el método 2, a diferentes pHs de precipitación	24
Tabla 4. Rendimiento de los aislados proteicos de sésamo obtenidos mediante dos métodos y a diferentes pHs de precipitación	24
Tabla 5. Contenido proteico de los aislados obtenidos a diferentes pHs de precipitación ..	27
Tabla 6. Actividad antioxidante de los aislados proteicos precipitados a diferentes pHs....	36
Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos precipitados a diferentes pHs	39
Tabla 8. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación, por réplica (Método: 1).....	52
Tabla 9. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación, por réplica (Método: 2).....	52
Tabla 10. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación (Método: 2, muestras dializadas)	53
Tabla 11. Comparación entre muestras sin dializar y dializadas, a todos los pHs ensayados	53
Tabla 12. Análisis de varianza para el rendimiento proteico (%).....	54
Tabla 13. Comparación entre pHs. Método 1 (agua): respuesta experimental: rendimiento proteico (%)	55
Tabla 14. Comparación entre pHs. Método 2 (NaCl 1M): respuesta experimental: rendimiento proteico (%)	55
Tabla 15. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 3.....	56
Tabla 16. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 4.....	56
Tabla 17. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 5.....	57
Tabla 18. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 6.....	57
Tabla 19. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 7.....	57

Tabla 20. Datos para la construcción de la curva estándar de albúmina de suero bovina (BSA)	59
Tabla 21. Valores de absorbancia de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, medidos a 540 nm	60
Tabla 22. Cálculo del contenido proteico (%) de la proteína de sésamo precipitada a diferentes pHs.....	60
Tabla 23. Análisis de varianza del contenido proteico de la proteína de sésamo	60
Tabla 24. Comparación de medias entre los contenidos proteicos de la proteína de sésamo precipitada a diferentes pHs	61
Tabla 25. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, sometidos a la reacción con aceite oxidado y ácido tiobarbitúrico	63
Tabla 26. Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs.....	64
Tabla 27. Actividad antioxidante (%) de diferentes concentraciones del estándar BHT.....	64
Tabla 28. Análisis de varianza. Diseño experimental a*b	65
Tabla 29. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 100 (µg/ml).....	65
Tabla 30. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 200 (µg/ml).....	66
Tabla 31. Comparación entre pH a una conc. proteica de 500 (µg/ml)	66
Tabla 32. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 1000 (µg/ml).....	67
Tabla 33. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH3.....	67
Tabla 34. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH4.....	68
Tabla 35. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH5.....	68
Tabla 36. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH6.....	69
Tabla 37. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH7.....	69
Tabla 38. Comparación entre las concentraciones del control BHT.....	70
Tabla 39. Análisis de varianza entre los Tratamientos: pH y concentración proteica	70
Tabla 40. Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antioxidante)	71
Tabla 41. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, sometidos a reacción con albúmina de huevo.....	73

Tabla 42. Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs	74
Tabla 43. Actividad antiinflamatoria (%) de diferentes concentraciones del estándar Diclofenaco	74
Tabla 44. Análisis de varianza. Diseño experimental a*b	75
Tabla 45. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 100 (µg/ml).....	75
Tabla 46. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 200 (µg/ml).....	76
Tabla 47. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 500 (µg/ml).....	76
Tabla 48. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 1000 (µg/ml).....	77
Tabla 49. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH3.....	77
Tabla 50. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH4.....	78
Tabla 51. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH5.....	78
Tabla 52. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH6.....	79
Tabla 53. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH7.....	79
Tabla 54. Comparación entre las concentraciones de Diclofenaco.....	80
Tabla 55. Análisis de varianza entre los Tratamientos: pH y concentración proteica	80
Tabla 56. Prueba de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antiinflamatoria).....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de aislados proteicos de la torta de sésamo, método 1	13
Figura 2. Obtención de aislados proteicos de la torta de sésamo, método 2	15
Figura 3. Aislados proteicos de la torta de sésamo obtenidos con el método 1	23
Figura 4. Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción.....	28
Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción	29
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2- β -mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción	30
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 2 de extracción (NaCl 1M).....	31
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de la simulación gástrica de aislados proteicos de sésamo precipitados a pH 7,0; mediante el método 1 de extracción (H2O)	33
Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol. Comparación de la simulación gástrica y duodenal de aislados proteicos de sésamo precipitados a pH 7,0; mediante el método 1 de extracción (H2O)	34
Figura 10. Actividad antioxidante (%) de aislados proteicos precipitados a diferentes pHs y a distintas concentraciones ensayadas, con respecto al patrón (BHT)	37
Figura 11. Actividad antiinflamatoria (%) de aislados proteicos precipitados a diferentes pHs y a distintas concentraciones ensayadas, con respecto al patrón (Diclofenaco).....	41
Figura 12. Curva estándar de albúmina de suero bovina (BSA).....	59

RESUMEN

Esta investigación se basó en la extracción, caracterización, estudio de la digestibilidad gastrointestinal y actividades biológicas (antioxidante y antiinflamatoria) de las proteínas presentes en la torta de sésamo.

Se realizó la extracción de la proteína por precipitación isoelectrica, utilizando agua y solución de NaCl 1M como solventes, a diferentes pHs de precipitación: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0. Con el pH 7,0 se obtuvo un mayor rendimiento proteico: 14,73 y 17,21%, utilizando agua y sal, respectivamente.

Se identificó el perfil de proteínas presentes en los aislados, encontrando bandas entre: 6,5 y 50 KDa con la técnica de electroforesis SDS-PAGE, en este gel se observó albúminas 2S, globulinas 7S, subunidades ácidas y básicas de globulinas. Las bandas de proteínas identificadas con Native PAGE presentaron pesos moleculares entre: 35 y 198 KDa.

Las proteínas de sésamo fueron sometidas a hidrólisis gástrica a pHs: 1,2; 2,0; 3,2; 4,5; 5,5 y analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE. Los aislados se hidrolizaron a pH 1,2 y 2,0 con la acción de la pepsina, mientras que a los demás pHs la enzima gástrica no presentó actividad. La digestión duodenal se llevó a cabo a pH 3,2; donde las proteínas fueron hidrolizadas casi en su totalidad con excepción de una banda proteica de 15 KDa.

Finalmente se determinó que las proteínas precipitadas a pH 7,0 y con una concentración de 500 µg/ml, presentan mayor actividad antioxidante con un valor de: 31,26%; mientras que con una concentración de 1000 µg/ml, estas proteínas tienen mayor efecto antiinflamatorio en relación a los demás pHs y concentraciones proteicas ensayadas, con un valor de: 43,23%.

Palabras Clave: sésamo, proteínas, digestibilidad gastrointestinal, electroforesis, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The extraction, characterization, gastrointestinal digestibility and biological activities (antioxidant and anti-inflammatory) of the proteins present in defatted sesame flour were evaluated in this study.

The protein extraction by isoelectric precipitation was obtained, using water and 1M salt solution (NaCl) as solvents, at different pHs of precipitation: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 and 7,0. The higher protein yield was obtained with protein isolate precipitated at pH7,0 with values of 14,73 and 17,21%, for water and salt methods, respectively.

Protein profiles present in the isolates were identified with bands between 6.5 and 50 KDa with the SDS-PAGE electrophoresis method. 2S albumins, 7S globulins, and subunits acidic and basic of globulins were observed.

Sesame proteins were submitted to gastric hydrolysis at pHs: 1,2; 2,0; 3,2; 4,5; 5,5 and were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Isolates at pH 1.2 and 2.0 with pepsin action were hydrolyzed. This gastric enzyme had no activity at other pHs, isolates remained intact. Duodenal digestion was carried out at pH 3,2. Proteins were hydrolyzed almost entirely except for the 15 kDa protein band.

Finally, protein precipitated at pH 7,0 with a concentration of 500 µg/ml, was the best treatment, presenting the highest antioxidant activity. Using the same pH with 1000 µg/ml of protein concentration, the protein isolate had higher anti-inflammatory activity respected to the other pHs and protein concentrations tested, with a value of: 43.23 %.

Keywords: sesame, proteins, gastrointestinal digestibility, electrophoresis, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El sésamo (*Sesamum indicum*), más conocido en Latinoamérica como ajonjolí, es una planta perteneciente a la familia Pedaliaceae que puede alcanzar hasta 1,5 metros de altura y se desarrolla en climas cálidos, sus frutos son algodonosos con forma de cápsula, en su interior se encuentran las semillas que tienen de 2 a 5 mm de longitud, pueden ser de color marrón, rojo, negro o blanco (**Chiriboga, 2013**).

Esta oleaginosa es cultivada en países tropicales (**Onsaard y col., 2010**), se da principalmente en América central, África tropical y en el este de Asia, con una producción mundial para el año 2011 de 4 millones de toneladas (**FAOSTAT, 2011**), Tailandia produjo 48840 toneladas métricas, por lo que el sésamo se convirtió en el cultivo más importante de este país (**Singharaj y Onsaard, 2015**).

En el Ecuador, la explotación comercial del sésamo inició en el año 1960, se realizaron importaciones de países como: Venezuela, Colombia y Nicaragua, siendo las variedades más relevantes: Aceitera, Precoz, Chino Rojo, Venezuela 51, entre otras. Este cultivo se desarrolla especialmente en la provincia de Manabí, su forma de consumo es tostado, se utiliza en panadería y para decorar dulces tradicionales de la provincia (**Rodríguez, 2011**). El INIAP ha mejorado el rendimiento de este cultivo, aplicando algunas técnicas de siembra en sus estaciones experimentales de Portoviejo y Babahoyo, potenciando el desarrollo de dos variedades comerciales: Portoviejo 1 y Aceitosa (**INIAP, 1974**).

Gandhi y Srivastava (2007), indican que las semillas de sésamo son utilizadas por las industrias como materia prima para extracción del aceite, debido a su alto rendimiento y calidad nutricional.

Estas semillas son una fuente importante de proteínas, su contenido varía entre el 17 y 23%, con una gran cantidad de metionina, del 42 al 50% de aceite (oleico y linoleico) y del 4 al 7% de cenizas (**Balderrama, 2010**).

La torta de sésamo, es un subproducto obtenido a partir de la extracción del aceite, éste es usado para la alimentación animal ya que contiene aproximadamente 50% de proteína (**Espinal, 2006**), también se puede obtener concentrados o aislados proteicos que están siendo estudiados especialmente en Tailandia y Canadá, en pro del mejoramiento de la nutrición humana. Los aislados proteicos vegetales, en general se obtienen mediante solubilización ácida o alcalina, después de la extracción de su aceite (**López y col., 2003**), el uso de proteínas vegetales ha incrementado en la industria alimentaria, debido a su alto valor proteico, buenas propiedades funcionales y bajo contenido de anti nutrientes (**Abugoch y col., 2008**).

Según **Achouri y col. (2012)**, la mayoría de las proteínas presentes en las semillas de sésamo son de almacenamiento compuestas de globulinas (67,3%), albúminas (8,6%), prolaminas (1,4%) y glutelinas (6,9%), existiendo otras en menor porcentaje. En tal virtud, la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, es la más idónea para caracterizar proteínas de sésamo, su uso es práctico y confiable, ya que las proteínas de almacenamiento son extremadamente susceptibles a fluctuaciones ambientales (**Akbar y col., 2012**). También este método es rápido y económico a nivel de muestra, puesto que se requieren microgramos de proteína (**Arias, 2013**).

Es importante determinar el contenido proteico de vegetales como un conocimiento inicial para realizar estudios más profundos como: caracterización, propiedades fisicoquímicas, funcionales y de digestibilidad. Existen algunos métodos colorimétricos para la cuantificación proteica, los más conocidos son: Biuret, Lowry, Bradford y BCA. El método Biuret es el más simple y económico para la determinación de proteínas solubles, cuyo principio es la formación de un complejo púrpura entre sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos y sales de cobre alcalinas (**Herrera y Bolaños, 2003**), la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de proteínas, esta reacción es bastante específica, por lo tanto existe poca interferencia de sustancias no proteicas (**Segal y Ortega, 2005**).

Las propiedades funcionales y fisicoquímicas que presentan los aislados proteicos de sésamo, hacen de éstos, importantes ingredientes para ser utilizados como suplementos nutricionales en bebidas, en productos de panadería y confitería (**Achouri y col., 2012**). También, los hidrolizados proteicos que se obtienen mediante tratamientos con enzimas, son ampliamente usados en tecnologías alimentarias debido a que se potencian las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas originales (**Benítez y col., 2008**). Cuando se aplica un proceso de hidrólisis, se consigue la ruptura de enlaces, el peso molecular de las proteínas disminuye, su carga aumenta y se liberan grupos hidrofóbicos. Estos cambios a nivel molecular influyen en el aumento de la digestibilidad y disminución de la alergenicidad (**Wang y col., 2006**), por otro lado, se liberan péptidos bioactivos, los cuales están siendo objeto de estudio para determinar actividades biológicas y su posible aplicación en alimentos como ingredientes funcionales (**Hong y col., 2008**), o aplicaciones clínicas en la reducción de determinados problemas de salud (**Sato y col., 2006**).

Las actividades biológicas: antioxidante y antiinflamatoria, han sido estudiadas tanto en extractos, como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales, ya que presentan grandes beneficios para la salud. Particularmente, se ha incrementado el interés por las sustancias antiinflamatorias de origen vegetal, porque los antiinflamatorios clásicos provocan efectos secundarios en el organismo (**Gómez y col., 2011**).

Según **Reyes (2011)**, los antioxidantes son compuestos que inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al oxígeno ya que donan sus hidrógenos a éstos y protegen las células contra el daño de los radicales libres. Por otro lado, los antiinflamatorios se utilizan para prevenir o disminuir inflamación en los tejidos, ya que impiden o inhiben la biosíntesis de sus agentes mediadores, conocidos como eicosanoides o derivados del ácido araquidónico (**Henriques y col., 2014**).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de la Investigación

Evaluación del grado de digestibilidad gastrointestinal, actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de aislados proteicos de torta de sésamo (*Sesamum indicum*).

1.2 Justificación

El sésamo (*Sesamum indicum*), es un cultivo oleaginoso, cuyas semillas son ricas, no solo en aceites esenciales, sino también en proteína de alta calidad en un 25% de su composición (**Rodríguez, 2011**) y las industrias dedicadas a la extracción de aceite de este tipo de semillas generan subproductos como la torta de sésamo.

Una de las principales características de esta torta, en relación a otras fuentes proteicas, es su alto contenido en metionina (**Murilla y Cuca, 1969**), por lo que generalmente este residuo industrial es utilizado para la elaboración de productos balanceados que contribuyen a la alimentación animal (**Espinal, 2006**).

Existen estudios de digestibilidad de las proteínas presentes en la torta de sésamo realizados en el Ecuador, en donde se demuestra que este subproducto es una fuente proteica y por ello energética que beneficia el crecimiento y desarrollo de codornices (**Chiriboga, 2013**), pero no existen estudios simulando las condiciones de digestión humana, para determinar el beneficio del consumo de esta torta en niños, jóvenes y adultos de nuestro país, lo que podría promover la producción de alimentos que se

elaboren con aislados proteicos de sésamo o en combinación con otras fuentes proteicas como la soya, quinua o amaranto.

En el Ecuador, este cultivo tiene importancia tanto económica como industrial. Existe un marcado déficit de materia prima para la producción de aceites refinados y confitería, recurriendo así a las importaciones para satisfacer la demanda interna (**Rodríguez, 2011**).

El gobierno ecuatoriano, por medio del Plan Nacional del Buen Vivir **PNBV**, busca erradicar la desnutrición crónica en niños y niñas menores de 2 años y revertir la tendencia de obesidad y sobrepeso en niños y niñas de 5 a 11 años.

Según el **MAGAP (2013)**, en nuestro país el MIES ha puesto en marcha programas de nutrición de niños en escuelas de bajos recursos donde se toma en cuenta al sésamo y otros cultivos como la quinua para promover su consumo en pro de una buena nutrición infantil, por lo que ha aumentado en los últimos años el interés por encontrar fuentes proteicas de origen vegetal que sean económicamente accesibles y de fácil asimilación que podrían de cierta manera sustituir las fuentes proteicas de origen animal.

También la nueva Matriz Productiva pretende realizar cambios para crear una economía diversificada e incluyente, orientada al conocimiento e innovación, impulsando a los sectores estratégicos a no ser únicamente productores de materias primas, sino también generadores de productos con valor agregado, sustituyendo las importaciones por productos capaces de ser competitivos a nivel nacional e internacional (**PNBV 2013-2017**).

Por lo tanto, en este estudio, al aplicar un proceso económico de extracción proteica a nivel de laboratorio y al realizar aportaciones de conocimiento científico confiables, acerca del grado de digestibilidad gastrointestinal y actividades biológicas que podrían presentar los aislados proteicos de sésamo, se contribuye para que las pequeñas y medianas empresas de alimentos, opten por explotar los subproductos generados en la extracción de aceites, creando nuevas líneas de producción como son los alimentos

funcionales o aislados proteicos como producto terminado y de esta manera el sésamo sea una alternativa más de trabajo y de producción, contribuyendo así al mejoramiento socio-económico de la población ecuatoriana.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el grado de digestibilidad gastrointestinal, actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de aislados proteicos de torta de sésamo (*Sesamum indicum*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aislar las proteínas solubles presentes en la torta de sésamo por precipitación isoeléctrica a diferentes pHs.
- Establecer el grado de hidrólisis enzimática de las proteínas de la torta de sésamo simulando condiciones fisiológicas mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.
- Identificar la existencia de actividad antioxidante en los aislados proteicos mediante el método TBARS.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos mediante el método de albúmina desnaturizada.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión de las proteínas, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas con distintos números de aminoácidos (**Oseguera, 2009**).

Orruño y Morgan (2011), estudiaron la resistencia de las principales proteínas de almacenamiento de las semillas de sésamo (albúmina 2S, globulinas: 7S y 11 S), a las enzimas proteolíticas digestivas (pepsina, tripsina y quimotripsina). El grado de proteólisis obtenido se controló por SDS-PAGE.

Bedigian y col. (1985), indicaron que las semillas de sésamo son una importante fuente de aceites (44-58%), proteína (18-25%), e hidratos de carbono (13,5%) que tradicionalmente se consumen de forma directa.

