



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



**Tema:**

Determinación de la Actividad antioxidante en polifenoles y Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* en proteínas de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus bataua*).

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

El estudio 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 el Centro de Investigaciones de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1373-CU-P-2014.

**Autora:** Estefany Fernanda Sandoval Aguiar.

**Tutor:** Wilman Ismael Carrillo Terán

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2016

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán**

### **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, 10 de Agosto del 2016.



---

Ph.D. Wilman Ismael Carrillo Terán

C.I: 17570800-4

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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



---

Estefany Fernanda Sandoval Aguiar

C.I: 100366596-3

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

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

Para constancia firman:



**Presidente del Tribunal**



**Dr. Orestes Darío López Hernández**

C.I: 175478486-4



**Dra. Dayana Cristina Morales Acosta**

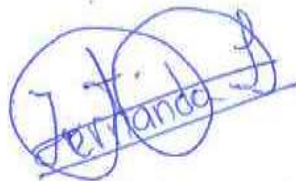
C.I: 180413557-0

Ambato, 16 de Septiembre del 2016.

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

Cedo los Derechos en línea patrimoniales 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.



---

Estefany Fernanda Sandoval Aguiar

C.I: 100366596-3

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por darme salud y vida, durante todos estos años junto a la protección de la Virgen María y el consuelo del Divino Niño Jesús.*

*A mis padres, VICENTE y MARY, los amo con todas mis fuerzas, gracias por el esfuerzo, consejos, guía y amor que siempre me brindan, por ustedes soy ahora una mujer de bien. Esta meta no es solo mía, sino también de ustedes.*

*Fer Sandoval.*

## AGRADECIMIENTO

*A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia en Ingeniería en Alimentos, por los excelentes docentes que tuve durante mi formación.*

*Al grupo de Alimentos Funcionales BIO – PROPEPTI, a la Ing. Cecilia Carpio por la ayuda brindada, a mis compañeros de laboratorio donde encontré bonitas amistades y en especial a mi tutor Ismael Carrillo que ha sido un guía inigualable durante este proceso, que más que un profesor fue un amigo y por su sencillez será un ejemplo durante mi vida profesional.*

*A mi abuelita Lolita, por sus consejos y amor incondicional que nos brinda siempre.*

*A mi hermano Chris y mi cuñada Sandry, gracias por todos los consejos y ayuda brindada durante estos años.*

*A mi pequeña hermana Lulú, por la compañía, amor, complicidades, enojos y ayuda que me das siempre, eres una hermana inigualable.*

*A mi amor Danny V, gracias por su apoyo durante casi toda mi vida universitaria, su amor incondicional, compañía, consejos, ayuda y protección que me brinda a diario, con usted seguiré alcanzando todas las metas propuestas. Le amo.*

*A mis amigos, March, Marce, Tatty, Mafer, Gaby y Jessy, que sin ustedes este camino no hubiera sido tan especial y grato.*

*A mis ladys, Tefy, Fer A, Anita, Ale, Kate, Karin, Glenda, Irina, Yos y Jeka que esta amistad siga y no termine, a pesar que tomemos distintos caminos.*

*Fer Sandoval.*

## INDICE GENERAL

<b>1. CAPITULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
1.3.1 Objetivo general.....	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
<b>2 CAPITULO II.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 UNGURAHUA.....	4
2.1.2 PROTEÍNAS.....	5
2.1.3 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO .....	5
2.1.3.1 BCA.....	5
2.1.3.2 BIURET.....	6
2.1.3.3 ELECTROFORESIS .....	6
2.1.3 SIMULACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GASTROINTESTINAL.	7
2.1.4 FENOLES TOTALES .....	8
2.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	9
2.1.5.1 MÉTODO TBARS .....	10
<b>2.2 HIPÓTESIS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....</b>	<b>11</b>
<b>3 CAPITULO III.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 MATERIALES .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Materia prima.....	12
3.1.2 Equipos.....	12
3.1.3 Reactivos.....	12
3.1.4 Insumos y utensilios.....	13
<b>3.2 MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Obtención de harina desengrasada de Ungurahua .....	13
3.2.2 Concentrado de proteínas de Ungurahua .....	14
3.2.3 Análisis Proximal.....	15
3.2.4 Determinación de Fenoles Totales (FT) .....	16



3.2.5	Caracterización del concentrado proteico.....	16
3.2.5.1	Cuantificación proteica .....	16
3.2.5.2	Electroforesis (SDS-PAGE).....	18
<b>3.2.6</b>	<b>Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> en proteína.....</b>	<b>19</b>
3.2.7	Actividad antioxidante de los concentrados proteicos y sobrenadante (Método TBARS).....	20
<b>3.3</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Rendimiento de los concentrados de la harina de la cáscara de Ungurahua. ....</b>	<b>21</b>
4.2.2	Análisis Proximal de la harina de la cáscara de Ungurahua. ....	22
4.2.3	Determinación de Fenoles Totales (FT). ....	23
4.2.4	Caracterización de concentrados proteico .....	24
4.1.4.1.	Cuantificación proteica.....	24
4.1.4.2.	Electroforesis (SDS-PAGE) .....	26
<b>4.2.5</b>	<b>Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> en proteína.....</b>	<b>30</b>
4.2.6	Actividad antioxidante de los concentrados proteicos y sobrenadante (Método TBARS).....	32
<b>4.3</b>	<b>VERIFICACIÓN DE HIPOTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Métodos para análisis proximal. ....	16
<b>Tabla 2.-</b> Rendimiento promedio de proteínas extraídas con agua.....	21
<b>Tabla 3.-</b> Rendimiento promedio de proteínas extraídas con hidróxido de sodio. ....	22
<b>Tabla 4.-</b> Análisis Proximal LACONAL.....	23
<b>Tabla 5.-</b> Contenido de fenoles Totales solubles (mg GAE/100g de muestra) .....	24
<b>Tabla 6.-</b> Cuantificación proteica por el método BCA. ....	25
<b>Tabla 7.-</b> Cuantificación proteica por el método de Biuret. ....	25
<b>Tabla 8.-</b> Cuantificación proteica por el método de Dumas. ....	26
<b>Tabla 9.-</b> Antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno). ....	33
<b>Tabla 10.-</b> Datos de concentrados proteicos con agua a diferentes pHs para determinar su rendimiento en base de 10gr de muestra. ....	45
<b>Tabla 11.-</b> Datos de concentrados proteicos con NaOH a diferentes pHs para determinar su rendimiento en base de 10gr de muestra. ....	45
<b>Tabla 12.-</b> Datos de la curva estándar de ácido gálico. ....	48
<b>Tabla 13.-</b> Datos del cálculo de fenoles totales (FT) del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.....	48
<b>Tabla 14.-</b> Datos de la curva estándar de BSA. ....	50
<b>Tabla 15.-</b> Datos cuantificación proteica por el método BSA. ....	50
<b>Tabla 16.-</b> Datos cuantificación proteica por el método Biuret.....	52
<b>Tabla 17.-</b> Datos cuantificación proteica por el método Dumas. ....	52
<b>Tabla 18.-</b> Datos de Absorbancia del aceite oxidado y no oxidado. ....	54
<b>Tabla 19.-</b> Datos de Absorbancia del BHT.....	54
<b>Tabla 20.-</b> Datos Absorbancias de las réplicas de las muestras del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.....	54
<b>Tabla 21.-</b> Datos promedios y desviación estándar de la absorbancia del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua. ....	55
<b>Tabla 22.-</b> Datos de absorbancias de las réplicas de las muestras de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua.....	55
<b>Tabla 23.-</b> Datos promedios y desviación estándar de Absorbancia de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Ilustración 1.</b> Obtención de harina.....	14
<b>Ilustración 2</b> Proteína y sobrenadante.....	15
<b>Ilustración 3.</b> Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con agua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. .	28
<b>Ilustración 4.</b> Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con Hidróxido de sodio en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. ....	29
<b>Ilustración 5.</b> Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con agua sin 2- $\beta$ -mercaptoetanol. ....	30
<b>Ilustración 6.</b> Electroforesis SDS-PAGE de simulación gástrica de concentrados proteicos de Ungurahua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol.....	31
<b>Ilustración 7.</b> Electroforesis SDS-PAGE de simulación duodenal de concentrados proteicos de Ungurahua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol.....	31
<b>Ilustración 8.</b> Porcentaje de actividad antioxidante del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.....	32
<b>Ilustración 9.</b> Porcentaje de actividad antioxidante de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua. ....	33
<b>Ilustración 10.</b> Curva estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales (FT). ....	48
<b>Ilustración 11.</b> Curva estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA). ....	50
<b>Ilustración 12.</b> Fruto de Ungurahua.	
<b>Ilustración 13.</b> Cáscara de Ungurahua.....	68
<b>Ilustración 14.</b> Harina de Ungurahua.	
<b>Ilustración 15.</b> Desengrasado de la harina de Ungurahua. ....	68
<b>Ilustración 16.</b> Harina desengrasada.	
<b>Ilustración 17.</b> Precipitación de la harina de la cáscara de Ungurahua. ....	68
<b>Ilustración 18.</b> Sobrenadante	
<b>Ilustración 19.</b> Liofilización de la proteína de la cáscara de Ungurahua.....	69
<b>Ilustración 20.</b> Proteína liofilizada de la cáscara de Ungurahua.....	69
<b>Ilustración 21.</b> Método Biuret	
<b>Ilustración 22.</b> Método BSA. ....	69
<b>Ilustración 23.</b> Determinación de F.T.	
<b>Ilustración 24.</b> Determinación de Actividad Antioxidante.....	70
<b>Ilustración 25.</b> Simulación de la actividad antioxidante.	
<b>Ilustración 26.</b> Lectura de la absorbancia de la actividad antioxidante.....	70
<b>Ilustración 27.</b> Carga de las muestras.	
<b>Ilustración 28.</b> Corrida de las muestras .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico.
<b>TBARS</b>	Ácido 2-tiobarbitúrico.
<b>INIAP</b>	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
<b>SDS</b>	Sodiododecilsulfato
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de policrilamida.
<b>NATIVE</b>	Electroforesis nativa.
<b>D.S.</b>	Desviación Estándar.
<b>VAR</b>	Varianza.
<b>PROM</b>	Promedio.
<b>PSA</b>	Persulfato de amonio.
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenediamina.
<b>SGF</b>	Fluido gástrico simulado
<b>FT</b>	Fenoles Totales.
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico.
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio.

## RESUMEN

En este estudio se caracterizó las proteínas en la harina desengrasada de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus bataua*) con diferentes puntos isoeléctricos de precipitación, donde el mayor rendimiento fue con agua fue a pH 3,0 con un 2,06% y el mayor rendimiento al utilizar hidróxido de sodio fue a pH 6,0 con un 4,85%; que concuerda con el análisis proximal realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) donde se obtuvo el 5,58% de proteína. Por otro lado se encontró una gran presencia de fenoles totales (FT) entre 162,10 y 198,12 mg GAE/100g de muestra, el cual es mayor al contenido fenólico de la mora que es de 118,9 mg GAE/100g de muestra y la uva con 117,1 mg GAE/100g, además los fenoles totales contenidos en la cáscara de Unguragua superaron a los fenoles totales de la naranjilla, granadilla, mango y maracuyá. La actividad antioxidante de la proteína se encontró entre 85,17 - 89,21% y del sobrenadante entre el 67,69 - 95,04% siendo mayor al antioxidante sintético (BHT) comparado, que se encuentra entre el 85,53 - 86,56%. En la simulación de la digestión gástrica y duodenal en condiciones fisiológicas humanas, se estableció albuminas 2S cercanas a 75 kDa, globulinas 7S cercanas a 63 kDa, 48 kDa y 35 kDa. Estas proteínas no se degradaron totalmente debido a que la pepsina no rompió en su totalidad los enlaces de los aminoácidos aromáticos presentes en la muestra, por lo que el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante es alta.

**Palabras clave:** Ungurahua (*Oenocarpus bataua*), proteínas, fenoles totales, actividad antioxidante, digestibilidad in vitro.

## SUMMARY

The aim of this research was characterized proteins in flour shell Ungurahua (*Oenocarpus bataua*) with different isoelectric points of precipitation, where a high yield was obtained with water to pH 3.0 with 2.06 % and a higher yield using sodium hydroxide to pH 6.0 was 4.85 %; which is consistent with the proximal analysis in INIAP where 5.58 % protein was obtained. On the other hand a large presence of total phenols (FT) between 162.10 and 198.1 mg GAE / 100g sample was observed which is greater than the phenolic content of mulberry which is 118.9 mg GAE / 100g or in grapes with 117.1 mg GAE / 100g, even the total phenols contained in the shell Unguragua exceeded the naranjilla, mango and passion fruit. The antioxidant activity of the protein was found between 85.17 to 89.21% and the supernatant between 95.04 to 67.69% being greater than synthetic antioxidant (BHT) compared, located between (85.53 to 86.56) %. In the simulated gastric and duodenal digestion in human physiological conditions, 2S albumins established close to 75 kDa, 7S globulins near 63 kDa, 48 kDa and 35 kDa. These proteins were not degraded completely because pepsin not entirely broken links aromatic amino acids present in the sample, so that the total phenolic content and antioxidant activity is high.

**Keywords:** Ungurahua (*Oenocarpus bataua*), protein, total phenolics, antioxidant activity, in vitro digestibility.

## 1. CAPITULO I

### 1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

Determinación de la actividad antioxidante en polifenoles y digestibilidad gastrointestinal *in vitro* en proteínas de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus bataua*).

### 1.2 JUSTIFICACIÓN

En la industria de alimentos, existen muchos desechos en la elaboración de aceites como el de girasol, colza y soja. Los sub-productos que se obtienen, contienen gran cantidad de proteína, que se la podría aprovechar como un ingrediente en alimentos funcionales. Existen gran cantidad de sub-productos que son desechados en la producción de aceite de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), los que contienen proteína, ácidos grasos insaturados como el omega 3, 6 y 9, que además proporcionan beneficios a la salud (**Vio y Velasco, 2003**). No obstante, sobre este sub-producto que posee un elevado potencial no existe información bibliográfica suficiente respecto a las características y propiedades de las proteínas así como de los polifenoles. Por lo tanto, en este proyecto se incluye la colaboración de una fundación (Chankuap) de la ciudad de Macas, dedicada a la extracción de aceite de *Oenocarpus Bataua*, esta empresa proporcionará el sub-producto para llevar a cabo estudios enfocados en la identificación de proteínas y polifenoles que podrían estar presentes en el mesocarpio de *Oenocarpus Bataua*.

Los alimentos funcionales contienen componentes biológicos activos que ayudan en algunos beneficios de la salud. En la actualidad, la mayoría de consumidores están conscientes de la relación existente entre la dieta y la salud, por lo que se ha impulsado el desarrollo y la comercialización de alimentos que contengan estos beneficios (**Juárez, 2005**).

Según información obtenida del **Ministerio de coordinación de desarrollo social (2013)** en el 26% de niños en el Ecuador, existe desnutrición por una alimentación baja

en proteína animal. La proteína vegetal podría complementar a la proteína animal, a pesar de su bajo contenido en aminoácidos (FAO, 2015).