Algunos estudios proporcionan información valiosa sobre la estructura secundaria de las proteínas de sésamo, que podría ser un apoyo importante para una mejor comprensión de la relación entre sus propiedades estructurales y funcionales, de esta manera fomentar la utilización de las proteínas de sésamo como ingrediente en la producción de alimentos funcionales (**Achouri y col., 2013**).

Los aminoácidos que predominan en las semillas de sésamo son: arginina (4,55%), glicina (3,97%), leucina (3,20%) y serina (2,95%). La metionina, que es un aminoácido

esencial limitante se encuentra en un 1,37%, dichos valores fueron encontrados en 93% de materia seca (**Chiriboga, 2013**).

La torta de sésamo, sólido resultante de la extracción del aceite de estas semillas, es un subproducto que por su alto contenido de proteínas se utiliza en la fabricación de alimentos concentrados para animales (**Espinal, 2006**), presentando así del 44 al 50% de proteína, del 10 al 12% de extracto etéreo, 5-7% de fibra cruda y del 5 al 12% de cenizas (**Balderrama, 2010**).

Se han realizado estudios acerca de la influencia del pH y la concentración de sal sobre la solubilidad y algunas propiedades funcionales de los aislados proteicos de sésamo, como por ejemplo **Khalid y col. (2003)**, identificaron que a pH 3,0 y a pH 5,0 se obtiene la máxima y mínima solubilidad, respectivamente. La capacidad emulsionante, la estabilidad de la emulsión, así como la capacidad de formación de la espuma son significativamente afectadas por los niveles de pH y concentraciones de sal. **Achouri y Boye (2012)**, indicaron que la máxima extracción de proteínas de sésamo se dan entre los pH 7,0 y 10,0; en presencia de concentraciones de NaCl entre 0,6 y 1 M. También demostraron que el rendimiento de los aislados incrementa conforme la concentración de sal es más alta y finalmente caracterizaron las proteínas aisladas con cloruro de sodio y sulfato de amonio aplicando la técnica de electroforesis SDS-PAGE, mostrando diferencias en los perfiles proteicos obtenidos.

Onsaard y col. (2010), analizaron proteínas de sésamo extraídas por diferentes métodos a partir de la torta: precipitación con soluciones de sal a diferentes concentraciones y con soluciones alcalinas de pH 7,0 a 12,0. Los resultados de este estudio indican que la solubilidad e índice de actividad de emulsión de las proteínas de sésamo son superiores en comparación a las proteínas de soya.

Singharaj y Onsaard (2015), caracterizaron concentrados de proteínas obtenidas de diferentes variedades de sésamo a partir de precipitación isoeléctrica con agua, determinando así, el rendimiento (40.8% - 41.14%) y contenido proteico (79.85% - 80.92%). También aplicaron la técnica de electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones

reductoras y no reductoras, estableciendo los rangos de peso molecular de las bandas proteicas: 12-39 (KDa) y 42-83 (KDa), respectivamente.

Fukuda y col. (1986), aseguran que las semillas de sésamo contienen antioxidantes naturales tales como sesamina y sesamolina, por esta razón se utilizan como ingredientes activos en antisépticos, bactericidas, viricidas y desinfectantes. También se han realizado estudios de actividad antioxidante, tanto en aislados como en hidrolizados proteicos de sésamo. **Liu y Chiang (2008)**, publicaron valiosas aportaciones científicas acerca de los hidrolizados, estableciendo que éstos poseen alta actividad frente a la eliminación de radicales libres al ser tratados con tripsina e identificaron sus pesos moleculares mediante electroforesis SDS-PAGE, después de su tratamiento con bromelina y tripsina. También se han obtenido hidrolizados proteicos de sésamo con la acción de papaína, para estudiar su solubilidad y peso molecular, encontrando que estos hidrolizados presentan mejores propiedades funcionales que los aislados e incrementa su solubilidad entre el pH 5,0 y 7,0. También se ha determinado que el proceso de hidrólisis reduce significativamente el peso molecular de las proteínas confiriéndoles mayores características nutricionales, funcionales y de digestibilidad (**Bandyopadhyay y Ghosh, 2002**).

Nakano y col. (2006), han establecido conclusiones importantes acerca de la actividad antihipertensiva de péptidos de sésamo. Su estudio se llevó a cabo *in vivo*, sobre ratas hipertensas, identificando que la presión arterial sistólica disminuye al suministrar diferentes dosis de péptidos en polvo. Por lo tanto, estos compuestos bioactivos podrían prevenir o tratar la hipertensión arterial en seres humanos. De igual manera, **Hong y col. (2008)**, corroboraron con su estudio que los péptidos de sésamo disminuyen la presión arterial sin provocar efectos contraproducentes.

Biswas y col. (2010), han evaluado las actividades: hipocolesterolémica y antioxidante en ratas (modelo *in vivo*), determinando que los aislados proteicos de sésamo disminuyen tanto la concentración de colesterol en el plasma como la peroxidación lipídica y también aumentan el colesterol HDL (alta densidad).

En la investigación realizada por **Ranjana y col. (2012)**, se identificó que el sésamo contiene péptidos bioactivos con actividad antibacteriana y presentaron una mayor inhibición sobre el crecimiento de la bacteria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con la gram positiva *Bacillus subtilis*.

Por otro lado, dichos investigadores descubrieron que los péptidos con bajo peso molecular, menor a 1 kDa, fueron más efectivos en comparación con los complejos proteicos e hidrolizados de proteína cruda.

La actividad antiinflamatoria en vegetales, ha despertado en los últimos años un gran interés científico, debido a las graves enfermedades que se desencadenan a partir de inflamaciones crónicas en ciertas partes del organismo. Existen investigaciones realizadas en la sesamina en donde se comprueba que este componente natural del aceite de sésamo posee potente actividad antiinflamatoria y podría evitar o prevenir la evolución de enfermedades que cursan procesos inflamatorios (**Henriques y col., 2014**), pero no se evidencian investigaciones similares desarrolladas en proteínas de esta semilla.

2.2 Hipótesis

¿Existe influencia del pH de precipitación en el rendimiento, actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aislados proteicos de la torta de sésamo?

Hipótesis Nula

Ho: El pH de precipitación no influye en el rendimiento, actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aislados proteicos de la torta de sésamo.

Hipótesis Alternativa

Ha: El pH de precipitación si influye en el rendimiento, actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aislados proteicos de la torta de sésamo.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variables independientes

- Diferentes pH de precipitación proteica.

2.3.2 Variables dependientes

- Rendimiento de aislados proteicos.
- Actividad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas experimentales se realizaron en el laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI, de la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

Las semillas de sésamo con las que se trabajó fueron adquiridas en el mercado Modelo de la ciudad de Ambato y presentaron un color marrón oscuro.

3.1.2 Equipos

- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Balanza VWR-224AC
- Centrífuga, eppendorf Modelo 5702
- Congelador Mabe
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
- Destilador de agua, Easy Linea 150
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- Espectrofotómetro convencional de haz simple Modelo DR-500
- Estufa lan incubator Modelo In-010
- Liofilizador Bench Top Pro Modelo BTP-3ES0VW

- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Microincubador, Esco, Provolcell Shaking
- pHmetro Mettler Toledo y Thermo scientific
- plancha de calentamiento y agitación VWR
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470
- Vortex Mixer VWR

3.1.3 Reactivos

- Ácido acético glacial MERCK
- Ácido tiobarbitúrico APPLICHEM PANREAC
- Azul de bromofenol, # 161-0404, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 161-0158, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 15512-023, Invitrogen BIO-RAD
- Bicarbonato de sodio J.T.BAKER
- Butil hidroxi tolueno (BHT) VULKANOX
- Coctel de enzimas (α -cymotripsina, Tripsina, Lipasa, Colipasa) SIGMA
- Cloruro de sodio J.T. BAKER
- Coomassie blue R, Blue R-250, # 161-011, BIO-RAD
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) # 161-0302, BIO-RAD
- Diclofenaco de sodio (concentración: 50 mg)
- Etanol MERCK
- Estándar de proteínas, Dual Color, # 161-0374, BIO-RAD
- Estándar de proteínas SDS-PAGE, # 161-0318, BIO-RAD
- Fosfato de sodio di básico y monobásico
- Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- Glicerol, Invitrogen # 15514-011
- Hidróxido de sodio MERCK
- n-Hexano MERCK

- 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- Persulfato de amonio (PSA), # 161-0700, BIO-RAD
- Pepsina from porcine gastric mucosa # P6887-106 SIGMA
- Sulfato de cobre pentahidratado MERCK
- Tartrato de sodio y potasio MERCK
- Tris (C₄H₁₁NO₃) # 161-0716, BIO-RAD
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyletilendiamina), BIO-RAD
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyletilendiamina), Invitrogen BIO-RAD
- Yoduro de potasio J.T. BAKER
- Sales biliares (Taurocolato y Glycodesoxicolato de sodio) SIGMA

3.1.4 Insumos y utensilios

Agua destilada, cámara fotográfica, envases de plásticos, frascos de plástico con tapa hermética, guantes, gradillas, material de vidrio y plástico, micropipetas, molino manual, papel absorbente, filtro, de aluminio, parafilm, tubos ependorf, tubos para centrifuga de 50 ml, puntas plásticas para pipetas.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención de la torta de sésamo

Se extrajeron las impurezas encontradas entre las semillas de sésamo, después éstas fueron molidas mediante el uso de un molino manual obteniéndose una pasta (torta) homogénea, se dejó reposar durante 24 horas y se separó la mayor cantidad de aceite posible de la pasta precipitada.

3.2.2 Desengrasado de la torta de sésamo

La torta de sésamo fue desengrasada con n-hexano (solvente orgánico) en relación 1:10 (p/v), con agitación constante durante 24 horas, a continuación se separó la torta del

hexano mediante filtración y se la secó en una estufa de convección lan incubator Modelo In-010 a 40°C, finalmente fue conservada a 5 °C hasta su utilización.

3.2.3 Análisis proximal

Se realizó el análisis proximal de la torta de sésamo en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos de la FCIAL-UTA, mediante los siguientes métodos:

Tabla 1. Métodos aplicados para el análisis proximal de la torta de sésamo

ENSAYOS	MÉTODOS
Cenizas	AOAC Ed 19,2012 923.03
Proteína	AOAC Ed 19,2012 2001.11
Humedad	AOAC Ed 19,2012 925.10
Grasa	AOAC Ed 19,2012 2003.06
Fibra Cruda	INEN 522
Carbohidratos Totales	Cálculo

3.2.4 Obtención de aislados proteicos de sésamo:

MÉTODO 1:

Se utilizó la torta de sésamo para obtener aislados proteicos mediante precipitación isoeléctrica, siguiendo el protocolo utilizado por **Martínez y Añón (1996)**, con modificaciones en el proceso de centrifugación que se realizó a 4400 rpm por 30 minutos. Se trabajó con pH de solubilización 7,0 y de precipitación: pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0 y pH 7,0. El ajuste de pHs se realizó en plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific) a 400 rpm por 30 minutos. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

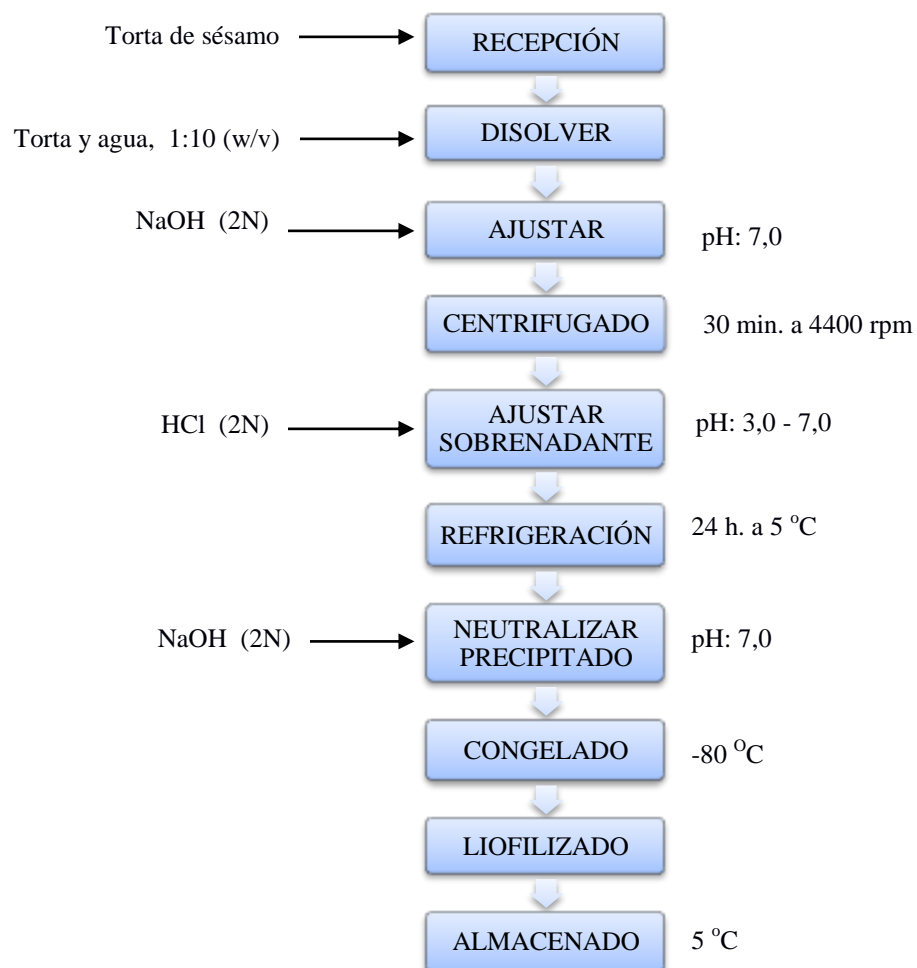


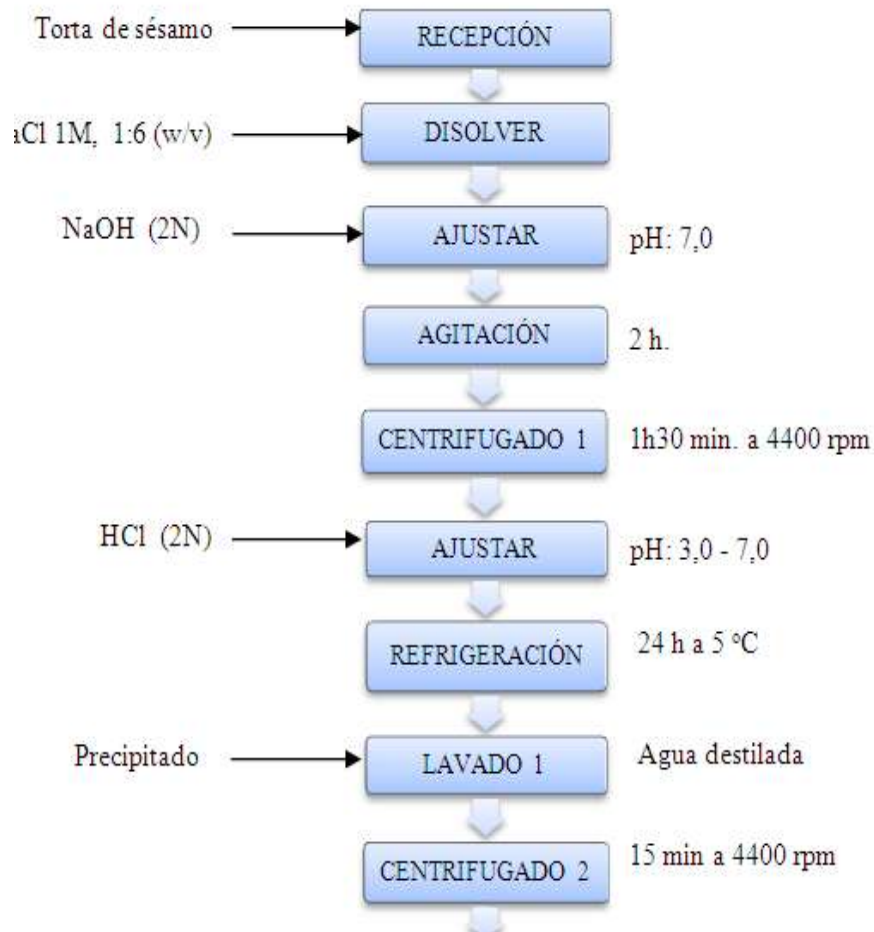
Figura 1. Obtención de aislados proteicos de la torta de sésamo, método 1
 Elaborado por: Tatiana Poveda
 Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI

MÉTODO 2:

Las proteínas también fueron aisladas mediante precipitación salina en presencia de una solución de cloruro de sodio 1M, según el método descrito por **Achouri y col. (2013)** con modificaciones en cuanto a los pHs de solubilización y precipitación, tiempo y rpm en el proceso de centrifugado. El ajuste del pH de solubilización a 7,0 se realizó en plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific) a 1200 rpm durante 30 minutos y el ajuste a los pHs de precipitación (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0), se utilizó la misma plancha

pero a 350 rpm durante 30 minutos. Una vez obtenida la proteína por ambos métodos se obtuvo el rendimiento aplicando la siguiente fórmula:

$$R (\%) = \frac{w \text{ final proteína (g)}}{w \text{ inicial proteína (g)}} * 100$$



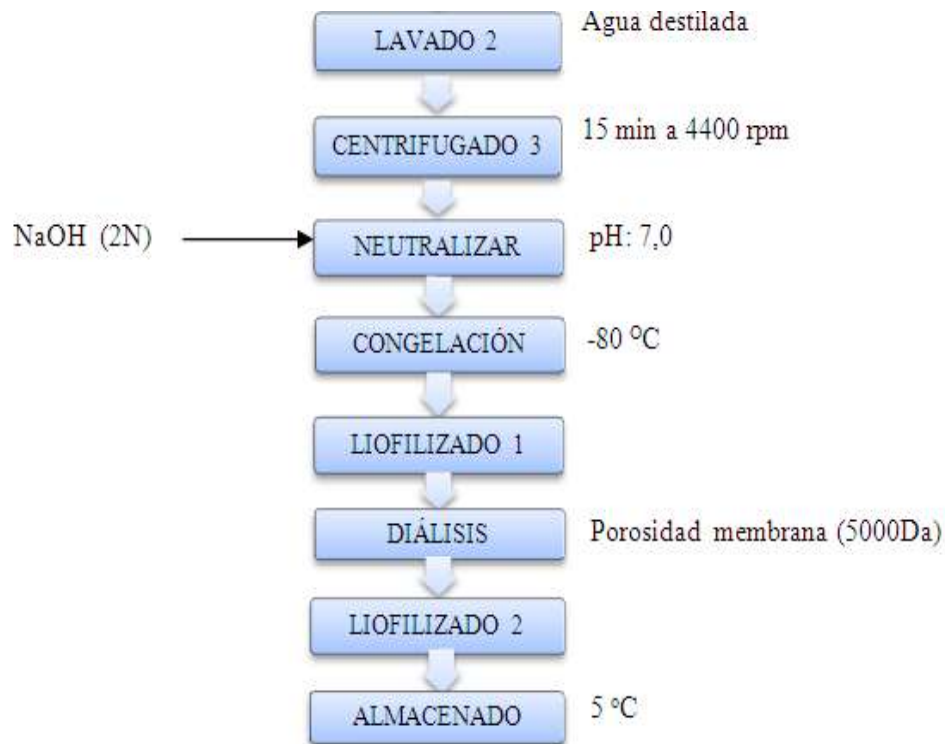


Figura 2. Obtención de aislados proteicos de la torta de sésamo, método 2

Elaborado por: Tatiana Poveda
Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI

3.2.5 Caracterización de los aislados proteicos:

3.2.5.1 Cuantificación proteica:

Para determinar la cantidad de proteína presente en los aislados proteicos, se aplicó el método colorimétrico de Biuret, descrito por **Gornall y col. (1949)**, se realizó la preparación de las muestras y del reactivo de Biuret de la siguiente manera:

Preparación del reactivo de Biuret: Se pesó 9, 3 y 5 g de tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre y yoduro de potasio, respectivamente. Estos reactivos fueron añadidos a 400 ml de NaOH 0,2 M en el orden mencionado, en un balón de aforo de 1 litro y se ajustó el volumen añadiendo 600 ml de agua destilada.

Preparación de la muestra: Se pesó entre 10 a 15 mg del aislado proteico en tubos eppendorf directamente en la balanza analítica, se enceró y después se añadió 1 ml de agua destilada y 75 µl de NaOH 0,2 M. Se mantuvo la muestra en agitación durante 10 min y mientras seguía en movimiento se tomó dos alícuotas de 250 µl y se añadió a cada una 1,25 ml del reactivo de Biuret. Posteriormente las alícuotas fueron llevadas a centrifugación por 30 minutos a 13000 rpm, luego se colocaron las muestras en la base de tubos eppendorf previamente enfriada en la refrigeradora y finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro modelo DR 5000 a 540 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado, con dos réplicas para cada muestra de proteína aislada a diferentes pHs (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0).

Preparación del blanco: En un tubo eppendorf, se mezcló 1 ml de agua destilada con 75 µl de NaOH 0,2 M, se tomó una alícuota de 250 µl y se añadió 1,25 ml del reactivo de Biuret.

3.2.5.2 Electroforesis SDS-PAGE y Native- PAGE:

Para la separación proteica, se aplicó la técnica analítica de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el método descrito por **Laemmli (1970)** con modificaciones, con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA).

Preparación de la muestra: Se pesó 10 mg de proteína directamente en un tubo eppendorf y se añadió 1 ml de agua destilada. Se tomó 200 µl de la solución proteica y se mezcló con 200 µl de buffer de muestra, este buffer fue preparado con: agua destilada (4,8ml), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2ml); glicerol puro (1,0 ml), SDS al 10% (2,0 ml), β-mercaptoetanol (0,6 ml) y azul de bromofenol. Después la mezcla fue calentada a 80°C, por 10 minutos a 400 rpm en un microincubador. Este procedimiento se realizó para cada proteína obtenida a diferentes pHs de precipitación.

Preparación de los geles de poliacrilamida: El gel superior se preparó a una concentración del 4%, con los siguientes reactivos: agua destilada (2,2 ml), Tris HCl 1.5M a pH 6,8 (0,42 ml), acrilamida al 30% (0,7 ml), SDS al 10% (3,3 µl), tetrametiletilenediamina (TEMED) (6 µl), persulfato de amonio al 10% (PSA) (20 µl). En cambio, el gel inferior se preparó al 12%, con los siguientes reactivos: agua destilada (1,425 ml), Tris HCl 1M a pH 8,8 (3 ml), acrilamida al 30% (3 ml), SDS al 10% (75 µl), tetrametiletilenediamina (TEMED) (9 µl), PSA al 10% (30 µl). Se coloca primero el gel inferior y luego el superior en placas de vidrio formando un solo gel de 1 mm de espesor.

Una vez obtenidos los geles, se armó el equipo de electroforesis, cargando los pocillos con 20 µl de cada muestra proteica y con 10 µl del estándar de la marca Bio Rad # 161-0317, el cual abarca un rango de pesos moleculares de 6 a 198 kDa, para algunos geles, también se utilizó un estándar de colores Dual Color de Bio Rad # 161-03734, el cual abarca un rango de 10 a 250 kDa. Después se añadió el buffer running (3 g/L de Tris-HCl, 15 g/L de Glicina y 1 g/L de SDS) dentro del equipo, entre las placas de vidrio y fuera de éstos. La corrida de los geles se realizó a 200 V continuos. Posteriormente, fueron teñidos con una solución de Coomassie brilliant blue R-250 durante 18 horas y luego se los sumergió en una solución de desteñido (45% Agua destilada, 50 % Metanol, 5% Ácido acético) durante 2 horas, después se realizó un lavado con agua destilada y finalmente se tomaron las fotografías de los geles.

En cuanto a la electroforesis Native- PAGE, el procedimiento es el mismo descrito anteriormente, pero la preparación de la muestra consiste en el pesado de 10 mg de proteína y después se mezcló con 600 µl de buffer de muestra:

Buffer de muestra: 3,1 ml 1M Tris-HCl pH6,8; 0,5 ml de azul de bromofenol; 1,4 ml H₂O destilada; 5 ml glicerol

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

3.2.5.3 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*:

La proteína aislada con el método 1 y precipitada a pH 7,0; fue sometida a digestión gástrica y duodenal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas de la digestión humana, siguiendo el método descrito por **Jiménez y col. (2011)**.

Digestión Gástrica: Se pesó 10 mg de proteína para 5 tubos eppendorf y se mezcló con 1 ml de solución de NaCl 0,35 M a pHs 1,2; 2; 3,2; 4,5 y 5,5 respectivamente. A cada muestra se añadió 100 µl de solución de pepsina [0,764 mg (pepsina)/ ml (NaCl 0,35M pH 2,0)]; las 5 muestras fueron calentadas a 37°C durante 2 horas y a 450 rpm en un microincubador Esco, Provolcell Shaking. Una vez culminada la digestión, se añadió 200 µl de bicarbonato de sodio 1 M a cada tubo y fueron calentados a 80°C por 10 minutos, para inactivar la pepsina.

El grado de hidrólisis gástrica se determinó mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA), utilizando un voltaje constante de 200v.

Digestión Duodenal: Se tomó 1 ml de la muestra sometida a digestión gástrica con NaCl 0,35 M a pH 3,2 y se colocó en un tubo eppendorf de 2ml, se ajustó el pH a 7,0 usando NaOH 1M, después se añadió 10 µl tanto del coctel de enzimas (α -cymotripsina, Tripsina, Lipasa, Colipasa) como de sales biliares (Taurocolato, Glycodesoxicolato). La digestión se la realizó en el microincubador a 37°C durante 3 horas a 450 rpm. Después se inactivaron las enzimas calentando la muestra 80°C por 10 minutos y finalmente se determinó el grado de hidrólisis duodenal aplicando la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

3.2.6 Actividad antioxidante de los aislados proteicos:

La actividad antioxidante se llevó a cabo teniendo en cuenta el procedimiento de **Rojano y col. (2008)** con ciertas modificaciones: se prepararon diferentes concentraciones de proteína (100, 200, 500 y 1000 µg/ml), después se colocó 500 µl de la solución proteica y 500 µl de aceite de sésamo oxidado en tubos eppendorf de 2 ml, para cada

concentración proteica. Las muestras permanecieron a 28°C por 8 horas en el microincubador con agitación constante a 400 rpm. Después se añadió a cada muestra, 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 1% (0,5 g ácido tiobarbitúrico, 40 ml ácido acético, 10 ml agua destilada) y permanecieron en el microincubador a 95°C por 60 minutos a 400 rpm, posteriormente se enfriaron las muestras con hielo por 5 minutos y se realizó la medición en el espectrofotómetro a 532 nm, también se midió la absorbancia del aceite oxidado. Dos moléculas del ácido tiobarbitúrico reacciona con una molécula del malonaldehído (producto formado durante la oxidación de lípidos) formando una red cromófora, la intensidad de ésta será proporcional al grado de oxidación del aceite de sésamo.

Se preparó el patrón con un antioxidante comercial, Butil hidroxil tolueno (BHT), a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml). Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante aplicando la siguiente fórmula:

$$Ac. Antiox. (\%) = \frac{a - b}{b} * 100$$

Donde:

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

b = absorbancia del aceite oxidado

Este ensayo se realizó con todas las proteínas aisladas a diferentes pHs y por triplicado.

3.2.7 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos:

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se aplicó el método descrito por **Alhakmani y col., (2013)** con modificaciones: se tomó 2 ml de diferentes concentraciones de proteína (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) y diclofenaco de sodio como droga estándar a las mismas concentraciones, después se añadió 2,8 ml de buffer fosfato a pH 6,4 y 2 ml de albúmina de huevo, dicha mezcla fue llevada a 27 °C por 15 minutos

en el microincubador, luego se indujo la desnaturalización de la albúmina manteniendo las muestras a 70°C por 10 minutos en el microincubador. Finalmente se midió la absorbancia a 600 nm usando agua destilada como blanco.

Preparación del buffer fosfato a pH 6,4: 46,3 ml Na₂HPO₄ 1M (fosfato dibásico) y 53,7 NaH₂PO₄ 1M (fosfato monobásico), disuelto en H₂O en un balón de aforo de 1L.

Se calculó el porcentaje de actividad antiinflamatoria aplicando la siguiente fórmula:

$$Ac. Antiinflam. (\%) = \frac{a - b}{b} * 100$$

Donde:

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

b = absorbancia de la albúmina desnaturalizada.

Este ensayo se realizó con todas las proteínas aisladas a diferentes pHs y por triplicado.

3.2.8 Análisis estadístico y Diseño experimental:

Se aplicó un diseño experimental axb para el rendimiento proteico y actividades biológicas.

En cuanto al rendimiento se estudiaron los siguientes factores:

Factor A: pHs de precipitación proteica.

Niveles a₀: 3,0; a₁: 4,0; a₂: 5,0; a₃: 6,0; a₄: 7,0

Factor B: Métodos de aislamiento proteico.

Niveles b₀: precipitación con agua; b₁: precipitación con solución de NaCl 1M.

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

Factor A: pHs de precipitación proteica.

Niveles a0: 3,0; a1: 4,0; a2: 5,0; a3: 6,0; a4: 7,0

Factor B: Concentración proteica.

Niveles b0: 100 ($\mu\text{g/ml}$); b1: 200 ($\mu\text{g/ml}$); b2: 500 ($\mu\text{g/ml}$); b3: 1000 ($\mu\text{g/ml}$)

El análisis de varianza ANOVA y la prueba de comparación Tuckey fueron aplicados a un nivel de confianza del 95% en el programa SPSS, para la identificación de diferencias significativas entre los tratamientos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Análisis proximal

La torta analizada en este estudio, presentó un contenido proteico de 40,1%, como se muestra en la Tabla 2. Este resultado concuerda con el estudio realizado por **Onsaard y col. (2010)** que obtuvieron 41,15% y también con **Singharaj y Onsaard, (2015)** que determinaron el contenido de proteínas en la harina desengrasada de sésamo de tres variedades de semilla: negra, blanca y roja con un porcentaje de: 39,4; 40,04; 37,2 respectivamente. En cambio, **Chiriboga, (2013)** reportó un contenido proteico de 45,5% en la pasta de sésamo, que es comparable a la harina desengrasada de soya que presenta 44,5%. Por otro lado, **Achouri y col. (2013)**, presentaron un contenido de 59,0%. Se evidencia la diferencia proteica entre un estudio y otro, ya que las propiedades nutricionales de la torta podrían variar de acuerdo a la procedencia de la misma, lugar de cultivo, variedad de las semillas y por los métodos aplicados en el desengrasado de la harina.

Tabla 2. Análisis proximal de la torta de sésamo

PARÁMETRO ESTUDIADO	CONTENIDO (%)
CENIZAS	11,10 ± 0,20
PROTEÍNA	40,10 ± 0,20
HUMEDAD	10,10 ± 0,03
GRASA	10,80 ± 0,03
FIBRA	5,74 ± 0,10
CARBOHIDRATOS	22,22 ± 0,20

Fuente: Laboratorio de Control y Análisis de alimentos (LA CONAL), FCIAL –UTA

4.1.2 Obtención de aislados proteicos y cálculo del rendimiento

Los aislados proteicos se obtuvieron a partir de la torta de sésamo solubilizada a pH 7,0 y los pHs de precipitación fueron 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0. Se aplicaron dos métodos de extracción proteica, en el método 1 se usó agua como solvente y en el método 2, solución de NaCl 1M.

En la Figura 3 se puede observar claramente la diferencia de la cantidad de proteína precipitada mediante el método 1, a los distintos pHs de precipitación ensayados, con el pH 3,0 se evidencia mayor contenido, mientras que con el pH 7,0 no existe precipitación, la proteína se encuentra solubilizada en el agua, sin embargo esta muestra fue la que presentó un peso mayor en relación a las demás, después de ser liofilizadas.

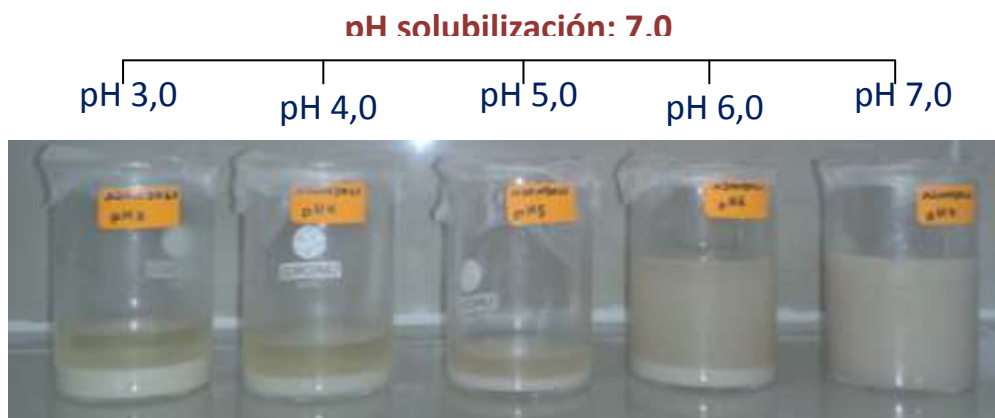


Figura 3. Aislados proteicos de la torta de sésamo obtenidos con el método 1
Fuente: Laboratorio BIO-PROPEPTI

Por otro lado, es importante indicar que la sal presente en los aislados proteicos influye en el peso de los mismos y por ende en su rendimiento, por esta razón se dializaron las muestras a las que se aplicó el método 2 para minimizar el efecto de la sal sobre el rendimiento final de los aislados. En la tabla 3 se muestra notoriamente la diferencia entre dichas muestras, que fueron comprobadas estadísticamente con t-student para muestras relacionadas.

Tabla 3. Rendimiento de los aislados proteicos de sésamo sin dializar y dializados obtenidos mediante el método 2, a diferentes pHs de precipitación

	RENDIMIENTO PROTEICO (%)	
	muestras no dializadas	muestras dializadas
pH3	8,65 ^A ± 0,78	4,22 ^B ± 0,04
pH 4	10,80 ^A ± 0,77	4,70 ^B ± 0,35
pH 5	14,69 ^A ± 0,48	7,00 ^B ± 0,54
pH 6	4,98 ^A ± 1,33	1,85 ^B ± 0,89
pH7	44,57 ^A ± 0,52	17,21 ^B ± 0,77

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

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de los aislados proteicos de sésamo dializados y sin dializar.

El rendimiento de la proteína de sésamo obtenida mediante ambos métodos de extracción se muestra en la Tabla 4, el cual fue calculado a partir del peso inicial de la torta y la cantidad precipitada, después de la liofilización de las muestras:

Tabla 4. Rendimiento de los aislados proteicos de sésamo obtenidos mediante dos métodos y a diferentes pHs de precipitación

pH	RENDIMIENTO (%)	
	Método 1:	Método 2
3	8,46 ^{Aa} ± 1,80	4,22 ^{Ba} ± 0,04
4	8,34 ^{Aa} ± 1,30	4,70 ^{Ba} ± 0,35
5	9,39 ^{Aa} ± 0,19	7,00 ^{Bb} ± 0,54
6	12,34 ^{Ab} ± 0,48	1,85 ^{Bc} ± 0,89
7	14,73 ^{Ab} ± 0,31	17,21 ^{Bd} ± 0,77

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

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de los aislados proteicos de sésamo obtenidos con 2 métodos. Letras minúsculas diferentes indican, para cada método, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los rendimientos de los aislados proteicos de sésamo obtenidos a diferentes pH de precipitación.

El análisis de varianza indica que el rendimiento de la proteína de sésamo se ve influenciado tanto por el método de extracción aplicado como por el pH de precipitación, por lo que se empleó la prueba de comparación de Tukey indicando que, con el método 1, entre el pH 3,0 y 5,0 no existen diferencias significativas obteniendo un rendimiento entre 8,46 y 9,39%, con los pHs 6,0 y 7,0 tampoco existe diferencia y se obtiene un rendimiento más alto: 12,34 y 14,73% respectivamente. Con el método 2, se obtuvieron porcentajes bajos entre los pH 3,0 y 6,0; en cambio a pH 7,0 el rendimiento fue más alto (17,21%).