Existe gran interés hoy en día, por la obtención de productos vegetales con alto contenido de proteínas, por los beneficios nutricionales, propiedades funcionales y biológicas que proporcionan; algunas de ellas son su aporte en aminoácidos esenciales, hidratación, emulsión, gelificación, como antitumoral, antitrombótica e inmunomoduladora (Añón, 2009).

Muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que confiere la actividad antioxidante desde un punto de vista biológico, la cual está relacionada con prevenir algunas enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer. Los taninos son sustancias capaces de fijar metales y proteínas, obteniendo una actividad estrogénica, lo que puede afectar su biodisponibilidad y puede ocasionar efectos inespecíficos como antimicrobianos o prevención de enfermedades neurodegenerativas (Barberán et al., 2000; Barberán y Espín, 2001).

Por lo que la determinación de actividad antioxidante en polifenoles y digestibilidad gastrointestinal en proteínas *in vitro* de la cáscara de *Oenocarpus Bataua*, aportará datos a la literatura científica y permitirá investigar fuentes alternativas de proteína y polifenoles, que puedan ser utilizados para la posterior obtención de alimentos con propiedades funcionales y biológicas a partir de un sub-producto.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar la actividad antioxidante y digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus bataua*).

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar las proteínas presentes en la harina de la cáscara de *Oenocarpus bataua* a diferentes pH.



- Identificar la presencia de fenoles totales presentes en la cáscara de *Oenocarpus bataua*.
- Evaluar la actividad antioxidante de proteína y polifenoles procedentes de la cáscara de *Oenocarpus bataua* utilizando el método TBARS.
- Establecer la digestión gástrica *in vitro* de proteínas de la cáscara de *Oenocarpus bataua* simulando condiciones fisiológicas humanas.

## 2 CAPÍTULO II

### 2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

#### 2.1.1 UNGURAHUA

El seje o Ungurahua (*Oenocarpus bataua*) es una palma monoica, solitaria y grande que llega a medir de 30 a 35 m de altura y de 20 a 30 cm de diámetro; presenta hojas grandes, erectas y pinneadas, llegando a medir hasta 6 m de largo; sus frutos llegan a medir de 3 a 7 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho, presentando una pulpa delgada y con semilla dura (Gómez y colaboradores, 1996). Su epicarpio es liso, de color rojo oscuro a la maduración, está cubierto por una delgada capa cerosa, blanquecina; su mesocarpio es carnoso, de color entre blanco y violeta con un elevado contenido de aceite, y su semilla está recubierta por fibras delgadas; el endocarpio es duro, leñoso, cubierto por grandes fibras oscuras. Posee flores unisexuales de color pardo cremoso (Ávila, 2009).

Esta palma se localiza en el norte de Sur América y en el Sur Centro de América, especialmente en la región amazónica, como en la costa del Pacífico: Ecuador, Colombia y Panamá (Andrade, 2010). Es una de las palmeras más importantes para la población nativa y mestiza en zonas rurales y urbanas de la Amazonía, por tener múltiples usos como alimento (bebidas, pulpa, palmito, y un medio para cultivar larvas de insectos, ricas en proteína, para consumo humano), medicina, fibras, material de construcción, artesanías y objetos manuales (Villachica, 1996).

En cuanto al uso medicinal, para el tratamiento de enfermedades respiratorias (resfriados, asma o bronquitis), reumatismo, como anti parasitario, para controlar la diarrea y los dolores de cabeza o jaqueca (Díaz y Ávila, 2002). La demanda de aceite ha incrementado por sus cualidades cosméticas, para combatir la calvicie y fortalecer el crecimiento del cabello (Andrade, 2010).

El fruto de Ungurahua es considerado como una fuente de proteína de muy alto valor, comparable con la carne o con la leche. La pulpa de la fruta es rica en lípidos, proteínas y vitaminas (Díaz y Ávila, 2002).

## 2.1.2 PROTEÍNAS

Se sabe que las proteínas son moléculas muy complejas, que presentan una estructura lógica y funcional específica para cada una de ellas; tienen como característica común estar compuestos por monómeros llamados aminoácidos. Los aminoácidos están compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y algunos contienen azufre y otros minerales u oligoelementos (**Guerrero, 2003; Vio, 2003**). La calidad de la proteína en los alimentos está relacionada fundamentalmente con la composición de aminoácidos esenciales presentes, así como por su grado de digestibilidad (**Cerón, 2006**). Estas proteínas de origen vegetal pueden ser extraídas y procesadas para obtener aislados proteicos. **Ulloa (2012)**, indica que un aislado proteico es un material caracterizado por contener aproximadamente 90% de proteínas, proceso que consiste en una concentración y/o purificación de la proteína. El uso de los concentrados proteicos ha aumentado en la industria alimenticia debido a su alto valor nutricional, su funcionalidad, su alto nivel proteico y su bajo contenido de factores antinutricionales (**Cordero et al., 2005**). Se han desarrollado varios métodos para obtener concentrados proteicos a escala piloto, uno de ellos es la precipitación isoelectrica de las proteínas (pI), en la cual se puede evaluar el efecto de las condiciones de la extracción, eligiendo diferentes combinaciones de pH de extracción y precipitación (**Martínez y Añón, 1996**).

## 2.1.3 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO

### 2.1.3.1 BCA

El ácido bicinconínico BCA, en su forma de sal sódica soluble en agua, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso específico para el ión  $\text{Cu}^+$ . Los cuatro péptidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) de la proteína, son los responsables de la formación del color púrpura al unirse dos moléculas de BCA con el ión de  $\text{Cu}^+$  (**García y Vázquez, 1998**). La estabilidad del reactivo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible y muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos de determinación de proteína.

### 2.1.3.2 BIURET

Se basa específicamente en la reacción característica del enlace peptídico, obteniéndose un compuesto coloreado entre púrpura y violeta probablemente por la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  con dos enlaces peptídicos adyacentes. Se realizan varias reacciones en condiciones alcalinas y el ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) tiende a oxidar la cadena peptídica reduciéndose a  $\text{Cu}^+$  (**Badui, 2006**). La sensibilidad del método es baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados concentrados.

### 2.1.3.3 DUMAS

El método Dumas, posee varias ventajas de rapidez (3 min/ muestra), precisión y sin manipulación de ácidos y bases concentrados, especialmente catalizadores a base de mercurio (**Berner y Brow, 1994**).

En este método las muestras de 3 g se calcinan a una temperatura entre 850 – 1400 °C en presencia de oxígeno; los productos de la combustión son adsorbidos selectivamente en columnas, y los óxidos de nitrógeno se reducen catalíticamente en presencia de cobre a gas nitrógeno, cuantificándolo en un detector de conductividad térmica. El equipo se calibra con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los resultados de proteína bruta, se calcula a partir de los datos obtenidos de nitrógeno. El equipo al ser automático, permite realizar las fases del ciclo analítico: purga, combustión y análisis. Mediante el método Dumas se puede determinar los nitritos presentes en las muestra analizadas, el contenido de nitrógeno que se obtiene es considerado como proteína bruta (**Jean et al., 2000**).

### 2.1.3.4 ELECTROFORESIS

Las proteínas al ser sometidas a un campo eléctrico, pueden migrar al polo de carga contraria a su carga neta con un determinado pH, debido al fenómeno conocido como Electroforesis (**Badui, 2006**).

El método más utilizado para la caracterización de las proteínas es la electroforesis. Según **Morales y Gallo (2006)**, **García (2000)** afirman que migran los solutos iónicos

bajo la influencia de un campo eléctrico, estos métodos analíticos ayudan en la separación de mezclas complejas de biomoléculas, como en proteínas y ácidos nucleicos; por su alta versatilidad, sensibilidad y poder de resolución, donde aportan un potente criterio de purificación. El método de electroforesis bidimensional se basa en la separación de las proteínas en función de su carga y su masa molecular, consta de dos separaciones, la primera se realiza por isoelectroenfoque, en donde las proteínas se separan en un gradiente de pH hasta alcanzar una carga neta de cero (punto isoelectroenfoque); la segunda, las proteínas se separan por electroforesis en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS) (Morales y Gallos, 2006). La velocidad de migración de las proteínas está dada por su carga neta e influenciada por su forma, sus dimensiones moleculares, la intensidad de la corriente y el material utilizado (Badui, 2006).

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) da a conocer el tamaño de las proteínas mediante el peso molecular (Sandoval, 2012).

Después de una separación de las proteínas por electroforesis, generalmente se continúa con una digestión proteolítica y también por la separación de fragmentos por medio de electroelución o para un análisis por espectroscopia de masas. Este método es el mejor en la resolución de mezclas complejas de proteínas (Badui, 2006).

### **2.1.3 SIMULACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GASTROINTESTINAL**

Un parámetro en la determinación de la calidad de las proteínas, puede ser la digestibilidad. Se sabe que algunas proteínas son fácilmente digeridas por las enzimas proteolíticas con alto grado de absorción. Mientras que otras presentan resistencia a la hidrólisis (por lo general proteínas alérgicas). La digestibilidad de las proteínas se evalúa a partir de balance de nitrógeno, ya que las proteínas se degradan en péptidos y aminoácidos en el sistema digestivo, se ha reportado un valor de 94% para el huevo y la carne, así como un 78% para leguminosas (Cerón, 2006).

El estómago está constituido por una gran variedad de glándulas que generan un porcentaje de ácido clorhídrico, lo que depende de ciertos factores. En condiciones

normales, el pH del estómago es 3,0; donde al aproximarse a este valor, se activan procesos que inhiben de forma progresiva la segregación del ácido clorhídrico. El comportamiento en el estómago se asemeja a un recipiente cerrado, donde se añade una cantidad de ácido clorhídrico por un tiempo, hasta que el pH alcance un nivel determinado (**Sumeri, 2008**).

En distintos tipos de ensayo de digestión gástrica, se han usado compuestos que completan la simulación de los fluidos gástricos, como la pepsina y en algunos casos lipasas gástricas (**Singh, 2009**). **McClements (2009)**, menciona que la hidrólisis de proteínas, se debe a la acción del ácido clorhídrico y a la pepsina, siendo ésta responsable de la ruptura de péptidos, y de la formación de cadenas más pequeñas de aminoácidos.

En la simulación de la digestión duodenal, se utilizan fluidos que simulan los jugos pancreáticos y biliares (**Sumeri, 2008**). Para simular la bilis de la digestión, se recurre a sales biliares; la cantidad de reactivos adicionados se ajustan según el volumen de muestra (**Lindahl, 1997**).

#### **2.1.4 FENOLES TOTALES**

Los compuestos fenólicos están de la mano de algunas características sensoriales (color, sabor, olor, astringencia, textura), nutritivas y antioxidantes de los alimentos vegetales. La reacción del grupo fenol otorga las características antioxidantes de estos compuestos (**Robbins, 2003**).

Los polifenoles en los alimentos poseen varias acciones como molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras; también existen estudios que verifican la inhibición de la replicación del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Virus Simplex Humano (VSH), también inhiben las caries dentales debido al *Streptococcus mutans*, la auto oxidación del ascorbato, efectos citotóxicos, el crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. Los fenoles poseen actividad antioxidante en

funciones biológicas como anticancerígena, antimutagénica y antienvjecimiento **(Proestos et al, 2005)**.

Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas, donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos **(Manach y Donovan, 2004)**.

Algunos estudios epidemiológicos, afirman que el consumo de frutas y verduras ayudan a evitar el cáncer y su mortalidad, así como en enfermedades coronarias. Los fenoles, en especial los flavonoides y los antocianos, poseen una elevada capacidad de capturar radicales libres, los que son causantes del estrés oxidativo de algunas células; ayudando a evitar enfermedades cardiovasculares, cancerígenas circulatorias y neurológicas. Además, los fenoles poseen actividades como antialérgica, antimicrobiana, anti-inflamatoria y antineoplásica **(Kuskoski et.al; 2005)**.

Se ha encontrado correlación entre la concentración fenólica y la actividad antioxidante de varias semillas (trigo, girasol); frutos (arándanos, cerezas, rábanos, papas); cáscaras (trigo, girasol); raíces (ginseng, Echinacea, rábano); pieles, entre otros **(Velioglu et al, 1998)**.

En la industria alimentaria ha generado interés los extractos crudos de frutas, verduras, cereales, hierbas y otros vegetales ricos en fenoles, debido a que estos retardan la degeneración oxidativa de lípidos, mejorando la calidad y el valor nutricional del alimento. La elaboración de alimentos con propiedades antioxidantes a partir de vegetales que lo proporcionen, ha generado gran interés en los consumidores para mantener su salud, evitando enfermedades coronarias y de cáncer. Existe una gran tendencia en preparar alimentos con valores específicos que ayuden a mantener la salud de los consumidores **(Käkhönen et al, 1999)**.

### **2.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Los grupos antioxidantes son moléculas reconocidas por su capacidad de neutralizar radicales libres, combatiendo las deficiencias asociadas al estrés oxidativo (**López y Echeverreri, 2007**). Se puede definir a un antioxidante como una sustancia que al estar presente en bajas concentraciones tiene la capacidad de inhibir significativamente la oxidación de una sustancia (**Gramza y Korczak, 2005**).

En la actualidad se han desarrollado un gran número de métodos para evaluar la capacidad antioxidante, sin embargo, pocos de ellos se utilizan con regularidad debido a limitaciones relacionadas con los requerimientos metodológicos y la selección de las fuentes de radicales libres (**Schauss et al., 2006**).

Se han modificado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos en los últimos años, con el fin de medir la capacidad antioxidante en los alimentos. En ensayos in vitro se utiliza un captador de radicales libres, con métodos fáciles de realizar. El método TBARS es un método de decoloración muy utilizado (**Alam et al., 2012**).

Las evaluaciones fundamentadas en el uso de radicales como el DPPH y ABTS son considerados por la comunidad científica como los métodos espectrofotométricos más comunes utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante de alimentos, bebidas y extractos vegetales (**Bendini et al., 2006**), debido a que los procedimientos requeridos en estas metodologías son simples, rápidos, sensibles y reproducibles (**Ozcelik et al., 2003**).

#### **2.1.5.1 MÉTODO TBARS**

El radical  $ABTS^+$ , es la base de uno de los métodos espectrofotométrico más aplicado en la medición de la actividad antioxidante total en muestras que pueden ser puras o soluciones. La reacción se basa en activar la molécula metilmoglobina con una molécula de hidróxido de hidrógeno, produciendo un radical catión, en presencia de ABTS con o sin antioxidantes. El método posee una reacción rápida de los antioxidantes, debido a la reducción del radical ferrilmoglobina (**Re et al., 1999**).

El método TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) es un sistema de medición rápido, sensible y económico para determinar el grado de peroxidación de lípidos en



alimentos que contienen alto contenido de grasa, por lo tanto es recomendable para el control de calidad y el análisis de un gran número de muestras. En éste método, el ácido tiobarbitúrico (TBA)( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) reacciona con malondialdehído (MDA) ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ), un producto secundario de la peroxidación de lípidos, para generar un color rojo el cual se puede detectar espectroscópicamente (**Rodríguez, 2009**).

## 2.2 HIPÓTESIS

### *Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):*

H<sub>0</sub>: Los pH de precipitación utilizados no tiene influencia significativa sobre el rendimiento de proteínas, el contenido fenólico y la actividad antioxidante presentes en la harina de la cáscara de *Oenocarpus bataua*.