Por otro lado, la prueba t-student, comprueba que existen diferencias significativas entre los métodos de extracción proteica, para todos los pHs de precipitación ensayados. En efecto, el mejor rendimiento se obtuvo a pH 7,0 por ambos métodos de extracción proteica, con valores de 14,73% y 17,20%, que corresponden a los aislados con agua y NaCl (1M) respectivamente.

Resultados similares fueron reportados por **Achouri y col. (2012)**, que determinaron el pH óptimo de extracción proteica de sésamo (pH 7,5), el rendimiento fue de 12,5% al utilizar agua como solvente y este valor aumentó hasta 54,6% al utilizar una solución de NaCl 1M.

En esta investigación, se establece que, con cloruro de sodio existe un ligero incremento en el rendimiento proteico en relación al obtenido con agua, porque los iones de sal interactúan con grupos de carga opuesta y éstos disminuyen la interacción electrostática entre las moléculas proteicas permitiendo que sean más solubles (**Badui, 2006**), pero si se trabaja a una concentración de sal mayor a 2M, el rendimiento disminuye (**Onsaard y col., (2010)**), porque empieza a existir competencia entre las proteínas y los iones de sal por las moléculas de agua necesarias para su disolución, puesto que las moléculas de agua son fuertemente unidas a las de la sal y se reduce la cantidad de moléculas de agua disponibles para que se disuelvan las proteínas. Esto se comprueba con la investigación realizada por **Onsaard y col. (2010)**, ya que el rendimiento que obtuvieron a pH 7,0 fue de 7,1% utilizando NaCl 2M, en cambio en este estudio se trabajó con NaCl 1M y el rendimiento proteico fue mayor (17,20%).

Esta información es útil dentro de la industria alimentaria, ya que podría facilitar la obtención de aislados proteicos de sésamo, para su comercialización como producto terminado o ingrediente funcional, porque la precipitación con agua es más económica y menos complicada en relación a la precipitación con sal y los aislados al estar libres de sal pueden ser consumidos por personas que sufren de hipertensión arterial.

También la producción de aislados o concentrados proteicos a partir de harinas desengrasadas de semillas, permite eliminar cantidades considerables de componentes indeseables como el azúcar soluble, fitatos y oxalatos (**Liu y Chiang, 2008**).

4.1.3 Caracterización de los aislados proteicos

4.1.3.1 Cuantificación proteica

Se determinó el contenido proteico de los aislados, aplicando el método colorimétrico de Biuret, el cual es específico para la medición de enlaces peptídicos, el reactivo contiene sulfato de cobre en tartrato fuertemente alcalino, donde el ion cúprico (Cu^{+2}) oxida la cadena peptídica, reduciéndose a Cu^+ . (**Badui, 2006**).

En la Tabla 5, se muestra el porcentaje del contenido proteico presente en los aislados, existiendo diferencias significativas entre los valores correspondientes a cada aislado obtenido a diferentes pHs de precipitación, por lo tanto, el pH es un factor que influye en el contenido proteico de los aislados ya que la solubilidad de la proteína incrementa cuando el pH es alterado por debajo o encima de su punto isoelectrico (**Elleuch y col., 2007**).

Tabla 5. Contenido proteico de los aislados obtenidos a diferentes pHs de precipitación

pH	Contenido proteico (%)
3	70,5 ^a ± 0,9
4	33,6 ^b ± 5,6
5	37,5 ^b ± 1,2
6	32,2 ^b ± 2,4
7	47,4 ^c ± 0,6

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

Los valores presentados en la tabla representan la media de 4 mediciones ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido proteico de los aislados obtenidos a diferentes pH de precipitación, mediante el método 1 de extracción proteica.

Mediante la aplicación de la prueba de comparación de Tukey, se identificó que a los pHs 4,0; 5,0 y 6,0 los contenidos proteicos son similares, en cambio a los pHs 3,0 y 7,0 se muestra un valor superior en relación a los demás, 70,5% y 47,4 % respectivamente. Esto nos indica que hay presencia de proteínas ácidas y neutras en los aislados.

Es importante indicar que existen varios pigmentos, correspondientes a lípidos o hidratos de carbono, que absorben a 540 nm (longitud de onda utilizada en el método Biuret), los que provocan el desarrollo de colores diferentes que pueden interferir en la medición (**Badui, 2006**).

4.1.3.2 Electroforesis Native-PAGE y SDS-PAGE:

Las proteínas de la torta de sésamo aisladas con el método (agua como solvente), fueron analizadas con electroforesis Native-PAGE y SDS-PAGE. En la figura 4 se muestra el perfil de proteínas obtenido mediante electroforesis Native-PAGE, en donde se identificaron bandas entre 35 y 198 KDa. Las proteínas con mayor peso molecular (198 KDa), se observan con más claridad a los pH 5,0; 6,0 y 7,0, a los mismos pHs también se identificaron bandas proteicas de 140 KDa que corresponden a globulinas 7S. Estos resultados concuerdan con **Achouri y col. (2012)** ya que también encontraron estas bandas de proteínas con pesos moleculares entre 140 y 669 KDa.

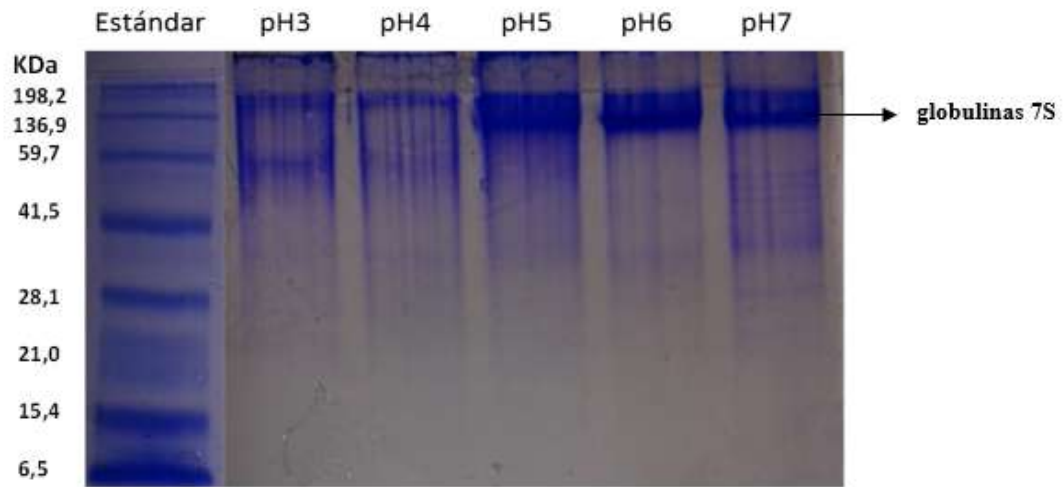


Figura 4. Electroforesis Native-PAGE de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción

Los aislados proteicos también fueron analizados con electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (2-β-mercaptoetanol), en la figura 5 se han identificado polipéptidos con pesos moleculares entre 6,5 y 50 kDa en todos los pHs ensayados. Las bandas de 6,5 kDa son albúminas 2S, las que se encuentran entre 18 y 20 kDa corresponden a las subunidades básicas 11S, las bandas que se encuentran entre 28 y 30 kDa corresponden a las subunidades ácidas 11S y finalmente las que presentan 50 kDa corresponden a una subunidad de globulina 7S. Las fracciones de globulinas 11S y 7S son más abundantes y se observan con mayor claridad a los pHs 5,0, 6,0, y 7,0.

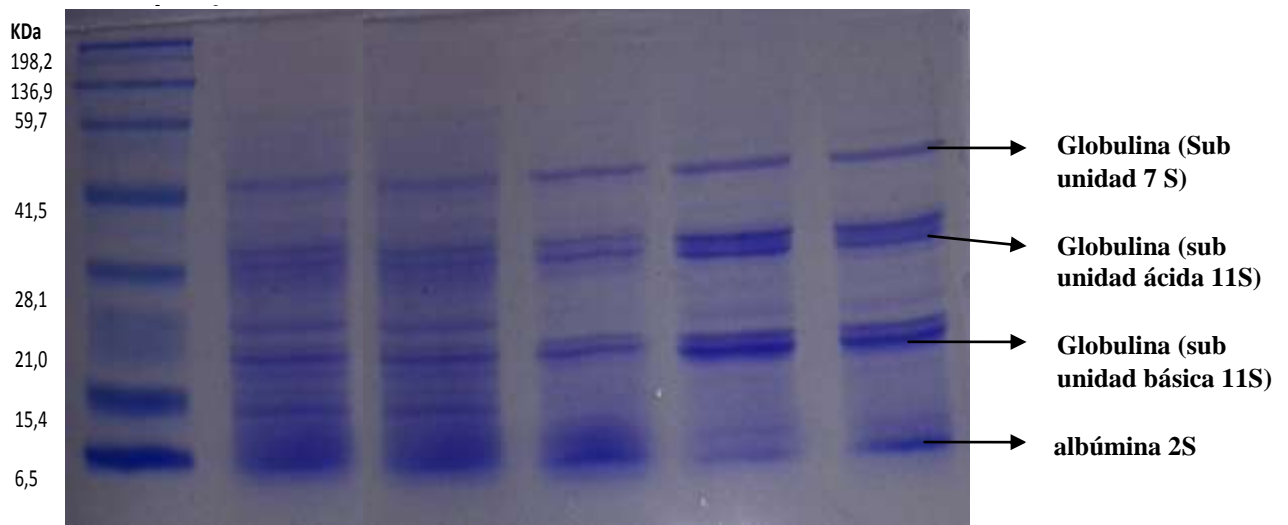


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción

Por otro lado, en la Figura 6 se muestra el perfil proteico de sésamo, analizado con electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (en ausencia de 2-β-mercaptoetanol), a todos los pH se identifican las albúminas 2S pero se observan con mayor claridad a pH7. También se observan complejos proteicos cercanos a 50 KDa a pH 5,0; 6,0 y 7,0.

Singharaj y Onsaard (2015), identificaron en su estudio bandas de proteínas con pesos moleculares entre: 42 y 83 KDa, obtenidas bajo condiciones no reductoras. Bajo condiciones reductoras, el rango se encontraba entre: 12 y 39 KDa. En cambio, en este estudio se encontraron rangos de pesos moleculares similares tanto en condiciones reductoras como en no reductoras, pero con mayor o menor intensidad de bandas entre los límites.

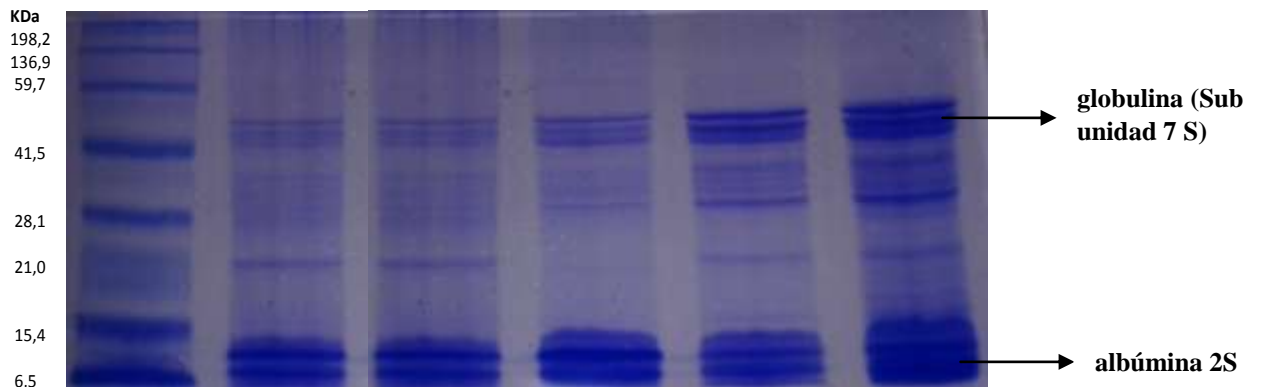


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 1 de extracción

Finalmente se obtuvo el perfil proteico de los aislados precipitados a diferentes pHs utilizando NaCl 1M como disolvente (Figura 7), en donde se identificó que los complejos proteicos a todos los pHs presentan pesos moleculares entre: 6,5 y 50 KDa aproximadamente. En general, se observan las mismas bandas a todos los pH ensayados, pero en las columnas de los pHs 5,0; 6,0 y 7,0, se identifican con mayor claridad las albúminas 2S, en cambio **Achouri y col. (2012)** no encontraron estas bandas y el rango de pesos moleculares de las proteínas que identificaron fue entre: 10 y 37 KDa. En esta Figura también se encuentran presentes las subunidades ácidas y básicas 11S, la fracción más abundante de este gel es precisamente la 11S, mostrando bandas intensas a pH 5,0; 6,0 y 7,0. Las bandas de globulinas 7S (45-50KDa), son más claras a pH 6,0 y 7,0. Las bandas de globulinas 11S y las de albúminas 2S tienen una alta expresión ya que son más solubles en este solvente.

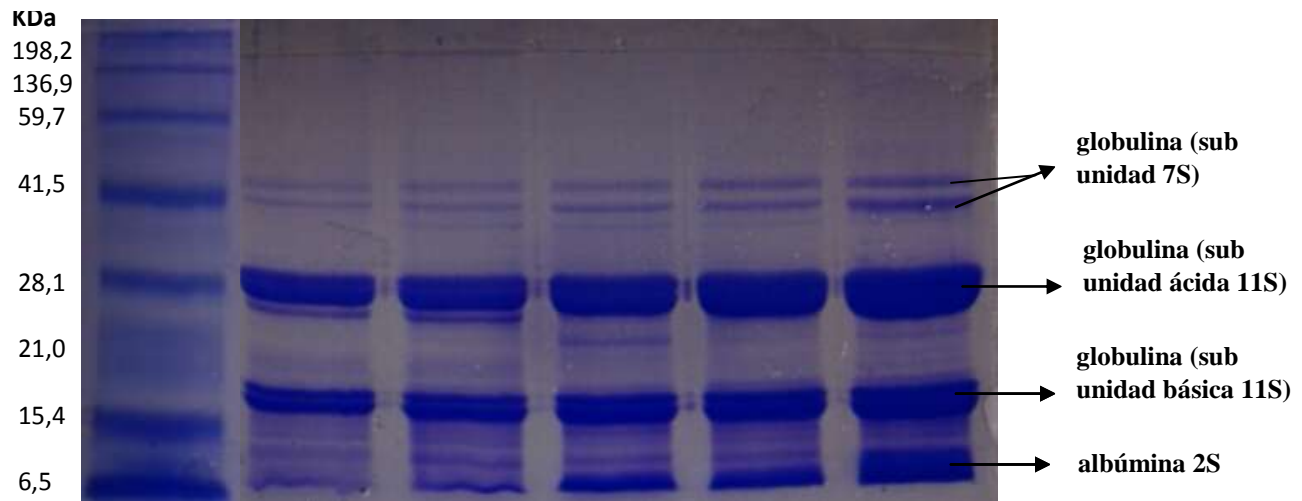


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, mediante el método 2 de extracción (NaCl 1M)

Las semillas de sésamo cuentan con proteínas que principalmente son de almacenamiento, siendo estas: las albúminas 2S y la fracción de las globulinas 7S y 11S (**Orruño y Morgan, 2011**).

En diferentes plantas se han identificado y caracterizado las albúminas 2S, entre esas plantas se encuentran: el amaranto, la quinua, la soja, legumbres y el sésamo. Algunas albúminas se han sido caracterizadas como potenciales alérgenos (**Brinegar y Goundan, 1993**).

La globulina 11S conocida también como glicina, está constituida por dos hexámeros unidos mediante puentes disulfuro y cuentan con una estructura cuaternaria muy compleja. Cada uno de estos hexámeros cuenta con un 45 y 50% de subunidades que poseen naturaleza ácida con pesos moleculares entre 37y 40 kDa. Además tienen entre un 50 y 55% de subunidades básicas con pesos moleculares comprendidos entre 18 y 20 kDa. Estos hexámeros tienen la capacidad de agregarse y formar polímeros con pesos moleculares muy altos. Estos también se disocian en subunidades más pequeñas (**García y col., 1997**). La globulina 11S identificada en las semillas de sésamo presenta una

estructura oligomérica típica descrita para este tipo de fracción proteínica, la cual está constituida por seis subunidades, **(Srivastava y Roy, 2013)**.

La glicoproteína globulina 7S del sésamo, está formada por un trímero con pesos moleculares entre 150 y 210 kDa, constituida en tres subunidades: α (57-76 kDa), α' (57-83 kDa) y β (42- 53 kDa). La globulina 7S contiene pocos aminoácidos azufrados y no presenta en su estructura puentes disulfuro **L'Hocine y Boye, 2007)**.

En este estudio, se identificó globulinas y albúminas a partir de proteínas de sésamo aisladas a diferentes pHs con agua y solución de NaCl 1M como disolvente para su respectiva extracción.

Achouri y col. (2012) obtuvieron polipéptidos de sésamo aislándolos con agua, con pesos moleculares entre 10 y 100 kDa. La albúmina 2S fue identificada con un peso molecular de 13 kDa y la globulina 7S con un peso molecular entre 45 y 50 kDa. Además identificaron subunidades ácidas 11S (30-35 kDa) y subunidades básicas 11S (20-25 kDa), dichos resultados son similares a los obtenidos en este estudio.

4.1.4 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Las proteínas son macronutrientes presentes en los alimentos que aportan aminoácidos al organismo, nutrientes indispensables para el mantenimiento de la proteína corporal y su aumento de ésta durante el crecimiento **(Martínez y Martínez, 2006)**. El valor nutritivo de las proteínas depende de su digestibilidad y ésta se lleva a cabo mediante la acción enzimática. Primero se lleva a cabo en la boca, donde se tritura y se mezcla con la saliva, después el proceso de hidrólisis se da en el estómago, donde el pH del medio depende de la edad del individuo y estado de salud, en esta fase actúa principalmente la pepsina que es una proteasa cuyo pH óptimo está alrededor de 2 y actividad es proporcional a la cantidad de sustrato **(Adrian y col., 2004)**. Después los alimentos pasan al duodeno en donde actúan algunas enzimas (proteasas, amilasas, lipasas) y sales biliares, al culminar esta fase, las proteínas se encuentran hidrolizadas en moléculas de pesos moleculares muy pequeños (péptidos) y pueden atravesar la capa del moco del epitelio **(Thomas y col., 2004)**.

En este estudio se determinó el grado de digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, simulando condiciones fisiológicas humanas, en la digestión gástrica se utilizó diferentes pHs ya que este parámetro influye en la hidrólisis de proteínas, se sabe que el pH del estómago de personas con enfermedades gástricas se encuentra cercano al pH 1,2; mientras que un adulto sano tiene un pH de 2,0. Los estómagos de niños no lactantes tienen un pH cercano a pH 3,2 y los recién nacidos presentan pHs más altos, entre 4,5 y 5,5 (Jiménez, 2012).

En la figura 8 se muestran los hidrolizados proteicos de sésamo obtenidos con la acción de la pepsina en comparación con el aislado puro como control, ya que éste no fue sometido a la acción enzimática. A pH 1,2 y 2,0 se obtuvo un mayor grado de hidrólisis enzimática, pero la albúmina 2S es la fracción proteica que presentó resistencia a la acción de la pepsina. A los pHs 3,2; 4,5 y 5,5 no se obtuvieron hidrolizados ya que el perfil proteico permaneció intacto, por lo tanto los niños y recién nacidos no hidrolizarían la proteína de sésamo en el estómago.

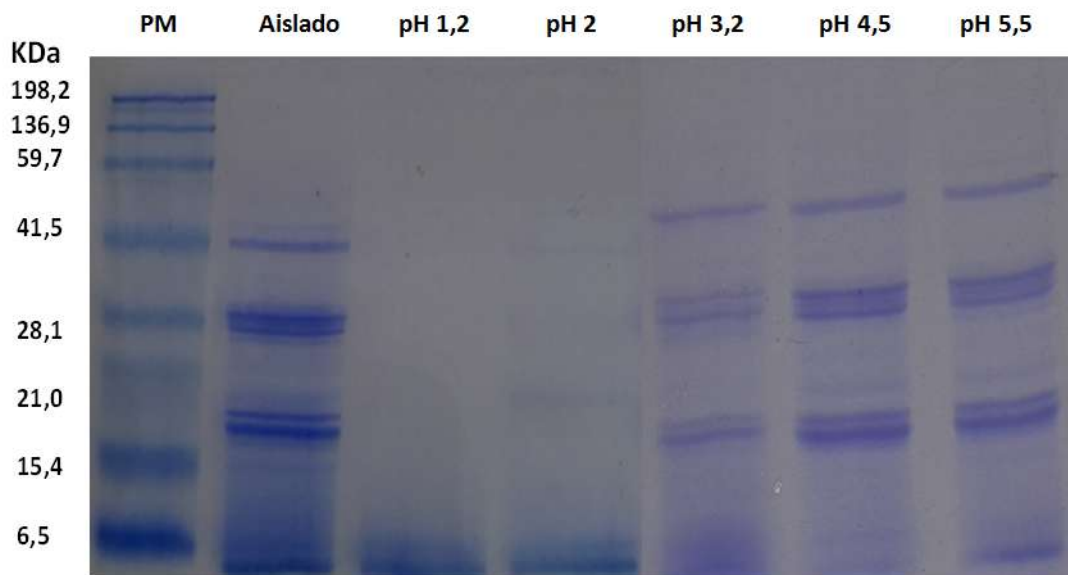


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de la simulación gástrica de aislados proteicos de sésamo precipitados a pH 7,0; mediante el método 1 de extracción (H2O)

Al realizar la simulación de la digestión duodenal, ya no se observan bandas proteicas en el gel (ver Figura 9), únicamente se identificó una ligera banda de aproximadamente 15KDa, pero la albúmina 2S que presentó resistencia a la digestión con pepsina, fue susceptible a la acción del coctel de enzimas y sales biliares utilizadas en esta fase. Estos resultados concuerdan con algunas investigaciones, **Orruño y Morgan (2011)**, identificaron que la fracción proteica de sésamo, albúmina 2S, presenta una extremada resistencia a la digestión con pepsina, en cambio las fracciones de globulina 7S y 11S no son estables a la degradación con esta enzima gástrica. **Moreno y col. (2005)**, también reportaron similares hallazgos ya que en su estudio, la albúmina 2S quedó intacta después de haber sido sometida a digestión gástrica durante 2 h, y solo una subunidad pequeña fue hidrolizada en la fase duodenal. La alta resistencia de la albúmina 2S a la digestión puede deberse a la presencia de puentes disulfuro inter e intra moleculares que forman una estructura compacta limitando así la accesibilidad de las enzimas proteolíticas a los enlaces peptídicos susceptibles (**Sen y col, 2002**).

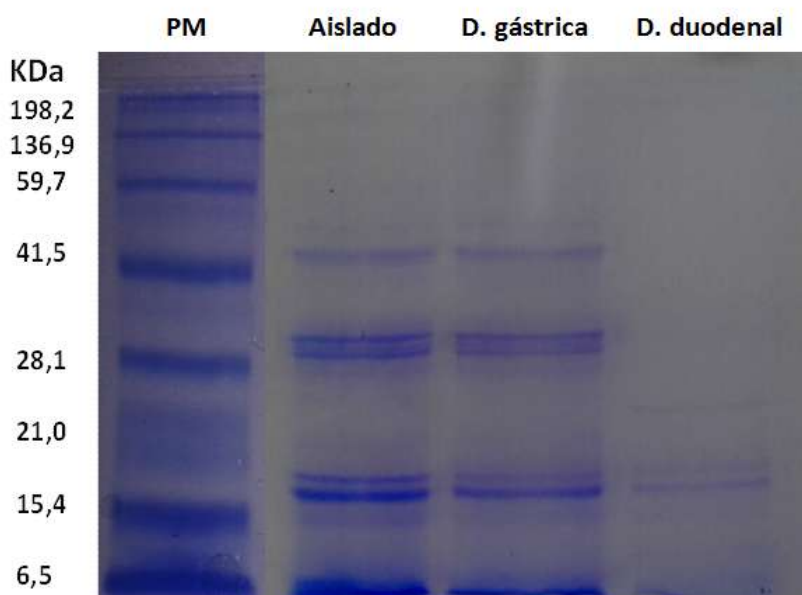


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol. Comparación de la simulación gástrica y duodenal de aislados proteicos de sésamo precipitados a pH 7,0; mediante el método 1 de extracción (H2O)

4.1.5. Actividad antioxidante de los aislados proteicos de sésamo

Los antioxidantes, naturales y sintéticos, son compuestos que previenen la oxidación lipídica de los alimentos, secuestrando los radicales libres o evitando su formación, también pueden interactuar con distintos antioxidantes endógenos, potenciando su actividad (**Vega, 2004**). El uso de antioxidantes naturales ha adquirido gran interés en los últimos años debido a la toxicidad y riesgos para la salud que ocasionan los aditivos sintéticos, como el BHT (Butil hidroxí tolueno) y BHA (Butil hidroxí anisol). Los carotenoides, aminoácidos y algunas proteínas presentan potencial actividad antioxidante (**Iglesias, 2009**).

En tal virtud, se realizó el estudio de la actividad antioxidante de las proteínas de sésamo. En la tabla 6 se indica el porcentaje de dicha actividad que presentan los aislados proteicos precipitados a diferentes pHs sobre el aceite de sésamo, se trabajó con cuatro concentraciones de proteína: 100, 200, 500 y 1000 ($\mu\text{g/ml}$).

Estos resultados fueron comparados con los arrojados por el patrón, el BHT (Butil hidroxí tolueno), antioxidante artificial utilizado ampliamente en la industria alimentaria que protege de la rancidez y de cambios desagradables en el color y aroma, a productos con alto contenido de aceites y grasas (**Hill y Kolb, 1999**), el principio de acción de este aditivo se basa en que el grupo $-\text{OH}$ dona su hidrógeno al radical libre del aceite y lo estabiliza (**Chacón, 2004**).

Tabla 6. Actividad antioxidante de los aislados proteicos precipitados a diferentes pHs

pH	Concentración proteica (µg/ml)			
	100	200	500	1000
3	12,58 ^{Aa} ± 0,81	17,70 ^{Ba} ± 0,32	26,44 ^{Ca} ± 0,15	23,13 ^{Da} ± 0,07
4	20,78 ^{Ab} ± 0,11	21,27 ^{Ab} ± 0,15	26,65 ^{Ba} ± 0,56	23,06 ^{Ca} ± 0,44
5	5,68 ^{Ac} ± 0,57	7,29 ^{Bc} ± 0,41	21,97 ^{Cb} ± 0,52	21,85 ^{Cc} ± 0,29
6	5,57 ^{Ac} ± 0,79	14,33 ^{Bd} ± 0,87	26,88 ^{Ca} ± 0,36	24,06 ^{Dab} ± 0,56
7	22,64 ^{Ad} ± 0,39	23,43 ^{Ae} ± 0,26	31,26 ^{Bc} ± 0,32	24,90 ^{Cb} ± 0,28
(BHT)	18,03 ^{Ae} ± 0,42	20,68 ^{Bb} ± 0,35	36,34 ^{Cd} ± 0,46	64,29 ^{Dc} ± 0,67

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

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antioxidante de diferentes concentraciones de los aislados proteicos de sésamo. Letras minúsculas diferentes indican, para cada concentración proteica, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de actividad antioxidante de los aislados proteicos de sésamo obtenidos a diferentes pH de precipitación.

El análisis de varianza mostró que el pH de precipitación, la concentración proteica y la combinación de ambos factores influyen en la actividad antioxidante de los aislados, se evidencia claramente la disminución de la oxidación del aceite de sésamo a pH 4,0 y pH 7,0 a partir de la concentración más baja de proteína (100 µg/ml). Mediante la prueba de comparación de Tukey se determinó que la mejor combinación es el precipitado a pH 7,0 con una concentración proteica de 500 (µg/ml), ya que presentó mayor actividad antioxidante en relación a los demás tratamientos, con un valor de: 31,26%.

En la figura 10 se evidencia que 500 (µg/ml) fue la concentración proteica con la que se obtuvo mejor actividad antioxidante, ya que los aislados a pH: 3,0; 4,0 y 6,0, presentaron valores superiores en relación a las demás concentraciones ensayadas, con valores de: 26,44; 26,65 y 26,88 %, respectivamente. Los tratamientos con concentraciones de 100 y 200, de los aislados precipitados a todos los pH, mostraron mayor actividad antioxidante que el BHT. Por otro lado, los aislados a pH 7,0; en las cuatro concentraciones ensayadas, presentaron un porcentaje más alto de actividad en comparación con las proteínas extraídas a los demás pHs.

El BHT a la misma concentración posee una actividad de 36,34 %, este valor es más alto que los que presentan los aislados proteicos de sésamo, pero cabe recalcar que concentraciones altas de BHT produce alergias y presenta efectos carcinogénicos, por lo que está siendo cuestionado su uso y ha sido prohibido en algunos países (Japón, Australia, Unión Europea) (Iglesias, 2009). En adición a lo anterior, este aditivo tiene mayor eficacia en aceites de origen animal que en los de origen vegetal (Akoh y Min, 2008).

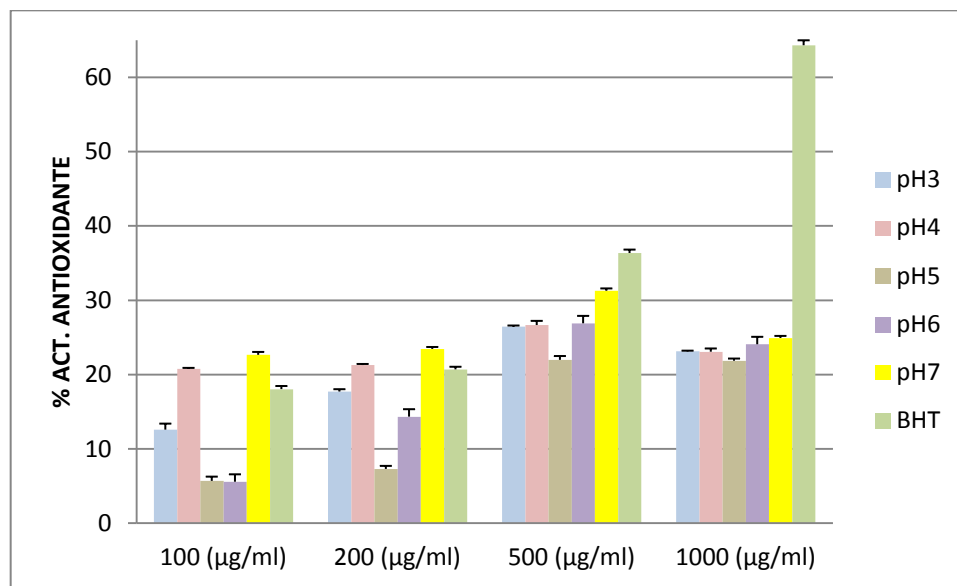


Figura 10. Actividad antioxidante (%) de aislados proteicos precipitados a diferentes pHs y a distintas concentraciones ensayadas, con respecto al patrón (BHT)

En general, los péptidos presentan mayor actividad antioxidante que los aminoácidos libres por las propiedades fisicoquímicas únicas otorgadas por sus secuencias de aminoácidos (Vioque y col., 2001). Los 20 aminoácidos presentes en las proteínas pueden reaccionar con radicales libres si la energía de éstos es alta (por ejemplo radicales hidroxilo). Los más reactivos incluyen los azufrados, los aromáticos y los que contienen anillo imidazol (Sarmadi e Ismail, 2010).

Por lo tanto, las proteínas de sésamo, al presentar propiedades antioxidantes, podrían ser utilizadas para combinarlas con antioxidantes sintéticos disminuyendo la concentración

de estos últimos en alimentos, ya que los péptidos antioxidantes protegen de la oxidación, tanto a alimentos procesados como a las células del organismo cuando éstos son ingeridos en la dieta (**Vioque y col., 2006**), retardando así, el envejecimiento celular y reduciendo la probabilidad de contraer enfermedades degenerativas y cáncer (**Fabris y col., 2008**).

4.1.6 Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de sésamo.

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo frente a una agresión endógena o exógena (microorganismos, traumatismo, rayos X, luz solar, alteraciones genéticas, lesiones térmicas) (**Duce, 2005**), llevándose a cabo una serie de complejas reacciones en el tejido conjuntivo vascular, donde intervienen mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y leucotrienos. Pero esta acción protectora puede ser perjudicial, ya que el tejido se lesiona y podrían desencadenarse una serie de enfermedades como asma, vasculitis, artritis, entre otras (**Leelaprakash y Mohan, 2011**).

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (ANE), que contrarresta la inflamación y produce algunos efectos en el organismo: analgésico, antipirético y antiinflamatorio. En general los ANEs tienen gran afinidad a las proteínas plasmáticas, se unen a la albúmina en gran proporción y esta unión sirve como reserva pero sólo la droga libre es la que ejerce el efecto terapéutico o tóxico disponibles para el metabolismo o eliminación. La dosis recomendada de esta droga se encuentra entre: 0,15 y 0,5 mg/ml, con estas concentraciones se logra que la unión a las proteínas séricas sea constante (**Martínez y Garrido, 2013**).

Existen investigaciones que revelan la efectividad de extractos de plantas (hojas y flores) ante cuadros inflamatorios, ya que tienen compuestos que actúan bloqueando rutas inflamatorias producidas por ciertos mediadores de la inflamación (metabolismo del ácido araquidónico y la interacción de éste con la proteinquinasa) (**Matiz y col., 2011**).

García y col. (2002), en su artículo de revisión indicaron que, las sustancias naturales con acción antioxidante comprobada, también se reportan como antiinflamatorias. Por esta razón, en este estudio también se evaluó la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de sésamo, aplicando el método de inhibición de la desnaturalización de la albúmina de huevo, ya que la desnaturalización proteica origina procesos inflamatorios (edema, hinchazón) (**Alhakmani y col., 2013**).

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de actividad antiinflamatoria que presentaron los aislados proteicos precipitados a diferentes pH, se trabajó con cuatro concentraciones de proteína: 100, 200, 500 y 1000 (µg/ml). Se aplicó un diseño experimental axb y los tratamientos fueron comparados con una droga estándar, diclofenaco de sodio de 50 (mg), ya que la determinación del porcentaje de inhibición de la desnaturalización proteica con respecto a un control, es una medida de la estabilización proteica (**Sangita y col. 2012**).

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos precipitados a diferentes pHs

Ph	Concentración proteica (µg/ml)			
	100	200	500	1000
3	9,53 ^{Aa} ± 0,97	14,92 ^{Ba} ± 0,41	21,73 ^{Cab} ± 0,49	29,83 ^{Da} ± 0,83
4	7,92 ^{Aa} ± 0,65	8,70 ^{Ab} ± 0,53	20,37 ^{Ba} ± 0,76	30,04 ^{Ca} ± 0,48
5	8,08 ^{Aa} ± 0,90	19,27 ^{Bc} ± 0,62	22,44 ^{Cb} ± 0,73	30,34 ^{Da} ± 0,71
6	8,01 ^{Aa} ± 0,41	15,06 ^{Ba} ± 0,55	20,40 ^{Ca} ± 0,24	36,33 ^{Db} ± 0,63
7	14,73 ^{Ab} ± 0,42	21,20 ^{Bd} ± 0,67	36,65 ^{Cc} ± 0,71	43,23 ^{Dc} ± 0,35
Diclofenaco	36,05 ^{Ac} ± 0,77	44,30 ^{Be} ± 0,34	65,52 ^{Cd} ± 0,48	79,24 ^{Dd} ± 0,52

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

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican, para cada pH, diferencias significativas (p<0,05) entre los porcentajes de actividad antiinflamatoria de diferentes concentraciones de los aislados proteicos de sésamo.