### *Hipótesis alternativas (H<sub>1</sub>):*

H<sub>1</sub>: Los pH de precipitación utilizados influyen significativa sobre el rendimiento de proteínas, el contenido fenólico y la actividad antioxidante presentes en la harina de la cáscara de *Oenocarpus bataua*.

## 2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

### *Variables independientes:*

- ✓ pH

### *Variable dependiente:*

- ✓ Rendimiento
- ✓ Presencia de proteína
- ✓ Contenido fenólico
- ✓ Actividad antioxidante

## 3 CAPÍTULO III

### 3.1 MATERIALES

#### 3.1.1 Materia prima

Se utilizó el fruto de Ungurahua de la fundación (Chankuap) de la ciudad de Macas, dedicada a la extracción de aceite de *Oenocarpus Bataua*, la cual proporcionó el sub-producto.

#### 3.1.2 Equipos

- ✓ Agitador VWR
- ✓ Agitador eléctrico vortex Mixer
- ✓ Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- ✓ Cámara Fotográfica
- ✓ Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
- ✓ Centrifuga, Eppendorf Modelo 5702
- ✓ Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics Modelo BTP-3ES0VW
- ✓ Congelador Mabe
- ✓ Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- ✓ Espectrofotómetro convencional de haz simple Modelo DR-500
- ✓ Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- ✓ Micro incubador, Esco, Provolcell Shaking
- ✓ pHmetro Thermo Scientific Orion Star A211
- ✓ Refrigerador Indurama Modelo RI-470
- ✓ Kit para electroforesis Bio-Rad
- ✓ Unidad destiladora de agua, Easy Linea 150

#### 3.1.3 Reactivos

- ✓ Cloroformo
- ✓ Azul de bromofenol, # 161-0404, BIO-RAD

- ✓ Bis-acrilamida, # 161-0158, BIO-RAD
- ✓ Bis-acrilamida, # 15512-023, Invitrogen
- ✓ Bicarbonato de sodio
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Coomassie blue R, Blue R-250, # 161-011, BIO-RAD
- ✓ Dodecil sulfato de sodio (SDS) # 161-0302, BIO-RAD
- ✓ Estándar de proteínas, Dual Color, # 161-0374, BIO-RAD
- ✓ Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- ✓ Glicerol, Invitrogen # 15514-011
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Hidróxido de potasio
- ✓ 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- ✓ Persulfato de amonio (PSA), # 161-0700, BIO-RAD
- ✓ Pepsina de la mucosa gástrica porcina # P6887-106
- ✓ Pancreatina
- ✓ Sulfato de cobre pentahidratado
- ✓ Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) # 161-0716, BIO-RAD
- ✓ TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina), Invitrogen
- ✓ Yoduro de potasio

### **3.1.4 Insumos y utensilios**

Agua destilada, agua miliQ, guantes, materiales de vidrio, bandeja plástica, espátulas, gradillas, papel aluminio, papel de filtro, toallitas absorbentes, parafilm, tubos eppendorf, tubos para centrífuga de 50 y 15 mL, micropipetas, puntas, molino de mano, envases de plásticos.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtención de harina desengrasada de Ungurahua**

Se separó el mesocarpio de la fruta de Ungurahua para tritarlo por medio de un molino manual, obteniéndose un polvo muy fino. Siguiendo el método propuesto por

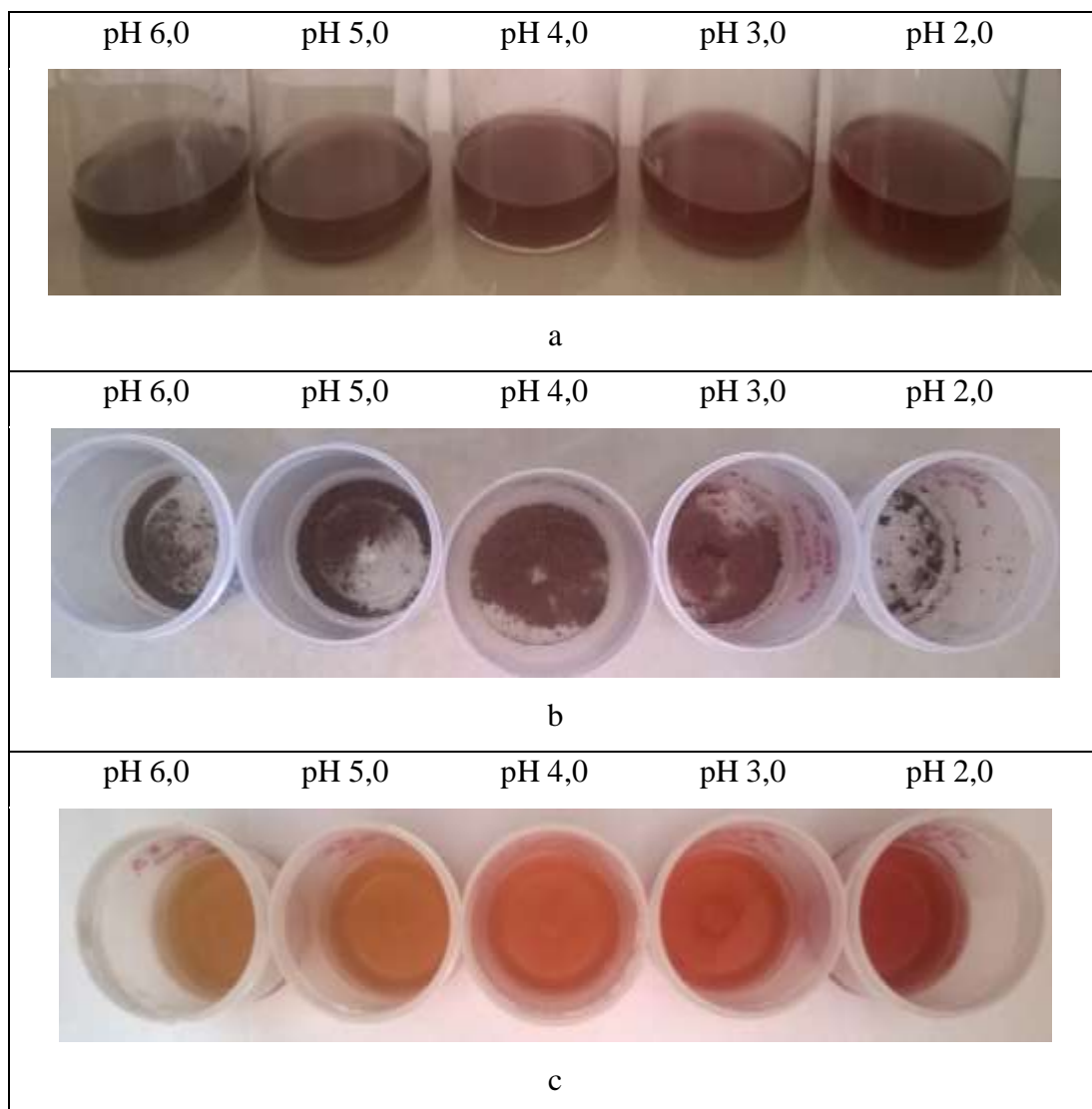
**Martínez y Añón (1996)** con modificaciones, a la harina obtenida del triturado se le retiró la grasa mediante cloroformo en una relación de 10 g de harina por cada 80 mL de cloroformo. El proceso se realizó a temperatura ambiente con agitación continua durante 24 horas de contacto de la harina con el solvente. Luego se separó la harina del cloroformo por filtración dejándola a temperatura ambiente bajo campana durante 6 horas esparcida sobre una superficie plana para eliminar los restos de cloroformo. La harina se almacenó a 4°C hasta su utilización.



**Ilustración 1.** a: fruto y cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), b: molienda de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), c: desengrasado de la harina de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), d: harina desengrasada de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*).

### 3.2.2 Concentrado de Proteínas de Ungurahua

La harina de Ungurahua desengrasada se utilizó para obtener concentrados proteicos mediante precipitación isoelectrica, siguiendo el protocolo utilizado por **Martínez y Añón (1996)** con modificaciones; donde se disolvió la harina con agua destilada en una relación 1:10 (p/v) para ajustarlo a un pH de solubilización de 8,0 con KOH 1,0 N agitándolo constantemente por 15 minutos, después se llevó a centrifugación a 4400 rpm por 20 minutos, donde el sobrenadante resultante se ajustó a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 con HCl 2,0 N; se dejó en refrigeración toda la noche para separar el sobrenadante del precipitado (proteína) y ser congeladas a -20 °C. El precipitado congelado se llevó a un liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics modelo BTP-3ES0VW y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Las muestras se realizaron por triplicado para calcular el porcentaje de proteína en seco de la harina.



**Ilustración 2** a: precipitado de la harina de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), b: proteína o precipitado de la harina de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*), c: sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus Bataua*)

### 3.2.3 Análisis Proximal

Se realizó un análisis proximal de la harina obtenida de la cáscara de Ungurahua en el Laboratorio del INIAP en Quito, mediante los siguientes métodos

**Tabla 1.-** Métodos para análisis proximal.

<b>MUESTRAS</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>MÉTODOS</b>
Cáscara de Ungurahua	Humedad	MO-LSAI-01.01
	Cenizas	MO-LSAI-01.02
	Extracto etéreo (E.E.)	MO-LSAI-01.03
	Proteína	MO-LSAI-01.04
	Fibra	MO-LSAI-01.05
	Elementos libres de nitrógeno (E.L.N.)	MO-LSAI-01.06

FUENTE: INIAP.

### **3.2.4 Determinación de Fenoles Totales (FT)**

Según la metodología propuesta por **Vasco et al., (2008)** con modificaciones, se tomó una alícuota de 0,1 mL del sobrenadante a los diferentes pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y un blanco (agua destilada) para colocarlo en un matraz de 5 mL, donde se le añadió 0,1 mL de Folin y se lo agitó continuamente durante 3 minutos. Luego, se colocó 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5%, para después completar el volumen hasta los 5 mL con agua destilada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se midió la absorbancia a 750 nm utilizando un espectrofotómetro. Los resultados se expresarán como equivalentes de ácido gálico (GAE), utilizando una curva de calibración en el rango de 50 a 200 ppm.

### **3.2.5 Caracterización del concentrado proteico**

#### **3.2.5.1 Cuantificación proteica**

Se aplicó tres métodos de cuantificación proteica:

**Método BCA (ácido bicinonónico)**, utilizando un kit de ensayo de proteínas marca Thermo Fisher Scientific catálogo N°23252, que permitió medir la concentración de proteínas en las muestras que contienen tiol-reductores ditioneitol (DTT) y 2-mercaptoetanol (BME), donde se pesó 0,5 mg de muestra de proteína liofilizada y se le añadió 1 mL de agua con 75 µL de NaOH 0,2 M, para llevarlo a agitación por 15 min a 13000 rpm; de la muestra centrifugada se realiza una dilución 1:20 (v/v) de muestra y agua destilada, para coger 70 µL de muestra y la misma cantidad de agua destilada (blanco) a los cuales se les añadió los reactivos del kit de ensayo para medirlos a 550nm. El análisis se realizó por triplicado y se los comparo frente a una curva de los estándares del Kit.

**Método biuret**, aplicando el protocolo descrito por **Gornall A. y col (1949)**, en donde se forma un complejo de color violeta al unirse el  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos NH de los enlaces peptídicos al encontrarse en medio básico. Se determinó la cantidad de proteínas de acuerdo a la intensidad de la coloración del complejo, midiendo su absorbancia a 550nm, donde en un tubo eppendorf se pesó entre 7,8 - 8 mg de proteína aislada, se agregó 1 mL de agua destilada y se adicionó 0,75 µl NaOH 0,2 M para llevarlo a agitación por 15 minutos. Se realizó una segunda muestra con una relación 1:5 (v/v) de reactivo de Biuret y muestra, luego se centrifugó por 30 minutos a 13000 rpm y se dejó en refrigeración por 30 minutos, luego con mucho cuidado se procede a realizar la lectura.

Reactivo biuret: Se pesó 9g de tartrato sódico-potasico, 3g de sulfato de cobre pentahidratado y 5g de yoduro de potasio, los cuales se disolvieron en el orden mencionado en 400 mL de NaOH 0,2 M y se agregó 600 mL de agua destilada.

Preparación del blanco: Se colocó 1 mL de agua destilada con 75 µl NaOH 0,2 M.

En una gráfica patrón elaborada con concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA), se extrapolaron los resultados obtenidos.

**Método dumas**, se aplicó con el manual de operación del equipo Vel Scientifica-NDA Series, en el cual se trituró en un mortero la muestra hasta obtener un polvo muy fino (0,05 mm de granulometría aproximada), tomando 50 mg de la muestra homogénea. Se seleccionó una curva de calibración con EDTA, adecuada para el rango de proteína de la muestra, luego se ajustaron los factores:

Factor de oxígeno (mL O<sub>2</sub>/ mg de muestra): 1,8.

Caudal de oxígeno (mL O<sub>2</sub>/ min): 400.

Factor de proteína: (% N = xpf PROT): 5,7.

### 3.2.5.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

Se aplicó la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y con la adición dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando el método descrito por **Laemmli (1970)** con modificaciones, con un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad LifeScience, USA), utilizando un voltaje constante de 200V.

Preparación muestras SDS y NaOH: Se pesó 5 mg de muestra y se disolvió en 1 mL de agua, luego se tomó 200 µL de muestras y se mezcló con 200 µL de una solución tampón (agua destilada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol, SDS al 10%, 2-β-mercaptoetanol y azul de bromofenol), para calentar la muestra en un microincubador a 90 °C por 5 minutos a 400 rpm.

Preparación muestras native: Se pesó 5 mg de muestra y se disolvió en 1 mL de agua, luego se tomó 200 µL de muestras y se mezcló con 200 µL de una solución native (agua destilada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol, 2-β-mercaptoetanol y azul de bromofenol), para calentar la muestra en un microincubador a 90 °C por 5 minutos a 400 rpm.

Solución buffer running: Tris-HCl, glicina y SDS

Solución native: Tris-HCl y glicina

Para analizar la muestra se utilizó un equipo de electroforesis Mini-protean Tetra System, a diferentes concentraciones de poliacrilamida, el gel superior se realizó con una concentración del 20% y el gel inferior del 16%.

En el gel inferior se utilizó agua destilada, Tris HCl 1M pH 8,8; acrilamida (30%), SDS (10%), tetrametiletilenediamina (TEMED) y persulfato amónico PSA, (10%).

En el gel superior se utilizó agua destilada, Tris HCl 1,5 M pH 6,8; acrilamida (30%), SDS (10%), tetrametiletilenediamina (TEMED) y persulfato amónico PSA, (10%).

La preparación del gel inferior y superior para un gel native es la misma mencionada anteriormente pero sin SDS (10%).

Para determinar los pesos moleculares de las proteínas de la cáscara de Ungurahua se utilizó un estándar con pesos moleculares entre 11 a 180 kDa marca Dual Color de Bio Rad # 161-03734. Se cargó 20 µL de muestra en los pocillos y se añadió el buffer para que corra las muestras durante 30 minutos. Al salir los geles se tiñeron con una solución



de Coomassie brilliant blue R-250 durante 2 horas, luego se destiñeron con una solución formada por 50 % Metanol, 5% Ácido acético y 45% Agua. Al final se realizó un lavado con agua destilada y se fotografió los geles con una cámara digital de 5 megapíxeles.