Letras minúsculas diferentes indican, para cada concentración proteica, diferencias significativas (p<0,05) entre los porcentajes de actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de sésamo obtenidos a diferentes pH de precipitación.

Mediante el análisis de varianza se determinó que la actividad antiinflamatoria de la proteína de sésamo se ve influenciada por el pH, por la concentración proteica y por la combinación de ambos, es decir estos factores influyen significativamente sobre dicha actividad. Al aplicar la prueba de Tukey, se identificó que el mejor tratamiento es el aislado proteico precipitado a pH 7,0 y a una concentración de 1000 ($\mu\text{g/ml}$), ya que presentó mayor actividad en relación a los demás tratamientos, con un valor de: 43.23%. Por otro lado, las muestras con menor actividad son las de concentración proteica de 100 $\mu\text{g/ml}$ y no existe diferencia significativa del pH3,0 al pH6,0.

En la figura 11 se puede observar que la actividad antiinflamatoria incrementa conforme aumenta la concentración de proteína, es decir, a mayor concentración del aislado proteico mayor fue su efecto antiinflamatorio. Se obtuvo una mejor inhibición de la desnaturalización de la albúmina con los tratamientos a las concentraciones proteicas de 500 y 1000 ($\mu\text{g/ml}$). Por otro lado, la proteína aislada a pH 7,0; en todas las concentraciones ensayadas presenta mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria en relación a los aislados precipitados con los demás pHs.

El diclofenaco, a todas las concentraciones, tiene valores más altos en relación a los aislados proteicos, pero investigaciones recientes revelan que estos antiinflamatorios presentan toxicidad gastrointestinal y renal, ya que al ser suministradas vía oral se difunden rápidamente en las células gástricas y después de su acción en el organismo, se elimina a nivel renal como metabolitos (**Martínez y Garrido, 2013**). Por tal motivo, surge el interés por encontrar compuestos bioactivos de productos naturales con actividad antiinflamatoria, que podrían suplir el uso de fármacos tradicionales (**Gómez y col., 2011**).

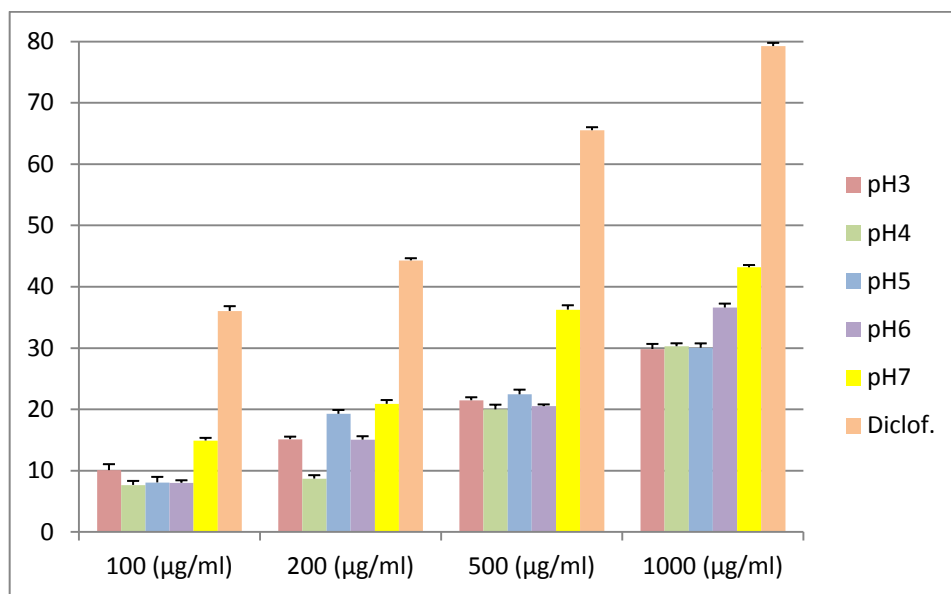


Figura 11. Actividad antiinflamatoria (%) de aislados proteicos precipitados a diferentes pHs y a distintas concentraciones ensayadas, con respecto al patrón (Diclofenaco)

Estos resultados son información valiosa, tanto para la ciencia como para la industria alimentaria ya que se podría ampliar la línea de investigación propuesta para confirmar lo encontrado en este estudio, mediante el desarrollo de métodos *in vivo*, o la determinación de otras propiedades biológicas que podrían presentar las proteínas de sésamo, fomentando el uso de las mismas como ingredientes funcionales dando así un valor agregado a los productos ecuatorianos, también se fomenta su consumo y de esta manera se contribuiría al mejoramiento de la salud de los consumidores.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se aplicaron dos métodos para la obtención de aislados proteicos de sésamo por precipitación isoelectrica, mediante la utilización de agua y solución de NaCl 1M como solventes, determinando que el mejor tratamiento fue el pH 7,0 ya que se obtuvo el mayor rendimiento proteico, con valores de: 14,73 y 17,21%, para el método con agua y sal respectivamente.
- Se caracterizaron los aislados proteicos de sésamo obtenidos a diferentes pHs de precipitación mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE y Native-PAGE. Con Native-PAGE se identificaron bandas comprendidas entre: 35 y 198 KDa, mientras que con SDS-PAGE el perfil proteico se encontró entre: 6,5 y 50 KDa, identificándose bandas de albúminas 2S, globulinas correspondientes a subunidades ácidas y básicas 11S y globulinas 7S.
- Se evaluó el grado de digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de sésamo mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, identificando que en la digestión gástrica los aislados son totalmente hidrolizados en los pHs 1,2 y 2,0; mientras que a pHs superiores las proteínas son resistentes a la acción de la pepsina. En la digestión duodenal se hidrolizaron casi en su totalidad con excepción de una banda proteica de aproximadamente 15 KDa.
- El aislado proteico que presentó un mayor porcentaje de actividad antioxidante es el precipitado a pH7,0 con una concentración proteica de 500 ($\mu\text{g/ml}$), con un valor de 31,26% y también al pH7,0 con una concentración de 1000 ($\mu\text{g/ml}$), se

obtuvo el porcentaje más alto de actividad antiinflamatoria (43,23%), en comparación a los demás pHs de precipitación y concentraciones proteicas ensayadas.

- La proteína de sésamo presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria por lo que puede ser utilizada como ingrediente funcional para dar un valor agregado a los productos ecuatorianos o a su vez podría ser comercializada como producto terminado.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar ensayos con diferentes pHs de solubilización y también con pHs de precipitación superiores a 7,0 y así verificar si efectivamente a pHs alcalinos, precipitan mejor las proteínas de sésamo.
- Se podría ampliar la investigación efectuando metodologías que permitan verificar el perfil proteico obtenido en este estudio, como el uso del HPLC y también estudiar los aminoácidos presentes en las proteínas de sésamo.
- Las actividades: antioxidante y antiinflamatoria, pueden ser estudiadas en los aislados proteicos de sésamo aplicando modelos *in vivo* para sustentar los resultados de este estudio obtenidos por métodos *in vitro*.
- Estudiar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los hidrolizados proteicos y compararlos con los resultados obtenidos de los aislados para identificar cuál de los dos ingredientes funcionales sería el más adecuado para incorporarlo en un alimento, mejorando su valor nutricional y funcional.

BIBLIOGRAFIA

- Abugoch L, Romero N, Tapia C, Silva J y Rivera M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(12):4745-50.
- Achouri A y Boye J. (2013). Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. *Agriculture and Agri-Food. Canadá*. 53: 240-251.
- Achouri A, Nail V y Boye J. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Agriculture and Agri-Food*. 46:360-369.
- Adrian Jean, Potus Jacques, Poiffait Annie, Dauvillier Pierre. (2004). Análisis nutricional de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. 179-182.
- Akbar F, Yousaf N, Rabbani M, Shinwari Z y Masood M. (2012). Study of total seed proteins pattern of sesame (*Sesamum indicum*) landraces via sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), *Pakistan Journal of Botany*. 44(2): 2009-2014.
- Akoh Casimir y Min David. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. CRC Press-Taylor and Francis Group. Third Edition. New York. 18-25.
- Alhakmani F, Kumar S y Khan S. (2013). Estimation of total phenolic content in vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *India*, 3(8):623-627.
- Arias E. (2013). *Biomoléculas: Ediciones Universidad de Salamanca*.
- Badui Salvador. (2006). *Química de los Alimentos. Cuarta Edición*. Editorial Pearson. México. 170-173.
- Balderrama V. (2010). Digestibilidad ideal estandarizada de la proteína de pastas de ajonjolí y de soya en lechones. *Veracruz-México*. 11: 124-128.
- Bandyopadhyay K y Ghosh S. (2002). Preparation and Characterization of Papain-Modified Sesame (*Sesamum indicum* L.) Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (23): 6854–6857.
- Bedigian D, Seigler D y Harlan J. (1985). Sesamin, sesamol and the origin of sesame. *Biochemical Systematics and Ecology*. 13(2):133-139.
- Benítez R, Ibarz A y Pagan J. (2008). “Hidrolizados de Proteína: proceso y aplicaciones”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 42 (2): 154-159.
- Biswas A, Dhar P, y Ghosh S. (2010). Antihyperlipidemic effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate in rats fed a normal and high cholesterol diet. *Journal of Food Science*. 75: 274–279.
- Brinegar C y Goundan S. (1993). Isolation and characterization of chenopod in, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:182-5.

- Chacón C. (2004). Determinación del antioxidante sintético más estable contra la oxidación, en el estudio comparativo sobre la degradación de diferentes aceites vegetales utilizados como medio de transferencia de calor y de masa. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería Química. Guatemala. 15-20.
- Chiriboga M. (2013). Evaluación de la Efectividad Nutricional de la Pasta de Ajonjolí (*Sesamum Indicum L.*) como sustituto de la pasta de soya en el crecimiento de codornices. Tesis de Grado Previa a la obtención del Título de Ingeniera en Agroempresas. USFQ. Quito-Ecuador. 28-32.
- Duce A. (2005). Patología Quirúrgica. Editorial Gea S.L. Madrid-España. 50-52.
- Elleuch M, Besbes S, Roiseux O, Blecker C y Attia H. (2007). Quality characteristics of sesame seeds and by-products. Food Chemistry. 103 (2): 641-650.
- Espinal C, Martínez H, Pinzón N, Peña Y, Acevedo X, Beltrán L, González F y Amezcuita J. (2006). Observatorio Agrocadenas. Agroindustria y Competitividad. Bogotá Colombia. 35.
- Fabris S, Momo F, Ravagna G y Stevanato R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. Biophysical Chemistry. 135: 76–83.
- Fukuda Y, Nagata M, Osawa T y Namiki M. (1986). Contribution of lignan analogues to antioxidative activity of refined unroasted sesame seed oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 63(8):1027-103.
- Gandhi A y Srivastava J. (2007). Study on the production protein isolates from defatted sesame seed (*Sesamum indicum*) flour and their nutritional profile. Asean Food Journal 14(1):175-180.
- García L, Rojo D, García L y Maureen A. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 21(3):214-216.
- García M, Torre M, Marina M, Laborda F y Rodríguez A. (1997). Composition and characterization of soyabean and related products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 37 (4):361-391.
- Gómez H, González K y Medina J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad de Santiago de Chile. 10(3):182-217.
- Gornall A, Bardawill, Ch y David M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. Journal of Biological Chemistry. 177: 751-766.
- Henriques E, Apolinário L, Santana M, Pereira M y Santos A. (2014). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Sesame Oil and Sesamin. Journal Nutrients. 6(5): 1931–1944.
- Herrera C y Bolaños N. (2003). Química de Alimentos, Manual de Laboratorio. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Primera Edición. 36.
- Hill W y Kolb D. (1999). Química para el nuevo milenio. Editorial Pearson. Octava Edición. México. 448-449.

- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, y Chi L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*. 29:1062–107.
- Iglesias J. (2009). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. 36-43.
- INIAP Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (1974). Mejores rendimientos con una nueva densidad de siembra en el cultivo de ajonjolí. Documento Técnico Agropecuario. Quito-Ecuador. 31.
- Jiménez R, Martos G, Carrillo W, López R y Molina E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*. 127:1719-1726.
- Khalid E, Babiker E y Tinay A. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*. 82:361-366.
- L'Hocine L y Boye J. (2007) Allergenicity of Soybean: New Developments in Identification of Allergenic Proteins, Cross-Reactivities and Hypoallergenization Technologies *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47:127-143.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Leelaprakash G y Mohan S. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*. 3(3):189-196.
- Liu L y Chiang P. (2008). Production of hydrolysate with antioxidative activity and functional properties by enzymatic hydrolysis of defatted sesame (*Sesamum indicum* L). *International Journal of Applied Science and Engineering*. 6(2):73–83.
- López G, Flores I, Galvez A, Quirasco M y Farres A. (2003). Development of a liquid supplement using a *Sesamum indicum* L. protein isolate. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 36:67-74.
- MAGAP (Ministerio de Agricultura Ganadería, Acuacultura y Pesca). (2013). Propuestas para enfrentar el cambio climático que influye en los cultivos de quinua. Ecuador.
- Martínez E y Añón M. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44:2523-2530.
- Matiz G, Franco L, Rincón J. (2011). Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L. (Swartz). *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. Bogotá- Colombia. 43(3):281-28.
- Martínez A y Martínez V. (2006). Proteins and peptides in enteral nutrition. *Nutrición Hospitalaria*. 21(2):1-14.
- Martínez E y Garrido O. (2013). Farmacocinética: antiulcerosos y antiinflamatorios. *Revista del Hospital Juárez de México*. 80(1):41-53.

- Moreno F, Maldonado B, Wellner N y Mills E. (2005). Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin from white sesame seeds (*Sesamum indum L*) Biochimica et Biophysica Acta. 1752(2):142-153.
- Murilla S, y Cuca G. (1969). Disponibilidad de calcio y metionina de la pasta de ajonjolí en aves. Revista Mexicana de Ciencias Precuarias.1: 23-29.
- Nakano D, Ogura K, Miakoshi M, Ishii F, Kawanishi H y Kurumazuka C. (2006). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 70 (5):1118–1126.
- Nilo R, Dench J y Caygill J. (1981). Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum L*) seed and the preparation of two protein isolates. Journal of the Science of Food and Agriculture. 32: 565–571.
- Onsaard E, Pomsamud P y Audtum P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. Asian Journal and Food Agro-Industry. 3(4):420-431.
- Orruño E and Morgan M. (2011). Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum L*) to proteolytic digestive enzymes. Food Chemistry. 128(4):923-929.
- Oseguera M. (2009). Actividad antioxidante y Antiinflamatoria de hidrolizados de proteína de dos variedades de frijol común. Proyecto previo a la obtención del Título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 52-64.
- PLAN NACIONAL DEL BUEN VIVIR (2013-2017). Disponible en. <http://www.forosecuador.ec/forum/ecuador/pol%C3%ADtica/1833-descargar-plan-nacional-del-buen-vivir-2013-2017-en-pdf>
- Ranjana D, Amrita D y Chiranjib B. 2012. Preparation of sesame peptide and evaluation of antibacterial activity on typical pathogens. Food Chemistry. 131: 1504–1509.
- Reyes M, Galicia C y Carrillo I. (2011). Antioxidantes: la Magia de lo Natural. Tlatemoani. 8:1-16.
- Rodríguez L. (2011). Diseño de una máquina tostadora de Ajonjolí de 40 Kg/h de capacidad. Proyecto Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Mecánico. Tesis Pregrado. EPN. Quito. 15-20.
- Rojano B, Gaviria C y Sáez J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el Isoespintanol. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín- Colombia. 212-218.
- Sangita C, Priyanka C, Protapaditya D y Sanjib B. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(1):178-180.
- Sarmadi, B e Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides, An International Journal. 31(10):1949-1956.

- Sato A, Viswanathan M, Kent R, y Wood C. (2006). Therapeutic peptides: Technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:638-642.
- Segal C y Ortega G. (2005). *Manual de Prácticas, Biología Molecular de la Célula*. Facultad de Ciencias de la UNAM. Primera Edición. 45-47.
- Sen M, Kopper R, Pons L, Abraham E, Burks A y Bannon G. (2002). Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *Journal of Immunology*. 169:882-887.
- Singharaj S. y Onsaard E. (2015). Production and characteristic of sesame proteins. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1):188-192.
- Srivastava R, Roy B. (2013). Proteomic analysis of different extracts from amaranth (*Amaranthus tricolor*) grains. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6:37-9.
- Thomas K, Aalbers M, Bannon G, Bartels M, Dearman R y Esdaile D. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology Pharmacology*. 39:87-98.
- Vega F. (2004). Aditivos alimentarios: usos y abusos. Ministerio de Educación y ciencia. 89-117.
- Vioque J, Pedroche J, Yust M, Lqari H, Megías C, Girón J, Alaiz M y Millán F. (2006). Bioactive peptides in storage plant proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*. 3:99-102.
- Vioque J, Sanchez R, Pedroche J, Yust M y Millán F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y aceites*. 52(2):127-131.
- Wang J, Zhao M, Yang X y Jiang Y. (2006). Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science* 44(1): 93-100.

ANEXO A
ANÁLISIS PROXIMAL DE LA TORTA DE SÉSAMO



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS

Dir: Av. Los Chaguales y Río Payamino, Huachi, Telf.: 2 400997 ext. 114, e-mail: lacomal@uta.edu.ec; lacomal@hotmail.com
Ambato-Ecuador



CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No: 15-319

Solicitud N°: 15-319	Fig. 1 de 1
Fecha recepción: 24 de noviembre 2015	Fecha de ejecución de ensayos: 24-30 noviembre 2015

Información del cliente:	
Empresa: n/a	C.I./RUC: 1730596201
Representante: Tamara Nathaly Poveda Loayza	DI: 0995064446
Dirección: Marcos Montalvo y Acosta Solís	Email: tatty.poveda@hotmail.com
Ciudad: Ambato	
Descripción de las muestras:	
Producto: Harina de ajojoli	Peso: 400 g
Marcas comercial: n/a	Tipo de envase: Fonda Plástica
Lote: n/a	Nº de muestras: 1
F. Exp.: n/a	F. Exp.: n/a
Conservación: Ambiente: x Refrigeración: Congelación:	Almac.: en Lab.
Criterios seguridad: Ninguno: Intactos: Rotos:	Muestreo por el cliente: 19 noviembre 2015

RESULTADOS OBTENIDOS

Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Harina de ajojoli	31915973	Ninguno	Cenizas	PERI-3.4-FQ, AOAC Ed 19, 2012 923.03	%	11.1
			Proteína	PERI-5.4-FQ, AOAC Ed 19, 2012 1001.11	%(Nx6.25)	40.1
			Humedad	PERI-3.4-FQ, AOAC Ed 19, 2012 925.10	%	10.1
			Grasa	PERI-5.4-FQ, AOAC Ed 19, 2012 2003.06	%	10.8
			Fibra cruda	INEN 522	%	5.74
			Carbohidratos Totales	Cálculo	%	22.2

Conds. Ambientales: 19.2 °C; 50%HR

Ing. Gladys Resueño
Directora de Calidad

Autorización para transferencia electrónica de resultados: Si

Nota: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Solo se permite su reproducción sin fines de lucro y únicamente referencial a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser visulada. Si usted no es el destinatario de esta información recomendaríamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente."

ANEXO B

**DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL
RENDIMIENTO PROTEICO DE SÉSAMO OBTENIDO A
DIFERENTES pH DE PRECIPITACIÓN Y CON DOS MÉTODOS
DE EXTRACCIÓN (AGUA Y SOLUCIÓN SALINA).**

Tabla 8. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación, por réplica (Método: 1)

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	10,015	10,0387	10,0069
	w FINAL (g)	0,7316	0,7577	1,0545
	%R	7,3050	7,5478	10,5377
pH 4	w INICIAL (g)	10,0836	10,0138	10,0438
	w FINAL (g)	0,7591	0,9967	0,7568
	%R	7,5281	9,9533	7,5350
pH 5	w INICIAL (g)	10,082	10,0544	10,0154
	w FINAL (g)	0,9657	0,9245	0,9423
	%R	9,5785	9,1950	9,4085
pH 6	w INICIAL (g)	10,0427	10,0381	10,0422
	w FINAL (g)	1,1843	1,2734	1,2597
	%R	11,7926	12,6857	12,544064
pH 7	w INICIAL (g)	10,0342	10,0029	10,0246
	w FINAL (g)	1,4529	1,5084	1,4657
	%R	14,4795	15,0796	14,6210

Tabla 9. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación, por réplica (Método: 2)

		R1	R2	R3
pH 3	w INICIAL (g)	10,041	10,0282	10,0139
	w FINAL (g)	0,8326	0,8153	0,9565
	%R	8,2920	8,1301	9,5517
pH 4	w INICIAL (g)	10,031	10,1731	10,0535
	w FINAL (g)	0,9952	1,1526	1,1219
	%R	9,9212	11,3299	11,1593
pH 5	w INICIAL (g)	10,0084	10,09	10,1551
	w FINAL (g)	1,5203	1,4355	1,4896
	%R	15,1902402	14,22695738	14,66849169
pH 6	w INICIAL (g)	10,0659	10,163	10,0311
	w FINAL (g)	0,5784	0,5862	0,3461
	%R	5,746132984	5,767981895	3,450269661
pH 7	w INICIAL (g)	10,0339	10,0356	10,0366
	w FINAL (g)	4,4254	4,4632	4,5306
	%R	44,10448579	44,47367372	45,14078473

Tabla 10. Pesos y rendimiento proteico obtenido a diferentes pHs de precipitación (Método: 2, muestras dializadas)

	w INICIAL	w FINAL	RENDIMIENTO (%)
pH3	0,5780	0,0244	4,22
pH 4	0,5780	0,0271	4,69
pH5	0,5780	0,0401	6,94
pH6	0,5780	0,0107	1,85
pH7	0,5780	0,0995	17,21

Tabla 11. Comparación entre muestras sin dializar y dializadas, a todos los pHs ensayados

Prueba de muestras emparejadas (pH3)

R. Experimental: rendimiento	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin dializar - Dializada	4.4332	.81575	.47098	2.40682	6.45971	9.413	2	.011

Prueba de muestras emparejadas (pH4)

R. Experimental: rendimiento	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin dializar - Dializada	6.1146	.86365	.49863	3.96917	8.26003	12.263	2	.007

Prueba de muestras emparejadas (pH5)

R. Experimental: rendimiento	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin dializar - Dializada	7.7562	.44193	.25515	6.65838	8.85401	30.399	2	.001

Prueba de muestras emparejadas (pH6)

R. Experimental: rendimiento	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin dializar - Dializada	3.1348	.72640	.41939	1.33038	4.93934	7.475	2	.017

Prueba de muestras emparejadas (pH7)

R. Experimental: rendimiento	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Sin dializar - Dializada	27.363	.45098	.26037	26.24356	28.48414	105.095	2	.000

Tabla 12. Análisis de varianza para el rendimiento proteico (%)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	625.822 ^a	9	69.536	94.298	.000
Interceptación	2332.648	1	2332.648	3163.332	.000
pH	395.622	4	98.905	134.127	.000
Métodos (agua y sal)	101.004	1	101.004	136.972	.000
pH * Métodos	129.197	4	32.299	43.801	.000
Error	14.748	20	.737		
Total	2973.218	30			
Total corregido	640.570	29			

a. R al cuadrado = .977 (R al cuadrado ajustada = .967)

Tabla 13. Comparación entre pHs. Método 1 (agua): respuesta experimental: rendimiento proteico (%)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto	
		1	2
4.00	3	8.3388	
3.00	3	8.4635	
5.00	3	9.3940	
6.00	3		12.3408
7.00	3		14.7267
Sig.		.738	.111

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 1.112.

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

Tabla 14. Comparación entre pHs. Método 2 (NaCl 1M): respuesta experimental: rendimiento proteico (%)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
6.00	3	1.8533			
3.00	3		4.2247		
4.00	3		4.6889		
5.00	3			6.9390	
7.00	3				17.2091
Sig.		1.000	.873	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .362.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 15. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 3

Prueba de muestras independientes

Rendimiento	Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	14.643	.019	4.077	4	.015	4.23883	1.03979	1.35193	7.12574
No se asumen varianzas iguales			4.077	2.00	.055	4.23883	1.03979	-.22974	8.70741

Tabla 16. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 4

Prueba de muestras independientes

Rendimiento	Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	8.367	.044	4.389	4	.012	3.64993	.83157	1.34113	5.95873
No se asumen varianzas iguales			4.389	2.24 4	.039	3.64993	.83157	.41975	6.88012

Tabla 17. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 5

Prueba de muestras independientes

Rendimiento	Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	2.31	.203	7.316	4	.002	2.45497	.33558	1.52324	3.38669
No se asumen varianzas iguales			7.316	2.48	.010	2.45497	.33558	1.24968	3.66026

Tabla 18. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 6

Prueba de muestras independientes

Rendimiento	Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	.587	.486	17.966	4	.000	10.48752	.58375	8.86677	12.10827
No se asumen varianzas iguales			17.966	3.07	.000	10.48752	.58375	8.65447	12.32058

Tabla 19. Diferencias entre métodos de extracción proteica a pH de precipitación: 7

Prueba de muestras independientes

Rendimiento	Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	4.466	.102	-5.154	4	.007	-2.48243	.48163	-3.81966	-1.14521
No se asumen varianzas iguales			-5.154	2.64	.019	-2.48243	.48163	-4.13992	-.82495

ANEXO C

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LA PROTEÍNA DE SÉSAMO AISLADA A DIFERENTES pH DE PRECIPITACIÓN.

Tabla 20. Datos para la construcción de la curva estándar albúmina de suero bovina (BSA)

Concentración de BSA (mg/ml)	Absorbancia (nm)
0,000	0,000
3,794	0,139
7,656	0,265
11,402	0,373
15,324	0,479

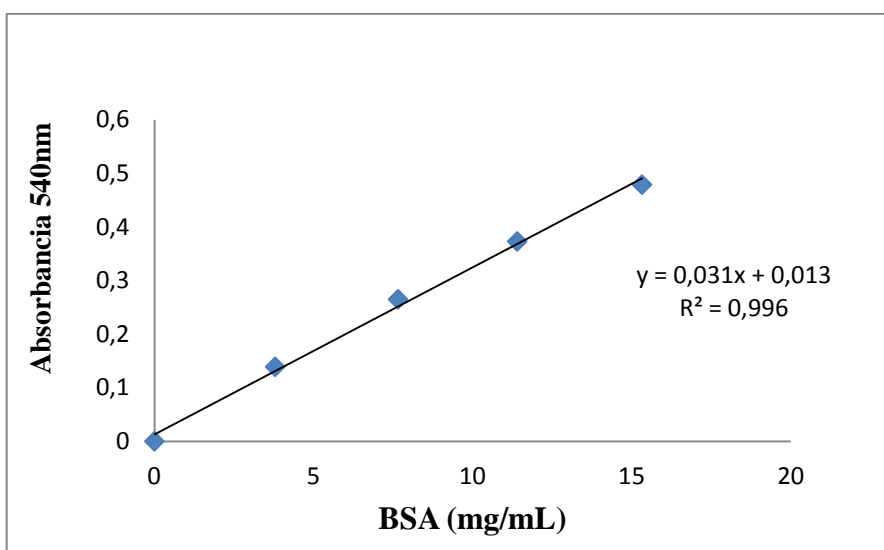


Figura 12. Curva estándar de BSA

Ecuación obtenida de la curva de calibración:

$$A = m * C + B$$

A: Absorbancia

m: Pendiente de la ecuación de calibración

C: Concentración (mg/ml)

B: Interacción del valor de la absorbancia

Tabla 21. Valores de absorbancia de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, medidos a 540 nm

	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
R1	0,254	0,14	0,129	0,124	0,172
R2	0,232	0,104	0,128	0,106	0,165
R3	0,256	0,138	0,132	0,122	0,17
R4	0,230	0,104	0,13	0,107	0,162

Tabla 22. Cálculo del contenido proteico (%) de la proteína de sésamo precipitada a diferentes pHs

	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
R1	69,5	38,7	36,0	34,6	48,0
R2	71,5	28,7	38,1	29,9	47,6
R3	70,1	38,1	37,0	34,0	47,4
R4	70,9	28,7	38,8	30,2	46,7
Promedio	70,5	33,6	37,5	32,2	47,4
Desv. Estándar	0,9	5,6	1,2	2,4	0,6

Tabla 23. Análisis de varianza del contenido proteico de la proteína de sésamo

Respuesta Experimental: % Contenido proteico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4021.345	4	1005.336	125.341	.000
Dentro de grupos	120.313	15	8.021		
Total	4141.658	19			

Tabla 24. Comparación de medias entre los contenidos proteicos de la proteína de sésamo precipitada a diferentes pHs

HSD Tukey^a

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6.00	4	32.1750		
4.00	4	33.5500		
5.00	4	37.4750		
7.00	4		47.4250	
3.00	4			70.5000
Sig.		.111	1.000	1.000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

ANEXO D

DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE SÉSAMO OBTENIDOS A DIFERENTES pH DE PRECIPITACIÓN.

Tabla 25. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, sometidos a la reacción con aceite oxidado y ácido tiobarbitúrico

		CONC. 1 100 µg/ml	CONC. 2 200 µg/ml	CONC. 3 500 µg/ml	CONC. 4 1000 µg/ml	Blanco aceite oxidado
pH 3	R1	2,691	2,613	2,486	2,532	2,862
	R2	2,686	2,609	2,483	2,531	
	R3	2,669	2,604	2,482	2,53	
pH 4	R1	2,566	2,56	2,48	2,537	2,862
	R2	2,563	2,557	2,473	2,525	
	R3	2,565	2,556	2,489	2,534	
pH 5	R1	2,79	2,751	2,556	2,548	2,862
	R2	2,775	2,762	2,545	2,554	
	R3	2,777	2,76	2,542	2,546	
pH 6	R1	2,951	2,671	2,483	2,51	2,862
	R2	2,945	2,653	2,476	2,517	
	R3	2,929	2,647	2,473	2,526	
pH 7	R1	2,543	2,524	2,419	2,502	2,862
	R2	2,539	2,525	2,415	2,505	
	R3	2,532	2,531	2,410	2,51	
BHT	R1	2,598	2,566	2,341	1,943	2,862
	R2	2,61	2,561	2,349	1,951	
	R3	2,604	2,571	2,336	1,932	

Tabla 26. Actividad antioxidante (%) de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs

FACTOR A: pH precipitación	FACTOR B: concentración Proteína	Tratamientos	R1	R3	R 3	Promedio	Desv. Estándar
3	100	a0b0	11,95	12,30	13,49	12,58	0,806
3	200	a0b1	17,40	17,68	18,03	17,70	0,315
3	500	a0b2	26,28	26,48	26,55	26,44	0,145
3	1000	a0b3	23,06	23,13	23,20	23,13	0,070
4	100	a1b0	20,68	20,89	20,75	20,78	0,107
4	200	a1b1	21,10	21,31	21,38	21,27	0,145
4	500	a1b2	26,69	27,18	26,07	26,65	0,561
4	1000	a1b3	22,71	23,55	22,92	23,06	0,436
5	100	a2b0	5,03	6,08	5,94	5,68	0,569
5	200	a2b1	7,76	6,99	7,13	7,29	0,409
5	500	a2b2	21,38	22,15	22,36	21,97	0,515
5	1000	a2b3	21,94	21,52	22,08	21,85	0,291
6	100	a3b0	6,22	5,80	4,68	5,57	0,795
6	200	a3b1	13,35	14,61	15,02	14,33	0,873
6	500	a3b2	26,48	26,97	27,18	26,88	0,359
6	1000	a3b3	24,60	24,11	23,48	24,06	0,561
7	100	a4b0	22,29	22,57	23,06	22,64	0,389
7	200	a4b1	23,62	23,55	23,13	23,43	0,265
7	500	a4b2	30,96	31,24	31,59	31,26	0,315
7	1000	a4b3	25,16	24,95	24,60	24,90	0,282

Tabla 27. Actividad antioxidante (%) de diferentes concentraciones del estándar BHT

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	Promedio	Desv. Estándar
100	18,45	17,61	18,03	18,03	0,42
200	20,68	21,03	20,34	20,68	0,35
500	36,41	35,85	36,76	36,34	0,46
1000	64,22	63,66	64,99	64,29	0,67

Tabla 28. Análisis de varianza. Diseño experimental a*b

Respuesta experimental: % Actividad Antioxidante

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	9281.680 ^a	23	403.551	1812.774	.000
Interceptación	36557.629	1	36557.629	164218.870	.000
Conc. proteína	3362.817	3	1120.939	5035.319	.000
pH	3120.769	5	624.154	2803.733	.000
Conc. proteína * pH	2798.094	15	186.540	837.946	.000
Error	10.686	48	.223		
Total	45849.995	72			
Total corregido	9292.365	71			

a. R al cuadrado = .999 (R al cuadrado ajustada = .998)

Tabla 29. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 100 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
6.00	3	5.5667				
5.00	3	5.6833				
3.00	3		12.5800			
BHT	3			18.0300		
4.00	3				20.7733	
7.00	3					22.6400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .325.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 30. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 200 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
5.00	3	7.2933				
6.00	3		14.3267			
3.00	3			17.7033		
BHT	3				20.6833	
4.00	3				21.2633	
7.00	3					23.4333
Sig.		1.000	1.000	1.000	.633	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .206.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 31. Comparación entre pH a una conc. proteica de 500 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
5.00	3	21.9633			
3.00	3		26.4367		
4.00	3		26.6467		
6.00	3		26.8767		
7.00	3			31.2633	
BHT	3				36.3400
Sig.		1.000	.781	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .172.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 32. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 1000 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
5.00	3	21.8467			
4.00	3		23.0600		
3.00	3		23.1300		
6.00	3		24.0633	24.0633	
7.00	3			24.9033	
BHT	3				64.2900
Sig.		1.000	.117	.237	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .187.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 33. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH3

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	12.5800			
200.00	3		17.7033		
1000.00	3			23.1300	
500.00	3				26.4367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .194.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 34. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH4

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto		
		1	2	3
100.00	3	20.7733		
200.00	3	21.2633		
1000.00	3		23.0600	
500.00	3			26.6467
Sig.		.409	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .133.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 35. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH5

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto		
		1	2	3
100.00	3	5.6833		
200.00	3		7.2933	
1000.00	3			21.8467
500.00	3			21.9633
Sig.		1.000	1.000	.989

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .211.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 36. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH6

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	5.5667			
200.00	3		14.3267		
1000.00	3			24.0633	
500.00	3				26.8767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .459.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 37. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH7

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto		
		1	2	3
100.00	3	22.6400		
200.00	3	23.4333		
1000.00	3		24.9033	
500.00	3			31.2633
Sig.		.061	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .100.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 38. Comparación entre las concentraciones del control BHT

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	18.0300			
200.00	3		20.6833		
500.00	3			36.3400	
1000.00	3				64.2900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .238.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 39. Análisis de varianza entre los Tratamientos: pH y concentración proteica

ANOVA					
FV	SC	GL	CM	RV	F tablas
Tratamientos	3044,91	19	160,2585	743,5755	1,87
Replicas	0,59	2	0,2952	1,3697	3,24
Error	8,19	38	0,2155		
Total	3053,69	59			