### **3.2.6 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal de proteína *in vitro*.**

Los concentrados proteicos se sometieron a una digestión gástrica y duodenal *in vitro* simulando las condiciones fisiológicas de la digestión humana. Inicialmente, las proteínas se digirieron con pepsina y posteriormente con una mezcla de enzimas proteolíticas intestinales según el método descrito por **Jiménez-Saiz et al. (2011)**. El grado de hidrólisis de las proteínas se determinó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE usando un software de cuantificación de proteínas Quantity 1D análisis de Bio-Rad.

Digestión gástrica: En un tubo eppendorf se pesó 40 mg de proteína del mayor rendimiento (pH3) y se mezcló con 1 mL de digestión gástrica (SGF) para someterla a digestión, se pesó en 3 tubos eppendorf 0,5 mg de pepsina y se colocó 1mL de NaCl 0,35 M con pH 1,2; 2,0; 3,2. Posteriormente se mezcló en una relación 1:1 (200  $\mu$ L pepsina/mL de SGF y 200  $\mu$ L de muestra). La digestión se simuló en un microincubador Esco, Provolcell Shaking por 2 horas a 37°C y 450 rpm; terminada la digestión se adicionó 200  $\mu$ L de bicarbonato de sodio 1 M para inactivar la enzima. Para realizar el gel se tomó 200  $\mu$ L de muestra y 200  $\mu$ L de solución tampón (agua destilada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol, SDS al 10%, 2- $\beta$ -mercaptoetanol y azul de bromofenol) para llevarlo a 80°C a 450 rpm por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C para su análisis en electroforesis SDS-PAGE.

Digestión duodenal: Se realizó la digestión gástrica hasta antes de adicionar 200  $\mu$ L de bicarbonato de sodio 1 M; donde se tomó 1mL de la digestión y se le añadió 1mL de solución duodenal (100 U de pancreatina, 10nM de sales biliares, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>), se ajustó a pH 7,0 y se simuló la digestión en el microincubador Esco, Provolcell Shaking de la misma manera que la digestión gástrica, para llevarlo a 90°C a 450 rpm por 5 minutos y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis en electroforesis SDS-PAGE.

### **3.2.7 Actividad antioxidante de los concentrados proteicos y sobrenadante (Método TBARS)**

Las muestras se analizaron mediante el método descrito por **Guzman- Chozas et al. (1999)** con ligeras modificaciones. Se realizó diferentes concentraciones de proteína (0,20; 0,40; 1,0; 2,0 mg/ $\mu$ L) y sobrenadante (100; 75; 50 25 % v/v); donde se colocó 500  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de aceite de unguahua oxidado, se llevó a 28 °C por 8 horas en una microencubadora, después se le añadió 1mL de TBA recién preparado (ácido 2-tiobarbitúrico 0,02 M en ácido acético glacial al 90%), y se lo llevó a 95 °C por 60 minutos, las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos para finalmente leer las muestras en un espectrofotómetro a 532nm.

Control: se colocó 1mL de aceite de unguahua oxidado con 1 mL de TBA para llevarlos a 95 °C por 60 minutos, se mantuvo en hielo las muestras por 5 min y se procedió a leer a 532nm en un espectrofotómetro.

Los datos se compararon con BHT siguiendo el mismo procedimiento descrito a las diferentes concentraciones.

### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El procesamiento de los datos se realizó en InfoStat y Excel 2013.

Para los datos obtenidos en los rendimientos de concentrados de proteínas de Ungurahua se aplicó un diseño experimental A\*B y la prueba estadística Tukey, donde el factor A fue el tipo de solubilizante con sus niveles a0: agua y a1: hidróxido de sodio; y en el factor B los diferentes pH de precipitación de proteína con sus niveles b0: pH 2,0; b1: pH 3,0; b2: pH 4,0; b3: pH 5,0 y b4: pH 6,0.

Para los datos obtenidos de Polifenoles, BCA, Biuret y Actividad antioxidante se aplicó un análisis de varianza ANOVA y la prueba estadística Tukey, con un nivel de significancia del 95%.

## 4 CAPÍTULO IV

### 4.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 4.2.1 Rendimiento de los concentrados de la harina de la cáscara de Ungurahua.

Los cambios de pH en las proteínas traen modificaciones en la ionización de las cadenas laterales ya que afecta el número de puentes salinos que son responsables de estabilizar la estructura nativa. Cuando se realiza una desnaturalización alcalina, implica la neutralización de cadenas laterales de lisina, histidina y arginina; y la desnaturalización ácida indica la protonación de ácido aspártico y ácido glutámico (López et al.; 2003). Por otro lado Callisaya y Alvarado (2009); mencionan que los atributos de calidad de un concentrado pueden cambiar debido al punto isoelectrico de la proteína (pI), el pH de solubilidad y el de precipitación, en el contenido de proteína, índice de blancura, temperatura de desnaturalización y en su rendimiento.

*Tabla 2.-* Rendimiento promedio de proteínas extraídas con agua

	PROMEDIO	D.S.
<b>pH 6,0</b>	1,34 <sup>a</sup> ± 0,0003	0,02
<b>pH 5,0</b>	1,70 <sup>b</sup> ± 0,006	0,08
<b>pH 4,0</b>	1,84 <sup>bc</sup> ± 0,02	0,17
<b>pH 3,0</b>	2,06 <sup>c</sup> ± 0,004	0,07
<b>pH 2,0</b>	1,31 <sup>a</sup> ± 0,01	0,13

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas

En la tabla 2 se puede observar que el pH con mayor rendimiento en la precipitación de proteínas extraídas con agua fue el pH 3,0 con un 2,06%, siguiéndolo el pH 4,0 con 1,84% y el de menor rendimiento fue el pH 2,0 con 1,31%. Angelica et al. (2014) menciona que es fundamental conocer el punto isoelectrico, ya que a ese pH la proteína

será menos soluble y precipitará; por lo tanto el punto isoeléctrico se encuentra cercano a pH 3,0 en la harina de cáscara de Ungurahua desengrasada.

**Tabla 3.-** Rendimiento promedio de proteínas extraídas con hidróxido de sodio.

	PROMEDIO	D.S.
<b>pH 6,0</b>	4,85 <sup>c</sup> ± 0,04	0,21
<b>pH 5,0</b>	3,17 <sup>b</sup> ± 0,17	0,42
<b>pH 4,0</b>	3,00 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,13
<b>pH 3,0</b>	2,79 <sup>ab</sup> ± 0,001	0,02
<b>pH 2,0</b>	2,92 <sup>a</sup> ± 0,05	0,22

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas.

Se realizó un fraccionamiento con hidróxido de sodio 0,1 M, obteniéndose (tabla 3) el mayor rendimiento a pH 6,0 con 4,85%, seguido del pH 5,0 con 3,17% y a pH 3,0 fue el menor rendimiento con 2,79%, esto debido a que existe diferentes solventes para caracterizar las proteínas de un alimento, fraccionándolas en este caso en glutelinas (Osborne, 1924).

En el diseño experimental A × B aplicado a los datos obtenidos de rendimiento de proteína, existió diferencias significativas en la interacción A: pH utilizados 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0, donde el pH 6,0 se diferencia significativamente de los demás pH en el rendimiento de proteína obtenido; el factor B también obtuvo diferencias significativas en el tipo de disolvente ocupado y en la interacción A×B los pH con agua presentan similitud; de la misma manera los pH con hidróxido de sodio, excepto el pH 6,0 con hidróxido de sodio.

#### **4.2.2 Análisis Proximal de la harina de la cáscara de Ungurahua.**

Al obtener la harina de la cáscara de Ungurahua desengrasada, se procedió a enviar una muestra para ser analizada su composición proximal en base seca.

Se presentan los datos obtenidos a continuación:

**Tabla 4.-** Análisis Proximal INIAP.

<b>MUESTRAS</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>RESULTADOS (%)</b>
Cáscara de Ungurahua	Humedad	MO-LSAI-01.01	12,04
	Cenizas	MO-LSAI-01.02	1,89
	Extracto etéreo (E.E.)	MO-LSAI-01.03	15,6
	Proteína	MO-LSAI-01.04	5,58
	Fibra	MO-LSAI-01.05	27,21
	Elementos libres de nitrógeno (E.L.N.)	MO-LSAI-01.06	49,72

**FUENTE:** Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

En la tabla 4 se observan los resultados de la composición proximal en base seca de la harina de la cáscara de Ungurahua, donde este subproducto posee una cantidad de proteína de 5,58% que para ser una cáscara el contenido de proteína es elevado y un alto contenido de carbohidratos con 49,72% seguido por el contenido de fibra con 27,21%, o cual concuerda ya que al ser una cáscara, contendrá un alto contenido de fibra e hidratos de carbono. Según **Badui (2006)**; casi todos los compuestos orgánicos que se encuentran presentes en las plantas y animales son derivados de hidrocarburos por ende contienen gran cantidad de aminoácidos.

El fruto entero de Ungurahua se considera una fuente nutricional con un valor alto de proteína, en comparación con la carne o la leche; también, es rica en lípidos, proteínas y vitaminas (**Díaz y Ávila, 2002.**)

#### **4.2.3 Determinación de Fenoles Totales (FT).**

Con el sobrenadante extraído al precipitarse la proteína, se procedió a analizar el contenido de fenoles totales (FT), los compuesto fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y por lo menos un sustituyente hidroxilo (**Badui, 2006**).

El método de FOLIN y CIOCALTEAU, se fundamenta en el carácter reductor, ya que se emplea una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, los cuales se reducen al oxidar los compuestos fenólicos de las muestras, originando óxidos de color azul de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) (Chem, 1927).

**Tabla 5.-** Contenido de fenoles Totales solubles (mg GAE/100g de muestra)

	PROMEDIO	D.S.
<b>pH 2,0</b>	180,25 <sup>c</sup> ± 0,31	0,56
<b>pH 3,0</b>	172,99 <sup>b</sup> ± 2,81	1,68
<b>pH 4,0</b>	162,10 <sup>a</sup> ± 0,08	0,28
<b>pH 5,0</b>	173,83 <sup>b</sup> ± 3,82	1,95
<b>pH 6,0</b>	198,12 <sup>d</sup> ± 4,99	2,23

Los resultados son los promedios de los sobrenadantes con tratamiento de agua ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas.

En la **Tabla 5**, se observa el mayor contenido fenólico a pH 6,0 con 198,12 mg GAE/100g de muestra y el pH 4,0 162,10 mg GAE/ 100g de muestra con menor contenido fenólico. La harina de la cáscara de Ungurahua, se encuentra con un nivel medio de contenido fenólico según **Vasco et al., (2008)**, superando al de la naranjilla, granadilla, mango y maracuyá. **Kuskoski et al. (2004)**, determinó el contenido de (FT) en varias frutas, donde la fruta con mayor contenido fenólico fue la mora con 118,9 mg GAE/100g de muestra, seguida de la de la uva con 117,1 mg GAE/100g siendo la harina de la cáscara de Unguragua superior en todos sus pHs analizados.

#### **4.2.4 Caracterización de concentrado proteico.**

##### **4.1.4.1.Cuantificación proteica**

Para analizar la cuantificación proteica a los diferentes pHs (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0) del concentrado de proteína con agua, se procedió mediante el método colorimétrico de biuret, el método BCA (ácido bicinconínico) y el método dumas.

**Tabla 6.-** Cuantificación proteica por el método BCA.

	PROM	D.S.
<b>pH 2,0</b>	34,70 <sup>c</sup> ± 0,61	0,779
<b>pH 3,0</b>	34,68 <sup>c</sup> ± 0,06	0,252
<b>pH 4,0</b>	40,59 <sup>d</sup> ± 0,51	0,716
<b>pH 5,0</b>	27,43 <sup>a</sup> ± 0,28	0,532
<b>pH 6,0</b>	29,62 <sup>b</sup> ± 1,28	1,130

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas.

En los datos obtenidos en la cuantificación de proteína por el método de BCA (**Tabla 6**), se obtuvo un valor de 40,59% a pH 4,0, siguiéndole el pH 2,0 con 34,70% y casi similar el pH 3,0 con 34,68%, existiendo una diferencia significativa con el pH 5,0 el cual obtuvo un valor de 27,43% en el contenido de proteínas.

**Tabla 7.-** Cuantificación proteica por el método de Biuret.

	PROM	D.S.
<b>pH 2,0</b>	39,39 <sup>c</sup> ± 7,32	2,705
<b>pH 3,0</b>	30,07 <sup>a</sup> ± 1,15	1,073
<b>pH 4,0</b>	54,76 <sup>d</sup> ± 0,38	0,620
<b>pH 5,0</b>	36,27 <sup>bc</sup> ± 0,68	0,823
<b>pH 6,0</b>	31,21 <sup>ab</sup> ± 0,09	0,299

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas.

Los datos obtenidos en la cuantificación proteica por el método Biuret (**Tabla 7**), indican valores altos de proteínas en los diferentes pHs analizados, donde el mayor contenido de proteínas se obtuvo en el pH 4,0 con 54,76% y con menor cantidad de proteína el pH 6,0 con 31,21% y el pH 3,0 con el 30,07%.

En la cuantificación proteica por el método Dumas (**Tabla 8**), los datos de porcentaje de proteínas en los diferentes pHs analizados, indican un mayor porcentaje en el pH 4,0 con 63,31% y con menor porcentaje de proteína el pH 3,0 con 15,97%.

**Tabla 8.-** Cuantificación proteica por el método de Dumas.

	<b>PROM</b>	<b>D.S.</b>
<b>pH 2,0</b>	32,27 <sup>d</sup> ± 3,7E-05	0,006
<b>pH 3,0</b>	15,97 <sup>a</sup> ± 0,0004	0,019
<b>pH 4,0</b>	63,31 <sup>e</sup> ± 0,0002	0,013
<b>pH 5,0</b>	25,26 <sup>c</sup> ± 0,0001	0,011
<b>pH 6,0</b>	23,78 <sup>b</sup> ± 2,5E-05	0,005

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas.

En el método Biuret, reacciona el ion cúprico  $\text{Cu}^{2+}$  oxidando la cadena peptídica a  $\text{Cu}^+$ , dado que el -NH del enlace peptídico de la reacción está involucrado (**Badui, 2006**); y el método BCA forma un compuesto purpura intenso, específico para el ion  $\text{Cu}^+$  (**García y Vázquez, 1998**). El método Dumas se basa en una reacción de combustión, donde se realiza una pirolisis y se mide la concentración de nitrógeno por medio de los gases de combustión (**Romero, 2015**). Por lo tanto, los resultados de los métodos de cuantificación proteica son diferentes entre sí, porque en los métodos interfieren distintas reacciones; además el color se desarrolla de diferente forma para cada proteína, y los carbohidratos como los lípidos pueden intervenir en la formación de complejos con el ion coordinado (**Salvador, 2006**) y el método Dumas no diferencia entre nitrógeno inorgánico u orgánico (**Romero, 2015**). También se observó, que en los métodos utilizados para la cuantificación de proteína, fue directamente proporcional a la cantidad de proteínas contenida en cada pH estudiado.

Al comparar los resultados de cuantificación del concentrado de proteína, se encontró que para los tres métodos BCA, biuret y dumas el pH 4,0 fue el que presentó mayor contenido de proteína.

#### **4.1.4.2. Electroforesis (SDS-PAGE)**

La Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE), se puede llevar en condiciones desnaturizantes, al utilizar tiol-reductores fuertes como el mercaptoetanol y el ditionitrotiol (DTT) con un detergente desnaturizante fuerte el dodecil sulfato de sodio (SDS).



Según **Osborne (1907)**, las proteínas de reserva por su tipo de solubilizante se clasifican en albúminas solubles en agua; globulinas solubles en soluciones salinas; prolaminas solubles en alcoholes y glutetinas que se solubilizan en condiciones severas. **Fukushima, (1991)**, propuso una clasificación basada en criterios mecanismos de acumulación, genéticos y moleculares; donde se dividen en prolaminas, encontrándose las albúminas y globulinas que incluyen a las gluteninas.

Las globulinas se clasifican según el coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa en 7S y 11S (**Sherwry, 2002**). Las globulinas, son deficientes en aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, con menor nivel en las 11S (**Shewry et al., 1995**).

Las globulinas 7S, varían su peso molecular entre 150 y 190 kDa y sus subunidades entre 40 y 70 kDa (**Casey et al., 1993**).

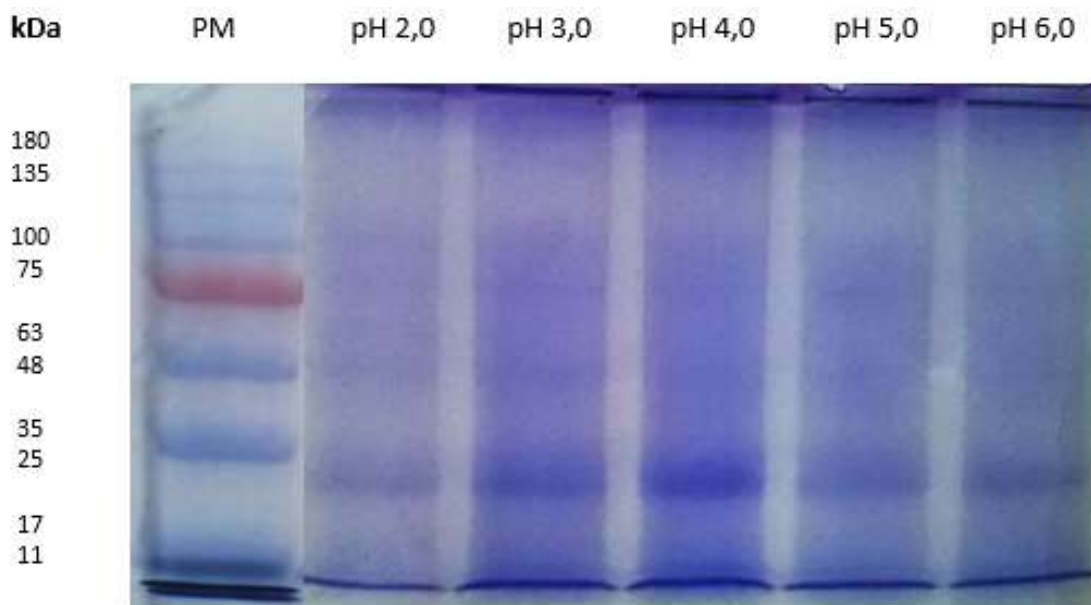
Las globulinas 11S, en su cadena ácida poseen un peso molecular entre 30 y 40 kDa y en su cadena básica entre 20 y 25 kDa (**Nielsen et al., 1995**).

**Youle y Huang (1981)**, caracterizaron albuminas 2S de semillas de doce especies, las que están constituidas entre 30-40 kDa las subunidades y entre 60-90 kDa los residuos.

Según **Brinegar y Goundan, (1993)**, las proteínas con pesos moleculares menores a 14 kDa pertenecen a albúminas 2S.

En la caracterización de proteínas aisladas con agua por electroforesis SDS-PAGE (**Ilustración 3**), se utilizó 5mg/mL de concentrado de Ungurahua a sus diferentes pHs de precipitación, donde, en todos los pHs se puede observar bandas que se aproximan a 180 kDa, 75 kDa, 63 kDa, 48 kDa y 17 kDa; observándose con mayor intensidad a pH 3,0 y pH 4,0.

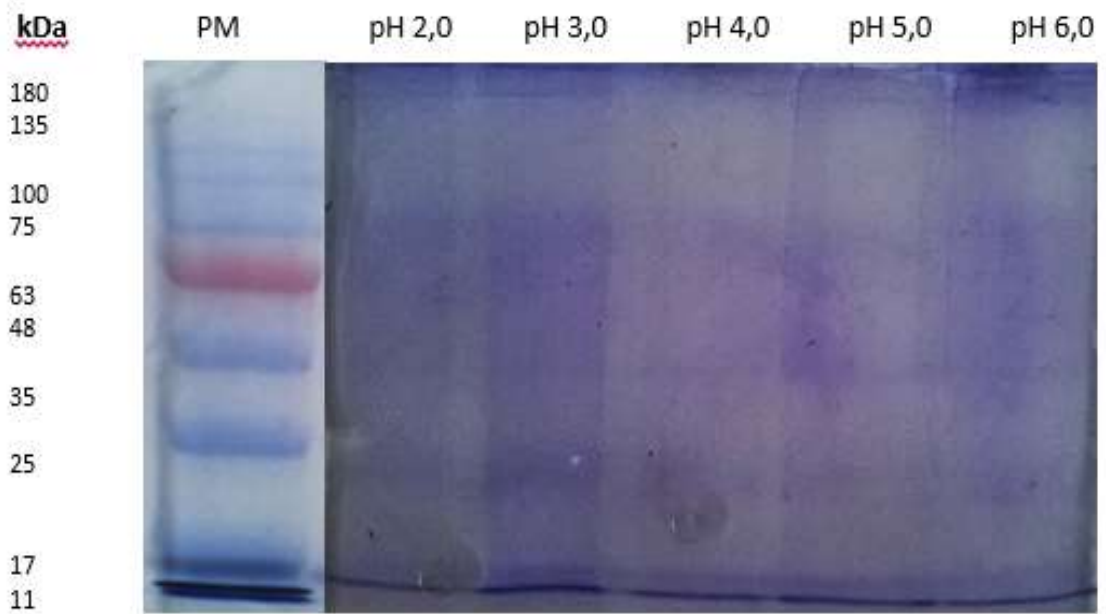
Las bandas que se observa en la **Ilustración 3**, son albuminas en su mayoría, porque son solubles en agua.; por lo cual los concentrados proteicos de Unguragua son albuminas 2S, las bandas que se aproximan a 63 kDa y 75 kDa, así como las de 17 kDa; las globulinas 7S son las bandas que se aproximan a 180 kDa y 48 kDa.



**Ilustración 3.** Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con agua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Línea 1: Pesos Moleculares del estándar de proteínas; línea 2: concentrado de Ungurahua a pH 2; línea 3: concentrado de Ungurahua a pH 3; línea 4: concentrado de Ungurahua a pH 4; línea 5: concentrado de Ungurahua a pH 6.

Las gluteninas son insolubles en agua, estas se solubilizan en medios alcalinos (pH 12,0) y en ácidos (pH 2,0); además que las gluteninas poseen altos pesos moleculares (Tatham y Shewry, 1985). Según Herrera et al. (2003) existen dos grupos de gluteninas, las de alto y bajo peso molecular, y al igual que las prolaminas, proporcionan algunas propiedades reológicas en los alimentos. Por lo que las proteínas asiladas con NaOH en su mayoría son gluteninas.

En la caracterización de proteínas aisladas con NaOH por electroforesis SDS-PAGE **Ilustración 4**, se utilizó 5mg/mL de concentrado de Ungurahua a sus diferentes pHs de precipitación, en donde, en los pHs 2,0; 4,0; 5,0 y 6,0 se puede observar bandas que se aproximan a 100 kDa, 75 kDa, 63 kDa, 48 kDa y 11 kDa; y con una mayor intensidad en el concentrado de proteína a pH 3,0 donde, también se puede observar una ligera banda cercana a 180 kDa.

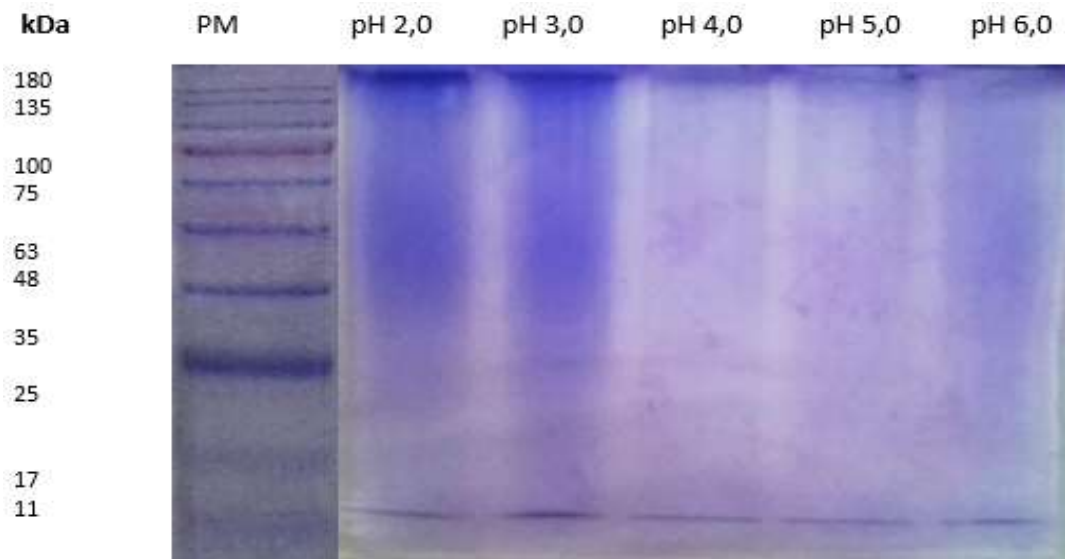


**Ilustración 4.** Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con Hidróxido de sodio en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Línea 1: Pesos Moleculares del estándar de proteínas; línea 2: concentrado de Ungurahua a pH 2; línea 3: concentrado de Ungurahua a pH 3; línea 4: concentrado de Ungurahua a pH 4; línea 5: concentrado de Ungurahua a pH 6.

Los concentrados proteicos de la **Ilustración 4**, pertenecen a globulinas 7S las bandas que se aproximan a 100 y 180 kDa y albuminas 2S las pertenecientes a 63 kDa, 48 kDa y 11 kDa.

Algunos compuestos químicos, producen que las proteínas pierdan su estructura nativa, estos compuestos, llamados agentes desnaturalizantes, producen que pierdan su organización tridimensional de su funcionalidad biológica. Los puentes disulfuro presentes en algunas proteínas, se rompen en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol. Los detergentes utilizados en la electroforesis, afecta la estructura nativa de las proteínas, como el detergente iónico dodecilsulfato sódico o lauril sulfato sódico (SDS) (Morales y Gallo, 2006).

En la **Ilustración 5**, se observa la caracterización de concentrados proteicos en su forma Nativa (sin presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol), donde se utilizó 5mg/mL de concentrado de Ungurahua a sus diferentes pHs de precipitación, donde se observa unas bandas cercanas a 180 kDa, 135 kDa, 100 kDa y con menor intensidad en 75 kDa; al pH 3,0 y pH 4,0 se observan las bandas con mayor intensidad en comparación con los diferentes pHs analizados.



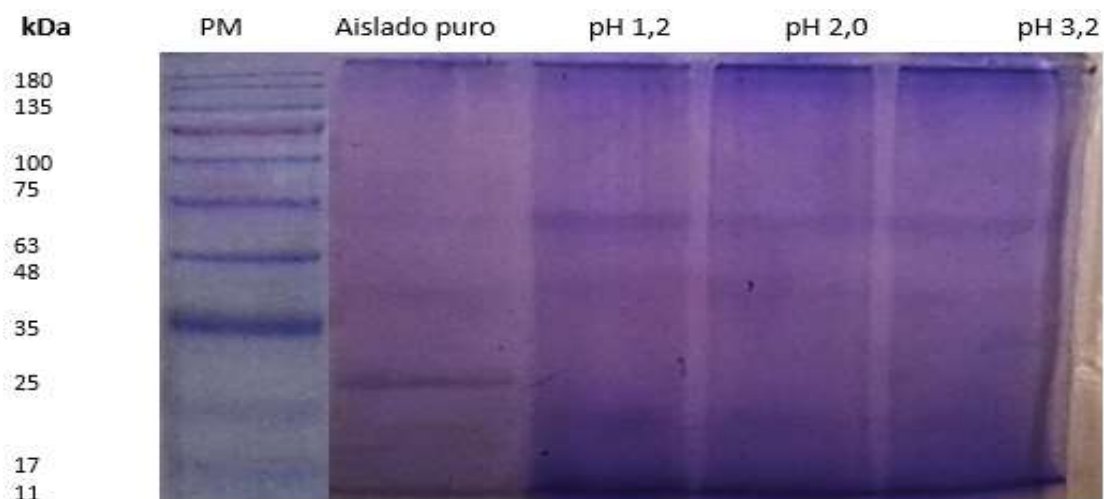
**Ilustración 5.** Electroforesis SDS-PAGE de concentrados proteicos de Ungurahua con agua sin 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Línea 1: Pesos Moleculares del estándar de proteínas; línea 2: aislado concentrado de Ungurahua a pH 2; línea 3: concentrado de Ungurahua a pH 3; línea 4: concentrado de Ungurahua a pH 4; línea 5: concentrado de Ungurahua a pH 6.

Las bandas que se observan en la **Ilustración 5**, pertenecen a globulinas 7S las de 180 kDa, 135 kDa y 100 kDa; las proteínas cercanas a 75 kDa pertenecen a albuminas 2S. Se observan las proteínas sobre los 75 kDa porque estas no se encuentran con agentes desnaturalizados como el 2- $\beta$ -mercaptoetanol.

#### 4.2.5 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* en proteína

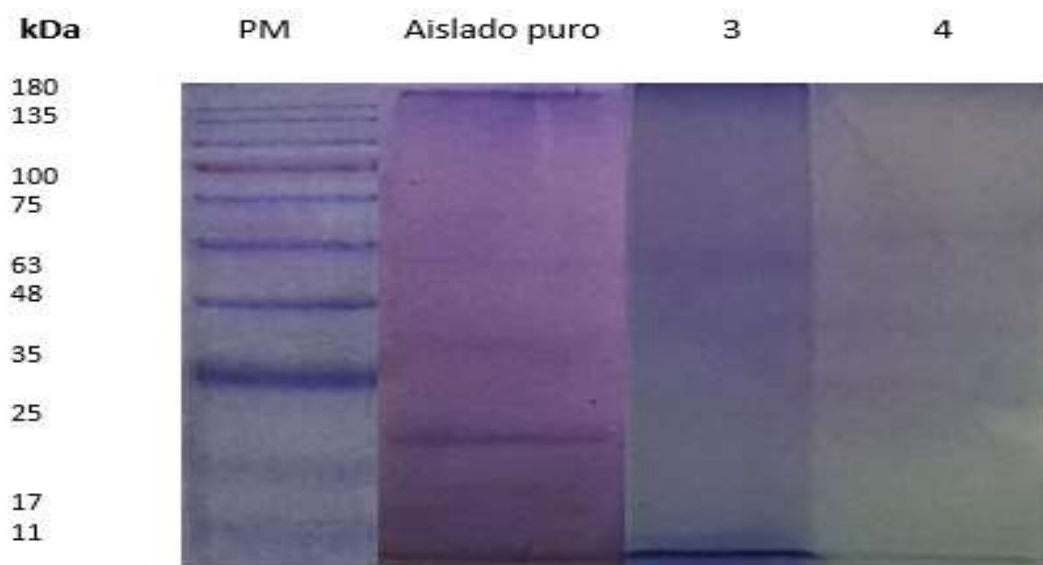
La hidrólisis de las proteínas, se debe a la acción de la pepsina y los ácidos que se encuentran en el estómago, los que rompen los péptidos y las proteínas en cadenas de aminoácidos (**Rivas, 2014**).

En la **Ilustración 6**, se observa el perfil proteico de la cáscara de Ungurahua, donde se utilizó 5mg/mL de concentrado a pH 3,0 para su simulación gástrica, se observan bandas entre 75 kDa, 63 kDa y 35 kDa en todas las líneas y en el concentrado puro existe una banda que se aproxima a 48 kDa.



**Ilustración 6.** Electroforesis SDS-PAGE de simulación gástrica de concentrados proteicos de Ungurahua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Línea 1: Pesos Moleculares del estándar de proteínas; línea 2: concentrado de Ungurahua a pH 3; línea 3: digestión gástrica a pH 1,2; línea 4: digestión gástrica a pH 2,0; línea 5: digestión gástrica a pH 3,2.

Las bandas que se observan en la simulación gástrica **Ilustración 6**, son albuminas 2S las bandas cercanas a 75 kDa, las cercanas a 63 kDa, 48 kDa y 35 kDa son globulinas 7S. De igual manera en la **Ilustración 7**, se observa la simulación duodenal del perfil proteico de la cáscara de Ungurahua, donde se utilizó 5mg/mL de concentrado a pH 3,0; encontrándose bandas con menor intensidad entre 75 kDa que son albuminas 2S, 63 kDa globulinas 7S así como las de 35 kDa.



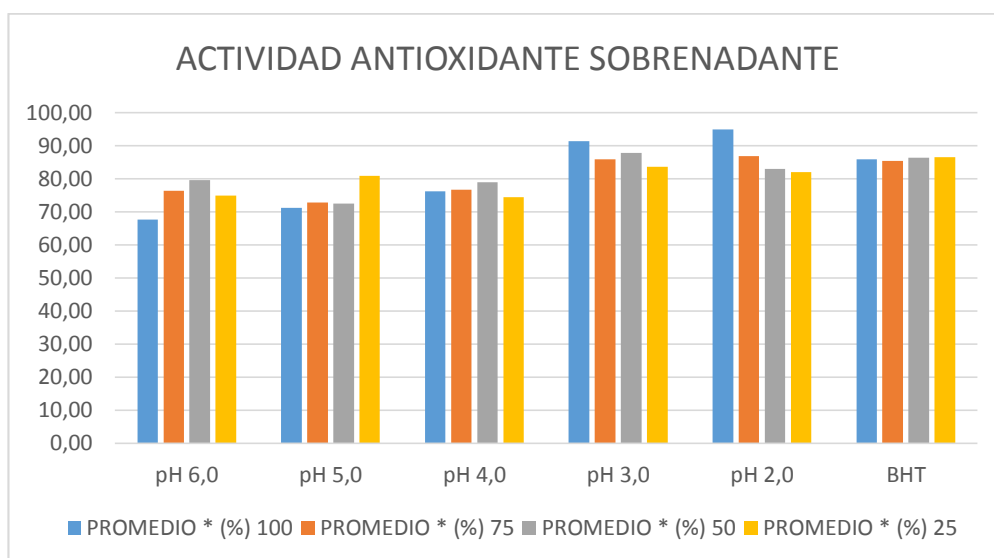
**Ilustración 7.** Electroforesis SDS-PAGE de simulación duodenal de concentrados proteicos de Ungurahua en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Línea 1: Pesos Moleculares del estándar

de proteínas; línea 2: concentrado de Ungurahua a pH 3,0; línea 3: digestión gástrica a pH 3,2; línea 4: digestión duodenal.

En la simulación de digestibilidad de la cáscara de Ungurahua, se observan aun las bandas de proteínas tanto en la digestión gástrica como en la duodenal, debido a que la pepsina no ha consumido en su totalidad la proteína presente en la muestra, debido a que la pepsina no es muy específica en hidrolizar enlaces de aminoácidos aromáticos (Vásquez, 2003).

#### 4.2.6 Actividad antioxidante de los concentrados proteicos y sobrenadante (Método TBARS)

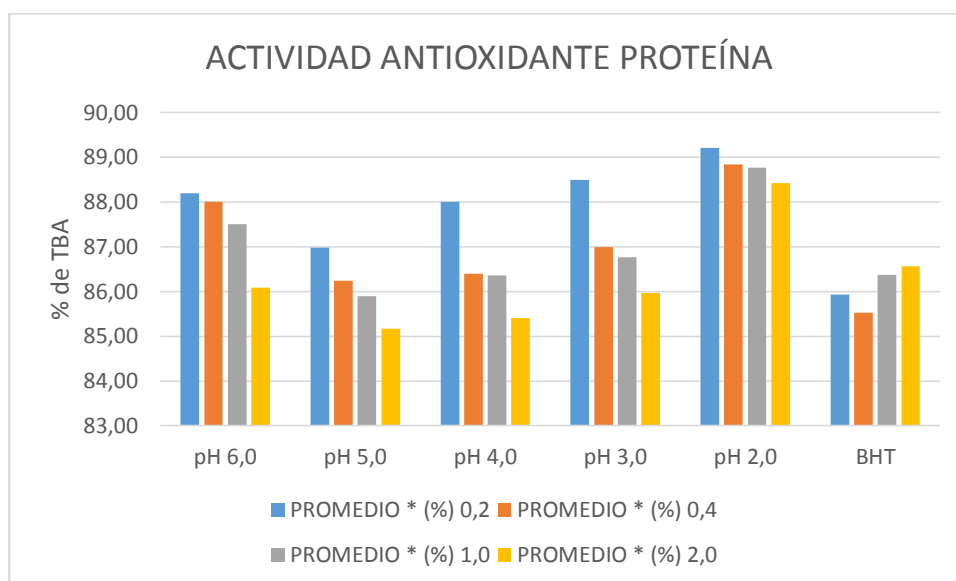
Con el aumento de enfermedades crónicas y degenerativas, el interés sobre el estudio de alimentos con propiedades antioxidantes ha aumentado, como posibles factores preventivos. El método TBARS determina la disposición de neutralizar los radicales libres de forma hidrofóbico e hidrofílico (Delgado y Cecilia, 2015), reaccionando dos moléculas de TBA con un dialdehído malónico, produciéndose compuestos rojos (Jacobson et al., 1964).



**Ilustración 8.** Porcentaje de actividad antioxidante del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua. Color azul: 100 % (v/v) Color anaranjado: 75 % (v/v) Color plomo: 50 % (v/v) Color amarillo: 25 % (v/v).

En la **Ilustración 8**, se puede observar que a pH 2,0 al 100 % (v/v) de sobrenadante posee un 95% de actividad antioxidante, siendo este el mayor porcentaje; seguido por

el pH 3,0 que de la misma manera poseen mayor actividad antioxidante, frente a los diferentes pH estudiados. El pH 6,0 posee la menor actividad en un 68% a la concentración de 100 % (v/v).



**Ilustración 9.** Porcentaje de actividad antioxidante de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua. Color azul: 0,2 mg/μL Color anaranjado: 0,4 mg/μL Color plomo: 1 mg/μL Color amarillo: 2 mg/μL

En la **Ilustración 9**, se puede observar que a pH 2,0 con una concentración de 0,20 mg/μL de proteína posee un 89,21% de actividad antioxidante, siendo este el mayor porcentaje; los pHs con mayor actividad antioxidante después del pH 2,0 es el pH 6,0 y 3,0 frente a los distintos pHs estudiados. El pH 5,0 posee la menor actividad en un 85,17% en la concentración de 2,0 mg/μL.

**Tabla 9.-** Antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno).

CONCENTRACIÓN	PROM *	D.S. *	VAR *
0,2	85,93	0,032	0,001
0,4	85,56	0,024	0,001
1,0	86,38	0,064	0,004
2,0	86,56	0,021	0,0004

\*Valores promedios, desviación estándar y varianza de tres repeticiones.

Los datos del sobrenadante y proteína obtenida de la cáscara de Ungurahua, fueron comparados con un antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno), donde su actividad fue menor frente a casi todos los pHs de proteína de la cáscara de Ungurahua estudiados; el sobrenadante del pH 2,0 al 100 % (v/v) obtuvo la mayor actividad antioxidante con un 95,04% superando al BHT que el mayor fue a una concentración de 2,0 mg/mL con 86,56% de actividad antioxidante.

Se puede decir que la harina de cáscara de Ungurahua posee gran cantidad de flavonoides y antocianinas, ya que los flavonoides en alimentos, poseen una gran capacidad de capturar radicales libres y crear complejos con iones metálicos, dando una alta capacidad antioxidante y también ayuda a inhibir la oxidación de la vitamina C; las antocianinas se encuentran generalmente en la cáscara o piel de los alimentos y son los responsables de una gama de colores, desde el incoloro hasta el púrpura (**Badui, 2006**).

#### **4.3 VERIFICACIÓN DE HIPOTESIS**

Con un nivel de confianza del 95 % y con los resultados obtenidos y analizados, se determinó que existe diferencia significativa, “se acepta la hipótesis alternativa”, es decir “Los pH utilizados influyen significativa sobre el rendimiento de proteínas, el contenido fenólico y la actividad antioxidante presentes en la harina de la cáscara de *Oenocarpus bataua*.”.



## 5 CAPÍTULO V

### 5.2 CONCLUSIONES

- ✓ La actividad antioxidante y digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de la cáscara de Ungurahua (*Oenocarpus bataua*) se determinó en el sobrenadante y la proteína aislada, donde se obtuvo un gran porcentaje de actividad antioxidante por la presencia de fenoles totales, y un limitado perfil proteico pero con un alto contenido de fibra por ser una muestra de la cáscara.
- ✓ La caracterización de proteínas presentes en la harina de la cáscara de *Oenocarpus bataua* se realizó a diferentes pHs de precipitación y tipos de solventes, donde el mayor rendimiento fue a pH 3,0 con un 2,06% con agua y el mayor rendimiento al utilizar hidróxido de sodio fue a pH 6,0 con un 85%; lo cual concuerda con el análisis proximal realizado en el INIAP donde se obtuvo el 5,58% de proteína.
- ✓ La presencia de fenoles totales en la cáscara de *Oenocarpus bataua* se identificó mediante el método de Folin, el cual está entre 162,10 y 198,12 mg GAE/100g de muestra siendo mayor al contenido fenólico de la mora que es de 118,9 mg GAE/100g de muestra; además que superó al contenido de algunas frutas como la maracuyá, naranjilla, mango y granadilla.
- ✓ La actividad antioxidante de la proteína y sobrenadante procedentes de la cáscara de *Oenocarpus bataua* se evaluó utilizando el método TBARS, donde la actividad antioxidante de las proteínas está entre 85,17 - 89,21% y del sobrenadante entre el 67,69 - 95,04% siendo mayor al antioxidante sintético (BHT) comparado, que se encuentra entre el 85,53 - 86,56%.
- ✓ La digestión gástrica *in vitro* de proteínas de la cáscara de *Oenocarpus bataua* se simuló en condiciones fisiológicas humanas, donde se estableció albuminas 2S cercanas a 75 kDa, globulinas 7S cercanas a 63 kDa, 48 kDa y 35 kDa, en la simulación duodenal aún se observaron las bandas debido a que la muestra contiene aminoácidos aromáticos y la pepsina no es eficaz en romper sus enlaces, corroborando los resultados con la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales.

### 5.3 RECOMENDACIONES

- ✓ Ampliar el rango del punto isoeléctrico del pH de las proteínas estudiadas ya que el rendimiento con agua fue mayor a pH 3,0 y con NaOH a pH 6,0; por lo que es necesario saber los valores de pH en los rangos intermedios.
- ✓ Analizar el perfil de aminoácidos de la cáscara de Ungurahua, ya que esta muestra contiene gran cantidad de polifenoles y se asume que favorece la presencia de los mismos.
- ✓ Realizar estudios para la conservación o vida útil de aceites, utilizando el sobrenadante y la proteína de la cáscara de Ungurahua, debido que en el estudio realizado presentó un alto porcentaje de actividad antioxidante, que favorecerá a inhibir la oxidación de aceites.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Alam Md. N., Bristi N.J. y Rafiquzzaman Md. (2012). Review in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21:143-152.
- Andrade V. (2010). Presente y futuro de las oleaginosas en el Ecuador. Proyecto: Centro Iberoamericano de Investigación y Transferencia de Tecnología en Oleaginosas. Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.
- Angélica, M., Guerra, S., Llano, G. H., y López, C. Á. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* C) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). 30-39 pp.
- Añón, M. C. (2009). Propiedades fisiológicas de péptidos y proteínas de amaranto. La Plata, Argentina.
- Ávila Eduardo. (2009). Aprovechamiento de la *Scopraria dulcis* (Screphu lariaceael), *Oneocarpus batagua* (Arecaceae), y *Solanum brugmancia* (Solanaceae) en la producción de una pomada antiinflamatoria. Tesis previa a la obtención del Título de Tecnología en Procesamiento de recursos Biológicos Amazónicos de la Universidad Politécnica Salesiana. Quito\_ - Ecuador.
- Badui Salvador. (2006). Química de los Alimentos cuarta edición. México.
- Barberán, Tomas y Espín. 2001. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Grupo de investigación en calidad, seguridad y bioactividad de alimentos de origen vegetal, cebas (csic). Murcia. 41-53pp.
- Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T.G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Marconi, A.M., Andretta, F. and Levi, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of Passiflora spp. Extracts *Eur. Food Res. Technol.* 2006; 223: 102–109.
- Berner, D. and Brow, L. Protein nitrogen combustion method collaborative study. *Chem.* 1191 – 1193 pp.
- Brinegar, C., y Goundan, S. (1993.). Isolation and Characterization of Chenopin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopium Quinoa*). *Agricultural and Food Chemistry.* 182 – 185 pp.

- Callisaya, C. y Alvarado, A. (2009). Aislados Proteínicos de granos altos andinos *Chenopodiaceas*; quinua "*Chenopodium Quinoa*" - Cañahua "*Chenopodium Pallidicaule*" por Precipitación Isoeléctrica. Revista Boliviana de Química, 26(1).
- Casey, R., Domoney, C., and Smith, A.M. (1993). Biochemistry and molecular biology of seed products. En Peas: Genetics, Molecular Biology Biotechnology. eds Casey, R., Davies, D.R. (CAB International, Wallingford UK). 121-163 pp.
- Cerón, A. y Moreno, E. (2006). Determinación de la digestibilidad "*in vitro*" de la proteína, contenido de fifatos y lisina disponible en variedades criollas de maíz del estado de hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. El Alamo, México.
- Delgado, y Cecilia, M. (2015). Amarato como ingredientes funcionales: propiedades antioxidantes de proteínas y péptidos. Universidad nacional de la Plata.
- Díaz José Andrés y Ávila Lina María, sondeo del mercado mundial de aceites ceje (*oneocarpus bataua*), instituto de investigación de recursos biológicos, Alexander Humboldt. Bogotá – Colombia
- FAO. (2015). Macronutrientes: carbohidratos, grasas y proteínas. Fuente: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0d.htm>
- Fukushima, D. (1991). Structures of plant storage proteins and their function. Food Reviews International 7: 353-381.
- García Humberto y Vázquez Rafael. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. Biotecnología vol.3. 82-83 pp.
- García, P. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Betera 1*(2). 31-41 pp.
- Gomez D., Lebrum L., Paymal N. y Soldi A. (1996). Palmas Útiles en la Provincia de Pastaza, Amazonia Ecuatoriana, Manual práctico. Serie de manuales de palmas útiles amazónicas vol. 1. Quito – Ecuador. 1-71 pp.
- Gornall, A., Bardawill, Ch. and David, M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 751-766 pp.

- Gramanza, A. and Korczak, J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidant in lipid systems. *Food Science and Technology*. 351-358pp.
- Guerrero, L. A., Ríos, L.C. y Ancona, D.A., (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*. 34-43 pp.
- Guzmán-Chozas M, Vicario I, and Guillén-Sans R. (1999). Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *J. Agric. Food Chem*. 2452-2457 pp.
- Herrera, C.F; Bolaños, N y Lutz, G. (2003). *Química de Alimentos: manual de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Primera edición. 37 pp.
- J. Biol. (1927). FOLIN,C; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *Chem*. 73, 627650.
- Jacobson, G.A., Kirkpatrick, J.A. and Goff, H.E. (1964). A study of applicability of a modified thiobarbituric acid test to flavor evaluation of fats and oils. *J Am. Oil chem*. 41-124 pp.
- Jean, A.; Jacques, P.; Annie, P. y Pierre, D. (2000). *Análisis nutricional de los alimentos*. Acribia, S.A. España. 43 pp.
- Jiménez-Saiz R, Martos G, Carrillo W, López R, and Molina E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chem*. 127:1719-1726.
- Juárez, M., Olano, A. y Morais, F. (2005). *Alimentos funcionales*. Madrid, España.
- Kähkönen, Marja; Anu I. Copia; Heikki J. Vuorela; Jussi- Pekka Rauha; Kalevi Pihlaja; Tutti S. Kujala and Marina Heinonen. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 47. 3954 – 3962 pp.
- Kuskoski E., Asuero A. y Troncoso A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 726 pp.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* .217. 680-685 pp.

- Lindhal, A., Ungell, A.L., Knutson, L. and Lennernäs, H. (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research*, 14(4). 497-502 pp.
- López G, Flores I, Gálvez A, Quirasco M and Fárres A. (2003). Development of a liquid nutritional supplement using a *Sesamun indicum* L. protein insolate *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. *Lebensm,Wiss. Technol.* 36:67-74. 3003.
- López, R. y Echeverri, F. (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. *Scientia Et Technica*. 41- 44 pp.
- Manach, C. and Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research*, 38(8), 771-785.
- Martinez, E. and Añón, M. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Agricultural and Food Chemistry* (44). 2523-2530 pp.
- McClements, D.J, Decker, E.A. and Park, Y. (2009). Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 48-68.
- Ministerio de Coordinación de Desarrollo Social., MCDS. (2013). Proyecto para la reducción acelerada de la malnutrición en el Ecuador– Inti. Disponible en:<http://www.desarrollosocial.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2015/04/Proyecto.pdf>
- Morales, D. y Gallo, L. (2006). *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología*. Universidad Nacional Autónoma de México. San Ángel, México.
- Nielsen, N.C., Jung, R., Nam, Y., Beaman, T.W., Oliveira, L.O and Bassuner R.B. (1995). Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* 145:641-647.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins*. Longmans, Green new York. 452 pp.
- Osborne, T.B. (1907). *The proteins of the wheat kernel*. Publication of the Carnegie Institution, Washington, Washington D.C.

- Ozcelik, B., Lee, J.H. and Min, D.B. (2003). Effects of light, oxygen and pH on the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J. Food Sci.* 487-490 pp.
- Proestos, C., N. Choriantopoulos, G. J. E. Nychas and M. Komaitis. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53,1190-1195.
- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51. 2866-2887 pp.
- Rodriguez, M. (2009). Determinación de la actividad antioxidante de pétalos comestibles. Universidad Politecnica de Catalunya. 25 pp.
- Romero Nalda, (2015). Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. Capítulo 15. 2-8pp.
- Sandoval, M., López. (2012). Aislamiento y caracterización de las proteínas de reserva de chía (*Salvia hispánica L.*). Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México.
- Schauss, A.G., Wu, X., Prior, R.L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., Agarwal, A., Jensen, G.S., Hart, A.N. and Shanbrom, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 8604-8610.
- Shewry, P.R. (1995). Plant storage proteins. *Biology Review.* 375-426 pp.
- Shewry, P.R. (2002). Cereal seed storage proteins; structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53:947-958.
- Singh, H., Ye, A. and Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research.* 48, 92-100.
- Sumeri, I., Arike, L., Admberg, K. and Paalme, T. (2008). Single bio-reactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 317-324.
- Tatham, A.S and Shewry, P.R. (1985). The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\omega$ -gliandis. *Journal of Cereal Science* 3: 103- 113.

- Tomás-Barberán FA and Espín JC. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. 853-76 pp.
- Tomás-Barberán FA, Ferreres F. and Gil MI. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. 739-95 pp.
- Ulloa, J., Ulloa, P., Ramírez, J. y Ulloa, B. (2012). Producción de aislados proteicos a partir de subproductos industriales. 9-10 pp.
- Vasco, C., Ruales, J. and Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. 817-819 pp.
- Vasquez E. (2003). Bioquímica y Biología molecular en línea. Disponible en: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/generalidades%20digestion%20proteinas.html>
- Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. and B.D. Oomah. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. J. Agric. Food Chem. Vol. 46. 4113-4117 pp.
- Villachica, Hugo. 1966. Desarrollo de Tecnología para la Producción Sostenible de Especies Autóctonas. Programa Regional de Producción de la Producción Sostenible y la Utilización de Frutas y Hortalizas Amazónicas. 10-18 pp.
- Vio, F. y Velasco. (2003). Los alimentos que necesitamos. NutricionXXI Alimentos saludables (10). 8-11 pp.
- Youle, R. and Huang, A. (1981). Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. American Journal of Botany 68: 44-48.



## **ANEXOS**

**ANEXO A**  
**RENDIMIENTOS**

El rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{\text{Proteína aislada (gr)}}{\text{Cantidad de harina (gr)}} \times 100$$

**Tabla 10.-** Datos de concentrados proteicos con agua a diferentes pHs para determinar su rendimiento en base de 10gr de muestra.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	DESV *	VAR *
pH 6,0	1,34	1,36	1,33	1,34	0,02	0,0003
pH 5,0	1,70	1,62	1,78	1,70	0,08	0,006
pH 4,0	1,84	1,67	2,01	1,84	0,17	0,029
pH 3,0	1,99	2,06	2,12	2,06	0,07	0,004
pH 2,0	1,31	1,44	1,18	1,31	0,13	0,017

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.

**Tabla 11.-** Datos de concentrados proteicos con NaOH a diferentes pHs para determinar su rendimiento en base de 10gr de muestra.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	DESV *	VAR *
pH 6,0	4,64	5,06	4,85	4,85	0,21	0,04
pH 5,0	3,59	2,75	3,17	3,17	0,42	0,17
pH 4,0	3,14	2,87	3,00	3,00	0,13	0,02
pH 3,0	2,77	2,82	2,79	2,79	0,02	0,001
pH 2,0	3,14	2,70	2,92	2,92	0,22	0,05

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.

Datos del análisis proximal realizado en el INIAP, de la harina de la cáscara de Ungurahua.

NC-LSAIA-2201-03



INFORME DE ENSAYO No: 16-035

<b>NOMBRE PETICIONARIO:</b>	Sra. Wilma Llerena	<b>INSTITUCION:</b>	Particular
<b>DIRECCION:</b>	Huachi Grande, San Vicente	<b>ATENCION:</b>	Sra. Wilma Llerena
<b>FECHA DE EMISION:</b>	17 de Febrero del 2016	<b>FECHA DE RECEPCION:</b>	02/02/2016
<b>FECHA DE ANALISIS:</b>	Del 2 al 15 de septiembre de 2015	<b>HORA DE RECEPCION:</b>	11H00
		<b>ANALISIS SOLICITADO</b>	Proximal

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS <sup>Ω</sup>	E.E. <sup>Ω</sup>	PROTEINA <sup>Ω</sup>	FIBRA <sup>Ω</sup>	E.L.N. <sup>Ω</sup>	IDENTIFICACIÓN
METODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.05	MO-LSAIA-01.06	
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	%	
16-0230	12,04	1,89	15,60	5,58	27,21	49,72	Cáscara de Ungurahua molida
16-0231	6,75	8,10	10,09	50,82	0,51	30,47	Aislado de Amarató

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME

  
Dr. Armando Rubio  
RESPONSABLE DE CALIDAD



  
Dr. Ivan Samaniego, MSc.  
RESPONSABLE TÉCNICO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigida únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este documento es estrictamente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

**ANEXO B**  
**DATOS DE FENOLES TOTALES**

Fórmula para la determinación de fenoles totales (FT):

$$A = (m \times C) + B$$

A= Absorbancia (750nm)

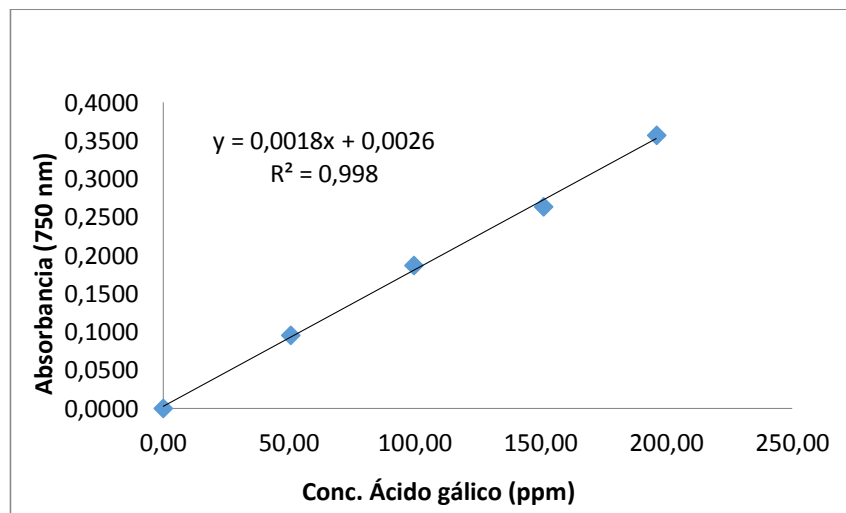
m= Pendiente de la curva estandar

C= Concentración (mg/L).

B= Interacción del valor de la absorbancia.

**Tabla 12.-** Datos de la curva estándar de ácido gálico.

Concentración (mg/L)	Absorbancia (750 nm)
0,00	0,0000
50,61	0,0955
99,53	0,1865
151,05	0,2630
195,99	0,3565



**Ilustración 10.** Curva estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales (FT).

**Tabla 13.-** Datos del cálculo de fenoles totales (FT) del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	DESV *	VAR *
pH 6,0	180,25	179,69	180,81	180,25	0,56	0,31
pH 5,0	171,31	174,67	172,99	172,99	1,68	2,81
pH 4,0	162,38	161,82	162,10	162,10	0,28	0,08
pH 3,0	173,83	171,87	175,78	173,83	1,95	3,82
pH 2,0	198,12	195,89	200,36	198,12	2,23	4,99

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.

**ANEXO C**  
**CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO BCA**

Fórmula para la cuantificación de proteína por método BCA:

$$A = (m \times C) + B$$

A= Absorbancia (750nm)

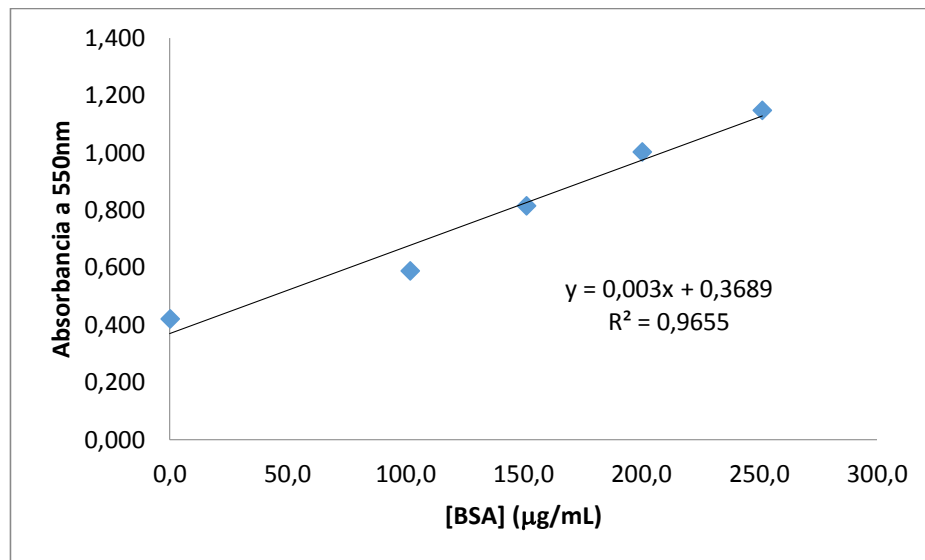
m= Pendiente de la curva estándar

C= Concentración (mg/L).

B= Interacción del valor de la absorbancia.

**Tabla 14.-** Datos de la curva estándar de BSA.

Concentración de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia (550nm)
0,0000	0,4210
101,9395	0,5870
151,2819	0,8140
200,3805	1,0020
251,3171	1,1480



**Ilustración 11.** Curva estándar de Albúmina de Suero Bovino (BSA).

**Tabla 15.-** Datos cuantificación proteica por el método BCA.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	DESV *	VAR *
pH 2,0	33,92	35,48	34,70	34,70	0,78	0,61
pH 3,0	34,43	34,93	34,68	34,68	0,25	0,06
pH 4,0	39,88	41,31	40,59	40,59	0,72	0,51
pH 5,0	26,90	27,96	27,43	27,43	0,53	0,28
pH 6,0	28,49	30,75	29,62	29,62	1,13	1,28

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.



**ANEXO D**  
**CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO BIURET Y DUMAS**

**Tabla 16.-** Datos cuantificación proteica por el método Biuret.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	DESV *	VAR *
pH 6,0	37,83	37,83	42,52	39,39	2,71	7,32
pH 5,0	29,21	31,27	29,72	30,07	1,07	1,15
pH 4,0	55,12	54,05	55,12	54,76	0,62	0,38
pH 3,0	36,99	36,45	35,37	36,27	0,82	0,68
pH 2,0	30,86	31,38	31,38	31,21	0,30	0,09

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.

**Tabla 17.-** Datos cuantificación proteica por el método Dumas.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	D.S. *	VAR *
pH 2,0	32,27	32,27	32,28	32,27	0,006	3,70E-05
pH 3,0	15,99	15,95	15,98	15,97	0,019	0,0004
pH 4,0	63,32	63,3	63,3	63,31	0,013	0,0002
pH 5,0	25,27	25,27	25,25	25,26	0,011	0,0001
pH 6,0	23,78	23,78	23,79	23,78	0,005	2,50E-05

\*Valores promedios, desviación y varianza de tres repeticiones.

**ANEXO E**  
**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MÉTODO TBARS**

Fórmula para el cálculo de Actividad Antioxidante por el método TBARS.

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{(C - M)}{C} \times 100$$

C= Promedio de la absorbancia del aceite oxidado.

M= Absorbancia de la muestra.

**Tabla 18.-** Datos de Absorbancia del aceite oxidado y no oxidado.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *
Aceite no ox	2,369	2,334	2,335	2,346
Aceite ox	2,305	2,304	2,303	2,304

\*Valores promedios de tres repeticiones.

**Tabla 19.-** Datos de Absorbancia del BHT.

concentr	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM *	D.S. *	VAR *
0,2	85,955	85,934	85,893	85,927	0,032	0,001
0,4	85,497	85,539	85,539	85,525	0,024	0,001
1	86,392	86,434	86,309	86,378	0,064	0,004
2	86,538	86,558	86,579	86,558	0,021	0,000

\*Valores promedios, desviación estándar y varianza de tres repeticiones.

**Tabla 20.-** Datos Absorbancias de las réplicas de las muestras del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.

	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25
pH6	67,80	76,51	79,71	74,84	67,66	76,42	79,62	74,88	67,62	76,42	79,75	75,23
pH5	80,36	79,77	77,06	83,22	66,45	69,47	69,92	79,58	66,67	69,38	70,40	79,97
pH4	76,35	73,33	83,36	76,58	76,30	73,59	76,65	73,20	76,22	83,29	76,55	73,42
pH3	91,49	85,68	87,67	83,72	91,36	86,15	87,93	83,55	91,32	86,11	87,98	83,55
pH2	95,10	87,06	83,14	81,87	94,70	86,97	83,18	82,09	95,31	86,66	82,75	82,13

**Tabla 21.-** Datos promedios y desviación estándar de Absorbancia del sobrenadante de la harina de la cáscara de Ungurahua.

	PROMEDIO * (%)				D.S.*			
	100	75	50	25	100	75	50	25
pH6	67,69	76,45	79,69	74,98	0,09	0,05	0,07	0,21
pH5	71,16	72,87	72,46	80,92	7,97	5,98	3,99	2,00
pH4	76,29	76,74	78,99	74,40	0,07	5,68	3,79	1,90
pH3	91,39	85,98	87,86	83,61	0,09	0,26	0,16	0,10
pH2	95,04	86,90	83,02	82,03	0,31	0,21	0,24	0,14

\*Valores promedios y desviación estándar de tres repeticiones.

**Tabla 22.-** Datos Absorbancias de las réplicas de las muestras de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua.

	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
	100	75	50	25	100	75	50	25	100	75	50	25
pH6	88,194	88,021	87,500	86,111	88,238	88,021	87,500	86,111	88,151	87,977	87,500	86,024
pH5	86,979	86,285	85,894	85,200	86,979	86,241	85,894	85,156	86,979	86,198	85,894	85,156
pH4	87,977	86,415	86,372	85,417	88,021	86,415	86,372	85,417	88,021	86,372	86,328	85,373
pH3	88,498	86,979	86,762	85,981	88,542	87,023	86,719	85,981	88,455	86,979	86,806	85,938
pH2	89,193	88,802	88,759	88,455	89,236	88,845	88,715	88,411	89,193	88,889	88,845	88,411

**Tabla 23.-** Datos promedios y desviación estándar de Absorbancia de la proteína de la harina de la cáscara de Ungurahua.

	PROMEDIO * (%)				D.S.*			
	0,2	0,4	1	2	100	75	50	25
pH6	88,19	88,01	87,50	86,08	0,04	0,03	0,00	0,05
pH5	86,98	86,24	85,89	85,17	0,00	0,04	0,00	0,03
pH4	88,01	86,40	86,36	85,40	0,03	0,03	0,03	0,03
pH3	88,50	86,99	86,76	85,97	0,04	0,03	0,04	0,03
pH2	89,21	88,85	88,77	88,43	0,03	0,04	0,07	0,03

\*Valores promedios y desviación estándar de tres repeticiones.

## **ANEXO F**

### **ANÁLISIS DE DATOS EN EL PAQUETE ESTADÍSTICO INFOSTAT**

## RENDIMIENTO PROTEINA

### Aislamiento de proteína con agua

#### Agua

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Agua	15	0,92	0,88	6,45

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,24	4	0,31	27,37	<0,0001
pH	1,24	4	0,31	27,37	<0,0001
Error	0,11	10	0,01		
Total	1,35	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,28607

Error: 0,0113 gl: 10

pH	Medias	n	E.E.	
2,00	1,31	3	0,06	A
6,00	1,34	3	0,06	A
5,00	1,70	3	0,06	B
4,00	1,84	3	0,06	B C
3,00	2,06	3	0,06	C

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

### Aislamiento de proteína con hidroxido de sodio

#### NaOH

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
NaOH	15	0,86	0,81	15,11

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14,21	4	3,55	15,85	0,0002
pH	14,21	4	3,55	15,85	0,0002
Error	2,24	10	0,22		
Total	16,45	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,27197

Error: 0,2241 gl: 10

pH	Medias	n	E.E.	
2,00	1,85	3	0,27	A
3,00	2,79	3	0,27	A B
4,00	3,00	3	0,27	A B
5,00	3,17	3	0,27	B
6,00	4,85	3	0,27	C

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

## DISEÑO A × B

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
R1	30	0,99	0,99	8,25

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	226,98	9	25,22	212,65	<0,0001
Factor B	14,38	4	3,60	30,32	<0,0001
Factor A	190,81	1	190,81	1608,94	<0,0001
Factor B*Factor A	21,78	4	5,45	45,92	<0,0001
Error	2,37	20	0,12		
Total	229,35	29			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59497

Error: 0,1186 gl: 20

Factor B	Medias	n	E.E.
1	3,58	6	0,14 A
2	3,82	6	0,14 A
3	3,92	6	0,14 A
4	4,02	6	0,14 A
5	5,53	6	0,14 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26231

Error: 0,1186 gl: 20

Factor A	Medias	n	E.E.
1	1,65	15	0,09 A
2	6,69	15	0,09 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,99570

Error: 0,1186 gl: 20

Factor B	Factor A	Medias	n	E.E.
1	1	1,31	3	0,20 A
5	1	1,34	3	0,20 A
4	1	1,70	3	0,20 A
3	1	1,84	3	0,20 A
2	1	2,06	3	0,20 A
2	2	5,59	3	0,20 B
1	2	5,84	3	0,20 B
3	2	6,00	3	0,20 B
4	2	6,34	3	0,20 B
5	2	9,71	3	0,20 C

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



## FENOLES TOTALES (FT)

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Absorbancia	15	0,99	0,99	0,75

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2020,12	6	336,69	191,67	<0,0001
pH	2017,24	4	504,31	287,10	<0,0001
Replicas	2,88	2	1,44	0,82	0,4739
Error	14,05	8	1,76		
Total	2034,18	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,73854

Error: 1,7566 gl: 8

pH Medias n E.E.

4	162,10	3	0,77	A
3	172,99	3	0,77	B
5	173,83	3	0,77	B
2	180,06	3	0,77	C
6	197,38	3	0,77	D

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,39518

Error: 1,7566 gl: 8

Replicas Medias n E.E.

2	176,79	5	0,59	A
1	177,18	5	0,59	A
3	177,85	5	0,59	A

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

## BCA

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BCA % proteína	15	1,00	0,99	1,05

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	313,42	6	52,24	420,94	<0,0001
pH	308,75	4	77,19	621,99	<0,0001
Replicas	4,67	2	2,34	18,83	0,0009
Error	0,99	8	0,12		
Total	314,41	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,99369

Error: 0,1241 gl: 8

pH	Medias	n	E.E.	
5	27,61	3	0,20	A
6	29,62	3	0,20	B
3	34,68	3	0,20	C
2	34,70	3	0,20	C
4	40,59	3	0,20	D

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,63663

Error: 0,1241 gl: 8

Replicas	Medias	n	E.E.	
1	32,72	5	0,16	A
3	33,51	5	0,16	B
2	34,09	5	0,16	B

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

## BIURET

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BIURET % proteína	15	0,99	0,97	3,96

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1169,44	7	167,06	72,29	<0,0001
pH	1168,89	5	233,78	101,16	<0,0001
Replicas	0,55	2	0,28	0,12	0,8887
Error	16,18	7	2,31		
Total	1185,62	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,59844

Error: 2,3110 gl: 7

pH Medias n E.E.

3	30,07	3	0,88	A
6	31,57	3	0,88	A B
5	36,27	3	0,88	B C
1	37,80	1	1,52	C
2	40,15	2	1,07	C
4	54,73	3	0,88	D

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,83157

Error: 2,3110 gl: 7

Replicas Medias n E.E.

1	38,00	5	0,68	A
2	38,38	5	0,68	A
3	38,82	5	0,68	A

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

## DUMAS

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Dumas %	15	1,00	1,00	0,04

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4049,58	6	674,93	4601797,31	<0,0001
pH	4049,58	4	1012,40	6902695,35	<0,0001
Réplicas	3,6E-04	2	1,8E-04	1,23	0,3429
Error	1,2E-03	8	1,5E-04		
Total	4049,58	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03416

Error: 0,0001 gl: 8

pH	Medias	n	E.E.	
3,00	15,97	3	0,01	A
6,00	23,78	3	0,01	B
5,00	25,26	3	0,01	C
2,00	32,27	3	0,01	D
4,00	63,31	3	0,01	E

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02189

Error: 0,0001 gl: 8

Réplicas	Medias	n	E.E.	
2,00	32,11	5	0,01	A
3,00	32,12	5	0,01	A
1,00	32,13	5	0,01	A

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

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Sobrenadante

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% act antioxidante	72	0,69	0,62	5,46

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2469,56	13	189,97	9,73	<0,0001
tratamientos	2408,09	5	481,62	24,67	<0,0001
replicas	45,40	2	22,70	1,16	0,3199
concentración	16,08	6	2,68	0,14	0,9908
Error	1132,40	58	19,52		
Total	3601,97	71			

### Contrastes

tratamientos	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
testigo versus el resto	-30,87	7,05	381,16	1	381,16	19,52	<0,0001
Total			381,16	1	381,16	19,52	<0,0001

### Coefficientes de los contrastes

tratamientos	Ct.1
2,00	1,00
3,00	1,00
4,00	1,00
5,00	1,00
6,00	1,00
9,00	-5,00

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,31627

Error: 19,5242 gl: 58

tratamientos	Medias	n	E.E.	
3,00	74,35	12	1,29	A
2,00	74,71	12	1,29	A
4,00	76,60	12	1,29	A
9,00	86,10	12	1,29	B
6,00	86,75	12	1,29	B
5,00	87,21	12	1,29	B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,06809

Error: 19,5242 gl: 58

replicas	Medias	n	E.E.	
2,00	80,17	24	0,91	A
3,00	80,64	24	0,91	A
1,00	82,04	24	0,91	A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,78661

Error: 19,5242 gl: 58

concentración	Medias	n	E.E.	
25,00	79,19	15	1,15	A
75,00	79,79	15	1,15	A
100,00	80,31	15	1,15	A
50,00	80,40	15	1,15	A
0,40	85,53	3	2,57	A
0,20	85,93	3	2,57	A
1,00	86,38	3	2,57	A
2,00	86,56	3	2,57	A

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

## Proteína

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% act antioxidante	72	0,95	0,94	0,35

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	95,94	13	7,38	79,70	<0,0001
tratamientos	64,53	5	12,91	139,38	<0,0001
replicas	0,01	2	2,7E-03	0,03	0,9718
concentración	31,40	6	5,23	56,52	<0,0001
Error	5,37	58	0,09		
Total	101,31	71			

### Contrastes

tratamientos	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
testigo versus el resto		5,44	0,49	11,83	1	11,83	127,71 <0,0001
Total			11,83	1	11,83	127,71 <0,0001	

### Coefficientes de los contrastes

tratamientos	Ct.1
2,00	1,00
3,00	1,00
4,00	1,00
5,00	1,00
6,00	1,00
10,00	-5,00

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,36613

Error: 0,0926 gl: 58

tratamientos	Medias	n	E.E.	
3,00	86,07	12	0,09	A
10,00	86,10	12	0,09	A
4,00	86,54	12	0,09	B
5,00	87,06	12	0,09	C
2,00	87,45	12	0,09	D
6,00	88,81	12	0,09	E

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21130

Error: 0,0926 gl: 58

replicas	Medias	n	E.E.	
3,00	86,99	24	0,06	A
1,00	87,01	24	0,06	A
2,00	87,01	24	0,06	A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60512

Error: 0,0926 gl: 58

concentración	Medias	n	E.E.	
0,40	85,53	3	0,18	A
0,20	85,93	3	0,18	A B
25,00	86,21	15	0,08	B C
1,00	86,38	3	0,18	B C
2,00	86,56	3	0,18	C D
50,00	87,06	15	0,08	D E
75,00	87,30	15	0,08	E
100,00	88,18	15	0,08	F

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



**ANEXO G**  
**ILUSTRACIONES**

## AISLAMIENTO DE LA PROTEÍNA



*Ilustración 12.* Fruto de Ungurahua.



*Ilustración 13.* Cáscara de Ungurahua



*Ilustración 14.* Harina de Ungurahua.



*Ilustración 15.* Desengrasado de la harina de Ungurahua.



*Ilustración 16.* Harina desengrasada.



*Ilustración 17.* Precipitación de la harina de la cáscara de Ungurahua.



***Ilustración 18.*** Sobrenadante



***Ilustración 19.*** Liofilización de la proteína de la cáscara de Ungurahua

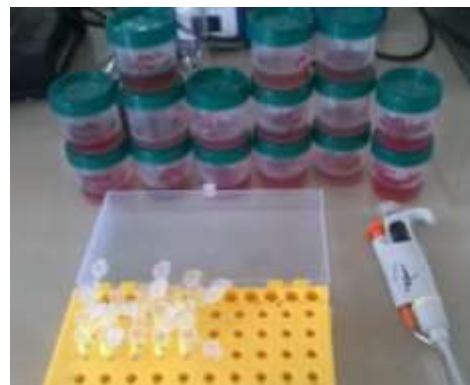


***Ilustración 20.*** Proteína liofilizada de la cáscara de Ungurahua.

### **CUANTIFICACIÓN PROTEICA**



***Ilustración 21.*** Método Biuret



***Ilustración 22.*** Método BCA.



**Ilustración 23.** Determinación de F.T.



**Ilustración 24.** Determinación de Actividad Antioxidante.



**Ilustración 25.** Simulación de la actividad antioxidante.



**Ilustración 26.** Lectura de la absorbancia de la actividad antioxidante.

## ELECTROFORESIS



**Ilustración 27.** Carga de las muestras.



**Ilustración 28.** Corrida de las muestras