Tabla 40. Prueba de comparación de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antioxidante)

	a2b0	a2b0	a2b1	a0b0	a3b1	a0b1	a1b0	a1b1	a2b3	a2b2	a4b0	a1b3	a0b3	a4b1	a2b3	a4b3	a0b2	a1b2	a1b2	a4b2	TUKEY
	5.57	5.68	7.19	12.58	14.33	17.70	20.78	21.27	21.85	21.87	22.84	23.06	23.13	23.43	24.06	24.90	25.44	25.65	25.88	26.26	
5.367	0,00	0,12	1,72	7,01	8,76	12,14	15,21	15,70	16,28	16,40	17,07	17,49	17,56	17,87	18,50	19,33	20,87	21,08	21,31	21,69	0,83
5.684		0,00	1,61	6,88	8,64	12,02	15,09	15,58	16,17	16,28	16,96	17,38	17,45	17,75	18,38	19,22	20,75	20,96	21,20	21,58	
7.291			0,00	5,29	7,05	10,41	13,49	13,98	14,56	14,68	15,35	15,77	15,84	16,14	16,77	17,61	19,13	19,34	19,59	20,07	
12.579				0,00	1,75	5,12	8,20	8,69	9,27	9,39	10,06	10,48	10,55	10,85	11,48	12,32	13,80	14,07	14,30	14,88	
14.328					0,00	3,38	6,45	6,94	7,52	7,64	8,32	8,74	8,81	9,11	9,74	10,58	12,11	12,32	12,58	13,05	
17.705						0,00	3,07	3,56	4,15	4,26	4,94	5,36	5,43	5,73	6,36	7,20	8,74	8,94	9,18	9,56	
20.778							0,00	0,49	1,07	1,19	1,86	2,28	2,35	2,65	3,28	4,12	5,66	5,87	6,10	6,48	
21.187								0,00	0,58	0,70	1,37	1,79	1,86	2,17	2,80	3,65	5,17	5,38	5,61	6,09	
21.890									0,00	0,11	0,79	1,21	1,28	1,58	2,21	3,05	4,59	4,80	5,03	5,41	
21.966										0,00	0,68	1,09	1,16	1,47	2,10	2,94	4,47	4,68	4,91	5,29	
22.642											0,00	0,42	0,49	0,79	1,42	2,26	3,80	4,01	4,24	4,62	
23.081												0,00	0,07	0,57	1,00	1,84	3,38	3,59	3,82	4,20	
23.151													0,00	0,30	0,99	1,77	3,31	3,52	3,75	4,13	
23.433														0,00	0,63	1,47	3,00	3,21	3,45	3,83	
24.062															0,00	0,84	2,38	2,59	2,82	3,20	
24.901																0,00	1,54	1,75	1,98	2,36	
26.438																	0,00	0,21	0,44	0,82	
26.648																		0,00	0,13	0,51	
26.881																			0,00	0,38	
31.280																				0,00	
	m	m	l	k	j	i	h	h	g	g	f	e	e	e	d	c	b	b	b	a	

ANEXO E

**DATOS OBTENIDOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS AISLADOS
PROTEICOS DE SÉSAMO OBTENIDOS A DIFERENTES pH DE
PRECIPITACIÓN.**

Tabla 41. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs, sometidos a reacción con albúmina de huevo

		CONC. 1 100 µg/ml	CONC. 2 200 µg/ml	CONC. 3 500 µg/ml	CONC. 4 1000 µg/ml	Blanco: Albúmina de huevo desnaturalizada
pH 3	R1	2,824	2,788	2,739	2,674	2,896
	R2	2,822	2,785	2,742	2,686	
	R3	2,835	2,791	2,735	2,680	
pH 4	R1	2,837	2,837	2,748	2,675	2,896
	R2	2,844	2,829	2,754	2,678	
	R3	2,835	2,833	2,743	2,682	
pH 5	R1	2,831	2,761	2,728	2,682	2,896
	R2	2,844	2,752	2,739	2,675	
	R3	2,837	2,757	2,734	2,672	
pH 6	R1	2,841	2,783	2,749	2,634	2,896
	R2	2,835	2,791	2,746	2,628	
	R3	2,838	2,787	2,750	2,637	
pH 7	R1	2,786	2,742	2,635	2,581	2,896
	R2	2,790	2,747	2,632	2,586	
	R3	2,792	2,738	2,625	2,582	
BHT	R1	2,634	2,573	2,422	2,325	2,896
	R2	2,641	2,575	2,425	2,324	
	R3	2,630	2,578	2,418	2,318	

Tabla 42. Actividad antiinflamatoria (%) de los aislados proteicos de sésamo precipitados a diferentes pHs

FACTOR A: pH precipitación	FACTOR B: concentración Proteína	Tratamientos	R 1	R 2	R 3	Promedio	Desv. Estándar
3	100	a0b0	9,94	10,22	8,43	10,08	0,97
3	200	a0b1	14,92	15,33	14,50	15,12	0,41
3	500	a0b2	21,69	21,27	22,24	21,48	0,49
3	1000	a0b3	30,66	29,01	29,83	29,83	0,83
4	100	a1b0	8,15	7,18	8,43	7,67	0,65
4	200	a1b1	8,15	9,25	8,70	8,70	0,55
4	500	a1b2	20,37	19,61	21,13	19,99	0,76
4	1000	a1b3	30,52	30,04	29,56	30,28	0,48
5	100	a2b0	8,98	7,18	8,08	8,08	0,90
5	200	a2b1	18,65	19,89	19,27	19,27	0,62
5	500	a2b2	23,20	21,69	22,44	22,44	0,76
5	1000	a2b3	29,56	30,52	30,94	30,04	0,71
6	100	a3b0	7,60	8,43	8,01	8,01	0,41
6	200	a3b1	15,61	14,50	15,06	15,06	0,55
6	500	a3b2	20,30	20,72	20,17	20,51	0,29
6	1000	a3b3	36,19	37,02	35,77	36,60	0,63
7	100	a4b0	15,19	14,64	14,36	14,92	0,42
7	200	a4b1	21,20	20,58	21,82	20,89	0,62
7	500	a4b2	36,05	36,46	37,43	36,26	0,71
7	1000	a4b3	43,51	42,82	43,37	43,16	0,37

Tabla 43. Actividad antiinflamatoria (%) de diferentes concentraciones del estándar Diclofenaco

Conc. (µg/ml)	R1	R2	R3	PROMEDIO	Desv. Estándar
100	36,19	35,22	36,74	36,05	0,77
200	44,61	44,34	43,92	44,29	0,35
500	65,47	65,06	66,02	65,52	0,49
1000	78,87	79,01	79,83	79,24	0,52

Tabla 44. Análisis de varianza. Diseño experimental a*b

Respuesta experimental: % Actividad Antiinflamatoria

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	22366.758 ^a	23	972.468	2536.349	.000
Interceptación	51821.609	1	51821.609	135158.892	.000
pH	13532.146	5	2706.429	7058.792	.000
Conc. proteína	7858.940	3	2619.647	6832.450	.000
pH * conc. proteína	975.672	15	65.045	169.647	.000
Error	18.404	48	.383		
Total	74206.771	72			
Total corregido	22385.162	71			

a. R al cuadrado = .999 (R al cuadrado ajustada = .999)

Tabla 45. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 100 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto		
		1	2	3
4.00	3	7.9200		
6.00	3	8.0133		
5.00	3	8.0800		
3.00	3	9.5300		
7.00	3		14.7300	
Diclofenaco	3			36.0500
Sig.		.138	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .518.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 46. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 200 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
4.00	3	8.7000				
3.00	3		14.9167			
6.00	3		15.0567			
5.00	3			19.2700		
7.00	3				21.2000	
Diclofenaco	3					44.2900
Sig.		1.000	.999	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .279.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 47. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 500 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
4.00	3	20.3700			
6.00	3	20.3967			
3.00	3	21.7333	21.7333		
5.00	3		22.4433		
7.00	3			36.6467	
Diclofenaco	3				65.5167
Sig.		.134	.707	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .367.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 48. Comparación entre pHs a una conc. proteica de 1000 (µg/ml)

HSD Tukey^{a,b}

pH	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
3.00	3	29.8333			
4.00	3	30.0400			
5.00	3	30.3400			
6.00	3		36.3267		
7.00	3			43.2333	
Diclofenaco	3				79.2367
Sig.		.902	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .370.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 49. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH3

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	9.5300			
200.00	3		14.9167		
500.00	3			21.7333	
1000.00	3				29.8333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .504.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 50. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH4

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto		
		1	2	3
100.00	3	7.9200		
200.00	3	8.7000		
500.00	3		20.3700	
1000.00	3			30.0400
Sig.		.460	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .385.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 51. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH5

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	8.0800			
200.00	3		19.2700		
500.00	3			22.4433	
1000.00	3				30.3400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .566.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 52. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH6

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	8.0133			
200.00	3		15.0567		
500.00	3			20.3967	
1000.00	3				36.3267
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .242.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 53. Comparación entre las concentraciones de proteína precipitada a pH7

HSD Tukey^{a,b}

Conc. proteína	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	14.7300			
200.00	3		21.2000		
500.00	3			36.6467	
1000.00	3				43.2333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .299.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 54. Comparación entre las concentraciones de Diclofenaco

HSD Tukey^{a,b}

Con. diclofenaco	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
100.00	3	36.0500			
200.00	3		44.2900		
500.00	3			65.5167	
1000.00	3				79.2367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .304.

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

b. Alfa = 0.05.

Tabla 55. Análisis de varianza entre los Tratamientos: pH y concentración proteica

ANOVA					
FV	SC	GL	CM	RV	F tablas
Tratamientos	6385,72	19	336,0903	821,4335	1,87
Replicas	0,46	2	0,2292	0,5601	3,24
Error	15,55	38	0,4092		
Total	6401,72	59			

Tabla 56. Prueba de Tukey entre los Tratamientos: pH y concentración proteica (Respuesta experimental: actividad antiinflamatoria)

	a1b0	a1b1	a2b1	a0b0	a1b1	a0b1	a1b0	a1b1	a2b1	a2b2	a0b0	a1b1	a0b1	a0b1	a2b1	a4b1	a0b2	a1b2	a2b2	a4b2	TUKEY
7.82	7.82	8.01	8.08	8.70	8.53	14.73	14.92	15.08	19.27	20.37	20.40	21.20	21.73	21.44	29.85	30.04	30.34	36.33	36.65	43.18	1.15
8.01	0.00	0.09	0.18	0.79	1.61	6.81	7.00	7.14	11.39	12.45	12.48	13.28	13.81	14.53	21.92	21.12	21.42	28.41	28.73	35.31	
8.08		0.00	0.07	0.69	1.52	6.72	6.91	7.04	11.28	12.36	12.38	13.19	13.72	14.45	21.82	21.03	21.33	28.31	28.64	35.22	
8.70			0.00	0.62	1.45	6.65	6.84	6.98	11.19	12.29	12.32	13.12	13.65	14.38	21.75	21.96	22.26	28.25	28.57	35.15	
8.53				0.00	0.80	6.03	6.22	6.35	10.57	11.67	11.69	12.50	13.03	13.74	21.19	21.34	21.64	27.62	27.95	34.53	
14.73					0.00	5.20	5.39	5.52	9.74	10.84	10.87	11.67	12.20	12.91	20.80	20.51	20.81	28.80	27.12	33.70	
14.92						0.00	0.18	0.32	4.53	5.64	5.66	6.47	7.00	7.71	15.10	15.31	15.61	21.99	21.92	28.90	
15.08							0.00	0.14	4.35	5.46	5.48	6.28	6.81	7.53	14.92	15.12	15.42	21.41	21.73	28.31	
19.27								0.00	4.21	5.32	5.34	6.15	6.68	7.39	14.78	14.99	15.29	21.27	21.59	28.18	
20.37									0.00	1.10	1.13	1.93	2.46	3.18	10.57	10.77	11.07	17.06	17.38	23.96	
20.40										0.00	0.02	0.83	1.36	2.07	9.46	9.67	9.97	15.95	16.28	22.86	
21.20											0.00	0.81	1.34	2.05	9.44	9.65	9.94	15.93	16.25	22.84	
21.73												0.00	0.53	1.24	8.63	8.84	9.14	15.12	15.45	22.03	
21.44													0.00	0.71	8.10	8.31	8.61	14.39	14.92	21.90	
29.85														0.00	7.39	7.60	7.90	13.88	14.20	20.79	
30.04															0.00	0.21	0.31	8.49	8.81	13.40	
30.34																0.00	0.30	8.28	8.61	13.19	
36.33																	0.00	0.00	0.32	8.91	
36.65																		0.00	0.00	6.58	
43.18																			0.00	0.00	
	i	i	i	i	i	h	h	h	g	g	g	f	e	d	c	c	c	b	b	a	

ANEXO F
FOTOGRAFÍAS

OBTENCIÓN DE AISLADOS PROTEICOS DE SÉSAMO



TORTA DE SÉSAMO



MOLIDO DE LA TORTA



ADICIÓN DE AGUA RELACIÓN 1:10



AJUSTE DEL pH DE SOLUBLILIZACIÓN



AGITACIÓN DE LAS MUESTRAS



CENTRIFUGACIÓN



SEPARACIÓN DE SOBRENADANTE Y AJUSTE DE pH DE PRECIPITACIÓN



PRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA EN REFRIGERACIÓN Y SEPARACIÓN DEL SOBRENADANTE



LIOFILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA

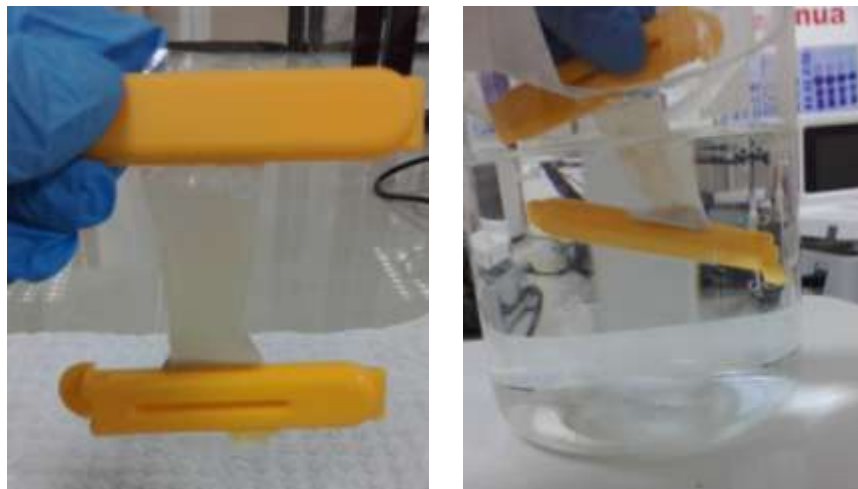


CONSERVACIÓN EN FRASCOS DE PLÁSTICO

DIÁLISIS DE PROTEÍNA EXTRAÍDA CON SOLUCIÓN DE SAL



AISLADOS PROTEICOS DE SÉSAMO OBTENIDOS CON SOL. SAL



PROCESO DE DIÁLISIS



PROTEÍNA DIALIZADA-LIOFILIZADA

CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE SÉSAMO

CUANTIFICACIÓN PROTEICA MÉTODO BIURET



PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



ADICIÓN DEL REACTIVO BIURET

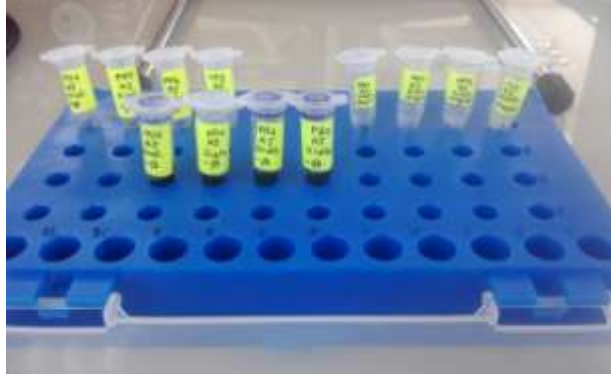


CENTRIFUGACIÓN



MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA

TÉCNICA DE ELECTROFORESIS



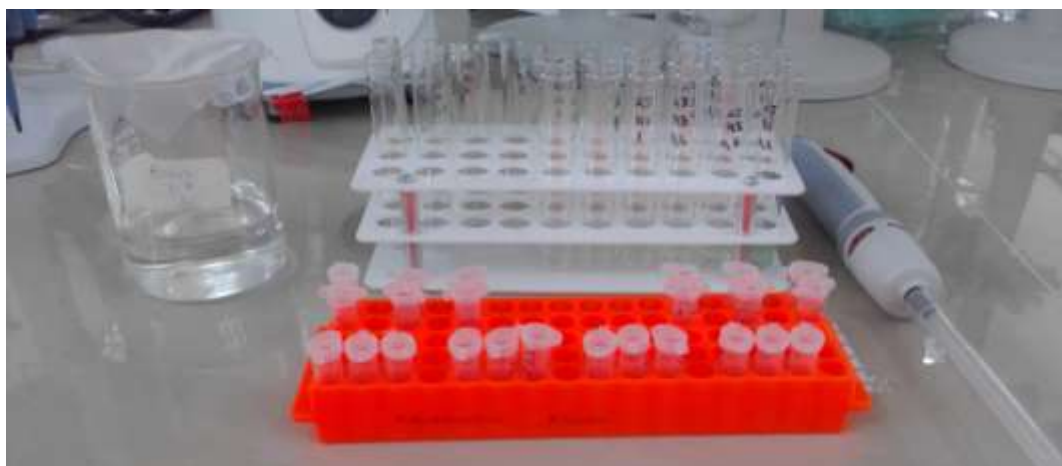
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE SÉSAMO



PESADO DE LA PROTEÍNA



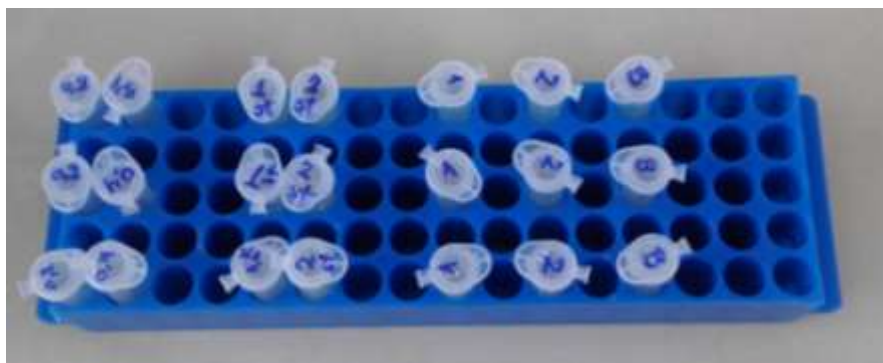
ALBÚMINA DE HUEVO



PREPARACIÓN DEL BUFFER FOSFATO Y DE LAS MUESTRAS



DESNATURALIZACIÓN DE LA ALBÚMINA DE HUEVO



PREPARACIÓN DE RÉPLICAS



MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA