



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



TEMA: Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal *in vitro* en proteínas de hoja de *Ilex guayusa*.

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. La investigación también es parte del proyecto de la Universidad IKIAM: Value creation along the agro-industrial chain of Guayusa: feasibility study of protection of the *Ilex guayusa* Loes as a domination of origin and further uses in food and non-food markets. Memorándum IKIAM-CSI-2015-002

Autora: Carla Paulina Cobo Urvina.

Tutor: PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

Ambato – Ecuador

Octubre, 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.



PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

C.I: 175708005-4

TUTOR

01 de Agosto del 2016

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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



Carla Paulina Cobo Urvina

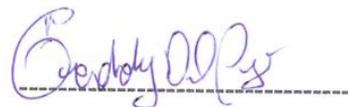
1804320289

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



Mgs. Paulo Santiago Baquero Icaza

180323354-1



Mgs. Danahe Fernández Rivero

175718120-9

Ambato, 05 de Octubre 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.



Carla Paulina Cobo Urvina

180432028-9

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres que hicieron de mi la persona que soy hoy, por su paciencia, entrega y amor.

A mi amor eterno Christian por tantos años de compañía y acompañarme en este camino.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi mamá por ser mi mejor amiga y guía principal en mi vida, hasta en mis peores días, a mi papá por hacerme una persona fuerte y honesta con amor y a mi hermano por darme fuerza para querer ser su ejemplo.

A mi gran amor Christian por apoyarme, creer en mí y darme el aliento durante todos estos años de estudio; sin ti mis días malos hubieran sido insuperables y mis alegrías no hubieran sido celebradas.

A mi tutor el Phd. Ismael Carrillo por ser un amigo y un profesor insuperable, brindándome confianza y conocimientos para concluir esta etapa de mi vida.

A la PhD. Katia Laura Sidalin coordinadora del proyecto: Value creation along the agro-industrial chain of Guayusa: feasibility study of protection of the *Ilex guayusa* Loes as a domination of origin and further uses in food and non-food markets de la Universidad IKIAM por el apoyo brindado y las facilidades para llevar a cabo la investigación.

INDICE

| | |
|-------------------|----|
| TEMA:..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 20 |

CAPITULO I EL PROBLEMA

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 23 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 1.3. OBJETIVOS | 25 |
| 1.3.1. Objetivo general | 25 |
| 1.3.2. Objetivos específicos | 25 |

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

| | |
|--|----|
| 2.1. Antecedentes investigativos | 26 |
| 2.2 Hipótesis | 28 |
| 2.2.1 Rendimiento de la proteína de <i>Ilex guayusa</i> aislada a diferentes pH; con 1 y 2 extracciones. | 28 |
| 2.2.2 Digestión gástrica y duodenal (<i>in vitro</i>) de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> .. | 28 |
| 2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante (<i>in vitro</i>) de las proteínas de <i>Ilex guayusa</i> | 29 |
| 2.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (<i>in vitro</i>) de las proteínas de <i>Ilex guayusa</i> | 29 |
| 2.2.5 Cuantificación de polifenoles presentes en el sobrenadante de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> | 30 |
| 2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis..... | 30 |
| 2.3.1 Variable independiente | 30 |
| 2.3.2 Variable dependiente | 30 |

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 3.1 Materiales | 32 |
| 3.1.1 Materia prima | 32 |
| 3.1.2 Equipos | 32 |
| 3.1.3 Reactivos | 33 |
| 3.1.4 Insumos y utensilios | 34 |
| 3.2. Métodos | 34 |
| 3.2.1. Obtención de harina de <i>Ilex guayusa</i> | 34 |
| 3.2.2. Aislado de proteínas de <i>Ilex guayusa</i> | 35 |
| 3.2.3. Análisis proximal..... | 37 |
| 3.2.4. Determinación de fenoles totales (FT) | 37 |
| 3.3. Caracterización del aislado proteico..... | 38 |
| 3.3.1. Cuantificación proteica..... | 38 |
| 3.3.2 Electroforesis (SDS-PAGE)..... | 39 |
| 3.3.3. Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> en proteína..... | 42 |
| 3.3.4. Actividad antioxidante de los aislados proteicos (Método TBARS)..... | 42 |
| 3.3.5. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> | 43 |
| 3.4. Análisis estadístico | 43 |

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| 4.1 Análisis y discusión de resultados | 45 |
| 4.1.1. Análisis proximal..... | 45 |
| 4.1.2. Aislamiento de la proteína de <i>Ilex guayusa</i> | 46 |
| 4.1.3. Cuantificación proteica con el método DUMAS..... | 48 |
| 4.1.4. Electroforesis | 49 |
| 4.1.5. Digestión <i>in vitro</i> | 51 |
| 4.1.6. Cuantificación de polifenoles | 54 |

| | |
|--|----|
| 4.1.7. Actividad antiinflamatoria..... | 55 |
| 4.1.8. Actividad antioxidante..... | 59 |
| 4.2. Verificación de Hipótesis | 61 |
| 4.2.1. Rendimiento de la proteína de <i>Ilex guayusa</i> aislada a diferentes pH; con una y dos extracciones..... | 61 |
| 4.2.2. Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> | 61 |
| 4.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante (in vitro) de las proteínas de <i>Ilex guayusa</i> | 61 |
| 4.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (in vitro) de las proteínas de <i>Ilex guayusa</i> | 62 |
| 4.2.5 Cuantificación de polifenoles presentes en el sobrenadante de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> | 62 |

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

| | |
|---------------------------|----|
| 5.1 Conclusiones..... | 63 |
| 5.2 Recomendaciones | 64 |

| | |
|--------------------|----|
| BIBLIOGRAFÍA | 66 |
|--------------------|----|

| | |
|--------------|----|
| ANEXOS | 71 |
|--------------|----|

| | |
|---|----|
| ANEXO A: DATOS RENDIMIENTOS DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEINA DE <i>Ilex guayusa</i> | 72 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| ANEXO B: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEINA DE <i>Ilex guayusa</i> | 75 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| ANEXO C: DATOS OBTENIDOS PARA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN SOBRENADANTES DE LA EXTRACCIÓN PROTEÍCA DE <i>Ilex guayusa</i> EN DIFERENTES pH | 78 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN SOBRENADANTES DE LA EXTRACCIÓN PROTEÍCA DE <i>Ilex guayusa</i> DIFERENTES pH..... | 81 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| ANEXO E: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN EXTRACTOS DE PROTEINA DE <i>Ilex guayusa</i> EN DIFERENTES pH..... | 84 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| ANEXO F: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>Ilex guayusa</i> DE DIFERENTES pH | 86 |
| ANEXO G: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROTEINA DE <i>Ilex guayusa</i> EN DIFERENTES pH..... | 90 |
| ANEXO H: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROTEINA DE <i>Ilex guayusa</i> EN DIFERENTES pH..... | 94 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Metodología utilizada para el análisis proximal..... | 37 |
| Tabla 2. Curva de calibración con EDTA para el equipo DUMAS | 39 |
| Tabla 3. Análisis proximal de la harina de <i>Ilex guayusa</i> | 45 |
| Tabla 4. Información nutricional de plantas medicinales..... | 46 |
| Tabla 5. Promedio de rendimientos de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> con una y dos extracciones | 47 |
| Tabla 6. Cuantificación proteica de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> | 48 |
| Tabla 7. Contenido de polifenoles totales solubles (mg GAE/100g de muestra)..... | 54 |
| Tabla 8. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> en comparación al control negativo de albúmina de huevo. | 56 |
| Tabla 9. Actividad antioxidante de los diferentes pH: pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 de los aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml el efecto antioxidante se probó en el aceite de Ungurahua. | 59 |
| Tabla 10. Datos obtenidos para el rendimiento de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en peso | 73 |
| Tabla 11. Rendimiento de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en porcentaje..... | 74 |
| Tabla 12. Análisis ANOVA de dos variables del rendimiento de extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> ; $\alpha= 0.05$ | 76 |
| Tabla 13. Prueba de comparación múltiple de tukey para el rendimiento de extracción de <i>Ilex guayusa</i> con α de 0.05 | 76 |
| Tabla 14. Valores de absorbancia para la cuantificación de polifenoles leídos a 750 nm de muestra de los sobrenadantes de los extractos de proteínas en diferentes pH..... | 79 |
| Tabla 15. Valores de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra de los sobrenadantes de los extractos de proteínas en diferentes pH..... | 79 |
| Tabla 16. Análisis de ANOVA de una sola variable para los datos de cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con un valor $\alpha=0.05$ | 82 |
| Tabla 17. Prueba de comparación múltiple de tukey para la cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con un valor $\alpha =0.05$ | 82 |
| Tabla 18. Actividad antiinflamatorios <i>in vitro</i> de los extractos proteicos <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con diferentes concentraciones | 85 |
| Tabla 19. Análisis de ANOVA de dos variables con $\alpha=0.05$ de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de extractos proteicos de <i>Ilex guayusa</i> de diferentes pH en diferentes concentraciones | 87 |
| Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de dunet para la actividad antiinflamatoria extractos de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con diferentes concentraciones con un valor $\alpha =0.05$ | 87 |

| | |
|--|----|
| Tabla 21. Valores de absorbancia de actividad antioxidante de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> con diferentes pH y concentraciones..... | 90 |
| Tabla 23. Promedio de absorbancias de actividad antioxidante de aislados proteico de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH y concentraciones..... | 92 |
| Tabla 24. Promedio de porcentajes de actividad antioxidante de aislados proteicos de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH y concentraciones..... | 92 |
| Tabla 25. Control positivo y negativo con aceite de Ungurahua en porcentaje para actividad antioxidante | 93 |
| Tabla 26. Análisis de ANOVA de dos variables con $\alpha=0.05$ de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extractos proteicos de <i>Ilex guayusa</i> de diferentes pH en diferentes concentraciones | 95 |
| Tabla 27. Prueba de comparación múltiple de dunet para la actividad antioxidante en los extractos de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con diferentes concentraciones con un valor $\alpha =0.05$ | 95 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Hojas de guayusa frescas, secadas tradicionalmente y polvo molido..... | 34 |
| Figura 2. Extracción de proteína | 35 |
| Figura 3. Centrífuga y pH-metro | 36 |
| Figura 4. Liofilizador..... | 36 |
| Figura 5. Muestras para determinación de polifenoles con el reactivo Folin..... | 38 |
| Figura 6. Equipo Dumas..... | 38 |
| Figura 7. Curva de calibración de EDTA..... | 39 |
| Figura 8. Equipo Protean IEF y bandeja de rehidratación..... | 41 |
| Figura 9. Cámara de electroforesis BIO-RAD | 41 |
| Figura 10. Extracción a diferentes pH..... | 47 |
| Figura 11. Comparación de rendimiento en diferentes pH: pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH4.5 y pH 5.0; con una y dos extracciones | 48 |
| Figura 12. Gel de electroforesis Ilex guayusa en presencia de 2-βmercapto etanol en diferentes pH: pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH4.5 y pH 5.0 de solubilización en agua con 12% de acrilamida..... | 49 |
| Figura 13. Gel bidimensional del pH 4.0 de los aislados de proteína de Ilex guayusa | 50 |
| Figura 14. Gel de poliacrilamida de la digestión gástrica y duodenal in vitro del aislado a pH 4.0 de Ilex guayusa | 51 |
| Figura 15. Digestión gástrica y duodenal | 53 |
| Figura 16. Contenido de polifenoles en los sobrenadantes de los diferentes pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 de Ilex guayusa | 54 |
| Figura 17. Actividad antiinflamatoria de los aislados de Ilex guayusa y del Diclofenaco comercial en diferentes pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0; en distintas concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml..... | 57 |
| Figura 18. Actividad antioxidantes de los aislados proteico de Ilex guayusa en diferentes pH 3.0, pH3.5, pH 4.0,pH 4.5 y pH 5.0; en distintas concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml..... | 60 |
| Figura 19. Diferencia en la prueba de comparación múltiple de tukey para el rendimiento de extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> | 77 |
| Figura 20. Curva de calibración de equivalentes de ácido gálico para cuantificación de polifenoles | 80 |
| Figura 21. Prueba de comparación múltiple de tukey para la cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH con un valor $\alpha =0.05$ | 83 |
| Figura 22. Prueba de comparación múltiple de dunnet para la evaluación <i>in vitro de la actividad antiinflamatoria</i> de la extracción de proteína de <i>Ilex guayusa</i> en diferentes pH en diferentes concentraciones con un valor $\alpha =0.05$ | 89 |

Figura 23. Prueba de comparación múltiple de dunnet para la evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH en diferentes concentraciones con un valor $\alpha = 0.05$ 97

LISTA DE ABREVIATURAS

β-ME 2-β-Mercaptoethanol

μl micro litros

AINES Antiinflamatorios no esteroides

AOAC Métodos Oficiales de Análisis

ANOVA análisis de varianza

BHA butilhidroxianisol

BHT butilhidroxitolueno

DS desviación estándar

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

FRAP poder antioxidante de poder férrico

GAE Equivalente de ácido gálico

HCl Ácido clorhídrico

IPG Immobilized pH gradient

INEN Instituto nacional de normalización

IEF First dimension isoelectric focusing

kDa kilo Dalton

KOH Hidróxido de potasio

LACONAL Laboratorio de análisis de los alimentos

mA. mili amperios

mg miligramos

ml mililitros

mM. mili moles

M molar

Nx6.25 nitrógeno en análisis de proteína

nM. nano moles

nm. nanómetros

N Normal

PDCAAS computo de aminoácidos corregido con la digestibilidad de la proteína

PSA Persulfato de amonio

RPM revoluciones por minuto

SDS Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SGF fluido gástrico simulado

TBA Ácido Tiobarbitúrico

TEMED Tetra methyl etilen diamina

U. unidades

V varianza

V voltios

Vol. /vol. relación volumen/volumen

RESUMEN

Ilex guayusa es una hoja de arbusto nativa del oriente ecuatoriano. Al realizar el análisis proximal de la harina de estas hojas secas se encontró entre los principales componentes: 61% carbohidratos, 18.2 % proteínas y 6.67 % cenizas. Indicando que la hoja de *Ilex guayusa* tiene alto contenido proteico a comparación de diferentes plantas medicinales como loto indio, zarzaparrilla, pesgua y yaca con un 5% de proteína en promedio y puede ser de alto interés para la industria alimentaria. En este estudio las proteínas fueron extraídas de *Ilex guayusa*, utilizando la precipitación isoelectrica para aislar las proteínas vegetales. El tratamiento de mayor rendimiento fue a pH 3.0 con un rendimiento de 5.59 % y 64.57 % de proteína en el aislado, mientras que la doble extracción aumentó significativamente en el pH 4.0 de 2.98 % a 4.17 % de rendimiento con 34.3 % de proteína contenida en el aislado. Mediante la electroforesis SDS-PAGE se caracterizó el peso molecular de los aislados, encontrando bandas entre 6 a 60 kDa; usando electroforesis bidimensional se encontró el punto isoelectrico de la proteína entre el pH 3.0 y pH 4.0 con un peso molecular de 30 kDa. En la digestión *in vitro* la proteína de guayusa se hidrolizó en su totalidad a pH 3.0 correspondiente a los jugos estomacales de la fase gástrica de la digestión. Así mismo, se evaluó el contenido de polifenoles en el sobrenadante obtenido de las extracciones isoelectricas a diferentes pH con el mayor contenido de ácido gálico (1508,03 mg de ácido gálico / 100 g de muestra) a pH 5.0. Adicionalmente se valoró la actividad antiinflamatoria en comparación con el antiinflamatorio comercial Diclofenaco, el mejor tratamiento del aislado se encontró con 67,89% de actividad con menor concentración (500 µg/ml) a un pH de 5.0. Finalmente la actividad antioxidante se estimó en el aceite de Ungurahua muy sensible a la oxidación a comparación del aceite de palma. La actividad antioxidante del aislado se comparó con un antioxidante de uso comercial butilhidroxitolueno (BHT) mostrando mayor actividad de 79,09% y 80,47% en las concentraciones de 100 y 1000 µg/ml respectivamente a pH 4.5 en el aislado de proteína. Demostrando así que los péptidos activos de los aislados proteicos de *Ilex guayusa* muestran compuestos de interés para la industria farmacéutica y alimentaria.

Palabras claves: Guayusa, proteínas, digestibilidad gástrica *in vitro*, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, polifenoles.

SUMMARY

Ilex guayusa is a bush leave native from ecuadorian jungle. Assay from the vegetal flour obtained from dry leaves showed like principal components: 61 % carbohydrate, 18.2 % proteins and 6.67 % ashes which means that *Ilex guayusa* leaves, has high protein content compared to other medicinal leaves like indian loto, zarzaparrilla, pesgua and yaca, this medicinal plants contains on average of 5% of protein and could be interest by pharmaceutical and food industry. On this study *Ilex guayusa* proteins were insolate by isoelectric method was used to separate the vegetable protein. The highest yield was obtained at pH 3.0 with 5.59 % and 64.57% of protein content in insolate, while the second extraction was effective for pH 4.0 enhancing the yield from 2.98 % to 4.17 % with 34.4 % of protein in the insolate. By SDS-PAGE electrophoresis method the molecular weight were estimated finding 6-60 kDa bands, bidimensional electrophoresis showed isoelectric point situated between 3.0-4.0 pH and 30 kDa molecular weight. In vitro digestibility of *Ilex guayusa* insolate protein were totally hydrolyzed at pH 3.0 corresponding to juices of gastric phase of digestion. Moreover the polyphenols content from isoelectric protein separation supernatant on different pH were estimated, the highest content (1508, 03 mg of galic acid / 100 g) was finding at pH 5.0. Likewise the anti-inflammatory activity was compared with a commercial anti-inflammatory known as Diclofenaco founding the highest activity (67,89%) on pH 4.5 with lower concentration (500µg/ml). Finally anti-oxidant activity was compared with a commercial antioxidant butilhidroxitoluen (BHT), the activity was evaluated in Ungurahua oil, this vegetable oil is very sensitive to oxidation at compare to palm oil, the guayusa protein showed the highest activity (79.09% y 80.47%) at pH 4.5 with 100 and 1000 µg/ml concentration. Therefor bio-actives peptides from *Ilex guayusa* protein insolates are interesting to pharmaceutical and food processing industries.

Key words: Guayusa, proteins, digestibility, *in vitro*, anti-oxidant activity, anti-inflammatory activity, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

La planta de guayusa es un árbol con frondosas hojas del ancho de una mano, muy delgadas. Sus hojas son cultivadas y transportadas desde el Oriente hacia otras provincias de la Sierra ecuatoriana (**Patiño, V. M. 1968**).

De Wapu (2009) y **Cerda Tapuy (2013)** señalan a la guayusa como una planta originaria de la Amazonía ecuatoriana de gran importancia para la población autóctona. De manera primaria se utiliza en infusiones de té, ya que se atribuye efectos favorables para la digestión. El aumento del valor agregado de esta planta es fundamental debido a que es autóctona de Ecuador y su exportación está en crecimiento, el aislamiento de proteínas permitirá mejorar las oportunidades de diversificación de productos de esta planta.

El proceso usado para la obtención de aislados proteicos permite incrementar el contenido de proteína con valores que pueden superar hasta el 90%, logrando además reducir el contenido de azúcares solubles en las muestras. Por otro lado, existen varias metodologías para extraer proteínas como la hidrólisis con ácidos o enzimas en donde el objetivo es encontrar el punto isoeléctrico de la proteína para lograr separarla en un precipitado del resto de la solución, diferentes autores indican que las condiciones metodológicas para la extracción de los aislados proteicos determinan la funcionalidad y su estructura, afectando su calidad y consumo. El punto isoeléctrico con el que se trabaje determinará de manera directa el rendimiento y porcentaje de proteína del aislado (**Millán, Pedroche et al. 2001** y **Martínez Augustin and Martínez de Victoria 2006**).

La electroforesis de una dimensión permite determinar el peso molecular de proteínas mediante la migración de iones según la carga y tamaño molecular con una corriente eléctrica constante. La electroforesis de soporte SDS- PAGE permite conocer el tamaño molecular de los complejos proteicos mediante el soporte actuando como una especie de tamiz para el tamaño de moléculas y complejos proteicos, por otra parte la electroforesis bidimensional permite separar los complejos alineados que coinciden en tamaño molecular o punto isoeléctrico y mediante una simplificación de moléculas las separa para caracterizarlas por su densidad (**Hartinger, Stenius et al. 1996**) y **Fernandez, Gharahdaghi et al. 1998**).

Minekus, Alminger et al. (2014) y **Suárez López, Kizlansky et al. (2006)** exponen que la digestibilidad *in vitro* permite la evaluación del metabolismo de una molécula a través del intestino desde que es ingerido hasta el proceso gastrointestinal con las condiciones y enzimas presentes en la digestión, este proceso de digestión simulada *in vitro* consta de tres fases: oral, gástrica e intestinal. La calidad nutricional de una proteína está determinada por la cantidad de aminoácidos presentes así como la digestibilidad de los mismos, debido a que la digestión del nitrógeno ingerido en proteínas no es igual al absorbido por el cuerpo humano; el cálculo de la calidad biológica dependerá del grado de digestibilidad multiplicado por la cantidad de aminoácidos presentes.

La cuantificación proteica permite evaluar el porcentaje de este elemento nutricional primario y ha sido adaptado en diversos aislados proteicos como son los provenientes de semillas oleaginosas; la metodología de Dumas AOAC method 993.13 es comparable con la metodología Kjeldahl para proteínas de origen vegetal que utiliza la cuantificación de nitrógeno orgánico e inorgánico por medio de la calorimetría; además de ser seguro y ecológico por minimizar la utilización de químicos y ácidos para digestión de las muestras como en el método Kjeldahl (**Jung et al., 2003**).

El efecto oxidativo por estrés es conocido por relacionar especies reactivas de oxígeno e hidrógeno provocando enfermedades inflamatorias. En los últimos años se ha relacionado el efecto antioxidante y preventivo de daños por inflamación en compuestos vegetales como tocoferoles, flavonoides y polifenoles. La actividad antiinflamatoria presentada en plantas medicinales se relaciona con la actividad antioxidante; debido a la presencia de compuestos fotoquímicos (responsables del efecto antioxidante) que en ocasiones también presentan actividad antiinflamatoria como es el caso de la manzanilla, túa-túa, artemisa, cañuela, diamela y otras como antiinflamatorias, que son parte de las plantas medicinales de interés industrial (**García Bacallao, Rojo Domínguez et al. 2002**).

Guillén Sans, Guzmán Chozas et al. (1997) y **Martínez- Valverde, Periago et al. (2000)** manifiestan que para prevenir la oxidación de alimentos durante su almacenamiento en la industria alimentaria se usan antioxidantes como el butilhidroxianisol BHA y butilhidroxitolueno BHT aditivos seguros para el consumo en dosis adecuadas sin embargo

existen gran cantidad de alimentos que utilizan antioxidantes y se requiere una mayor diversidad de compuestos de similares propiedades; existe un alto interés en la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales como polifenoles, proteínas, hidrolizados y péptidos para la utilización tanto como suplementos así como para uso industrial. Los autores también indican que las especies vegetales contienen compuestos fenólicos de gran importancia en la dieta debido a que tienen actividad antioxidante. Estos compuestos desarrollan un papel nutricional y funcional, por lo cual representan una alternativa a la utilización de antioxidantes sintéticos añadidos a los alimentos como aceites y grasas. La sustitución de estos antioxidantes por compuestos naturales permite obtener alimentos funcionales con efectos beneficiosos en la salud. Durante muchos años para permitir la comercialización de ciertos alimentos se ha utilizado la evaluación del nivel de peroxidación lipídica (grado de oxidación en relación a peróxidos) usando el ácido 2-tiobarbitúrico para medir la oxidación de lípidos en productos como aceites, grasas, leche, soja, carnes y pescados; la técnica puede validar la utilización de sustitutos de antioxidantes comerciales al comparar el efecto de la sustancia en la retardación de la oxidación en alimentos.

Martínez- Valverde, Periago et al. (2000) señalan que la cuantificación de compuestos fenólicos se ha vuelto de gran importancia para la industria alimentaria en la determinación del porcentaje de fenoles presentes en alimentos y bebidas de gran interés. El método espectrofotométrico permite evaluar mediante los ensayos de Folin-Denis y Folin-Cicalteu determinando el contenido de polifenoles totales en compuestos vegetales y otras matrices alimentarias. La metodología utilizada para evaluar la actividad antiinflamatoria *in-vitro* es determinada mediante la medición espectrofotométrica de diferentes concentraciones del compuesto estudiando en relación al porcentaje de desnaturalización de albumina de huevo y en control con un antiinflamatorio conocido como el Diclofenaco. Los antiinflamatorios son medicamentos ampliamente usados en el mundo. Estos antiinflamatorios pueden clasificarse en aquellos de tipo esteroide y los no esteroides conocidos por AINES. Los AINES son ampliamente usados en la actividad antiinflamatoria porque presentan nuevos efectos secundarios que los esteróicos pero su uso prolongado puede causar úlceras gástricas y duodenales porque inhiben las enzimas COX1, COX2 y prostaglandinas que se encargan de proteger la mucosa gástrica (**Alhakmani, Kumar et al. 2013**).

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN

Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal *in vitro* en proteínas de hoja de *Ilex guayusa*.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Lewis, Kennelly et al. (1991) y **Radice and Vidari (2010)** indican que *Ilex guayusa* es una planta de arbusto endémica de Sudamérica, sus plantaciones se extienden desde el sur de Colombia hasta el norte de Perú, teniendo su origen y mayor producción en la amazonia ecuatoriana en la provincia de Napo. Su utilización por parte de las etnias amazónicas ha sido ancestral desde antes de la colonización debido a su alto contenido de cafeína, por lo que se le atribuye propiedades energizantes y es utilizada en rituales diarios en la región. Existe interés por esta planta por parte de la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria debido a sus propiedades, pero concurren pocos estudios científicos sobre los compuestos fotoquímicos de la Guayusa que permitan comprobar los beneficios atribuidos por los nativos ecuatorianos de la región. Además de ser primordial para la conservación el estudio de plantas ancestrales del Ecuador y el aprovechamiento de sus propiedades.

Radice and Vidari (2010) y **Adas, Elizabeth et al. (2013)** señalan que la utilización de la *Ilex guayusa* industrialmente se ha dado en la preparación de té; mediante una infusión rica en cafeína, tanto en negocios locales de la región amazónica en las ciudades Tena y Macas ; como internacionalmente con el crecimiento en las exportaciones desde Ecuador hacia Norteamérica desde el año 2009.

Los subproductos de la industria en crecimiento de té de *Ilex guayusa* muestran en su composición un alto contenido proteico para ser una hoja de arbusto; esta proteína podría ser

empleada como un ingrediente para elaborar alimentos funcionales; además se espera caracterizar la bioactividad de las proteínas y su contenido de polifenoles.

Rubiano-Sarmiento (2006) cita a los alimentos funcionales de origen vegetal o animal caracterizados por tener compuestos bioactivos además de su contenido nutricional, presentando beneficios para la salud; en ciertos casos los componentes bioactivos han sido distribuidos como productos nutraceúticos en presentaciones concentradas como suplementos dietéticos. Cada vez el interés por la adquisición de estos alimentos es mayor por parte del consumidor. En la industria farmacéutica los alimentos funcionales de origen vegetal presentan una fuente de posibles compuestos farmacológicos inocuos y eficaces de origen natural.

Los análisis nutricionales de la alimentación en el Ecuador en el año 2013 encuentran un consumo deficiente de proteínas, principalmente en la población indígena y mujeres, siendo la principal fuente de la misma el arroz; esta proteína es de baja calidad biológica y aporta en mayor porcentaje carbohidratos. La deficiencia en proteínas puede causar varias enfermedades degenerativas debido a que la dieta diaria tiene mayor aporte de grasas saturadas y carbohidratos para satisfacer el apetito, desencadenando diabetes, hipertensión y enfermedades cardíacas, las principales causas de muertes en el país. La elaboración de alimentos funcionales podría prevenir una mala nutrición y evitar problemas comunes encontrados en salud pública con alto costo para la sociedad. (**Freire, Ramírez et al. 2011**)

Clemente, Millán et al. (2001) señala que la producción de hidrolizados de proteína vegetal tiene mayor demanda debido a la necesidad de alternativas al consumo de proteínas de origen animal. Por ello en el futuro se espera la aplicación de estos hidrolizados en producción de alimentos con efectos bioactivos directos así como en la producción de péptidos específicos para la industria farmacéutica. Los polifenoles presentes en las proteínas muestran actividad antioxidante incluyendo fenoles ácidos y flavonoides; los fenoles ácidos han mostrado inhibir la actividad mutagénica y detoxificación de compuestos metabólicos dañinos conjuntamente con presencia de actividad bactericida. Se ha demostrado que los flavonoides previenen la agregación plaquetaria e inducen relajación muscular, asimismo inhibe el efecto alérgico de sustancias extrañas.

Cañavate 1994 indica que en diferentes plantas medicinales como *Chamomilla recutita*, *Boswellia serrata* y *Schinus therebenthifolius* se les ha conferido efectos antiinflamatorios y se vincula a algunos grupos fitoquímicos especialmente con flavonoides, polisacáridos y fenoles que son responsables de inhibir la inflamación

Por lo que la determinación de la actividad antioxidante, antiinflamatoria, contenido de fenoles y digestibilidad *in vitro* de las proteínas extraídas de las hojas de *Ilex guayusa* permitirán obtener información fiable de carácter científico, permitiendo así crear un subproducto para la industria de alto valor agregado, siendo este beneficioso para los consumidores y fabriles permitiendo generar nuevos productos alternativos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria, contenido de fenoles y digestión gastrointestinal *in vitro* de la hoja de *Ilex guayusa*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la presencia de proteínas solubles de la hoja de *Ilex guayusa* a diferentes pH.
- Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la proteína procedente de la hoja de *Ilex guayusa*.
- Evaluar la digestión gástrica *in vitro* de proteínas de la hoja de *Ilex guayusa* simulando condiciones fisiológicas humanas.
- Identificar la presencia de fenoles totales presentes en la hoja de *Ilex guayusa*.
- Cuantificar la proteína de los aislados proteicos de proteínas de la hoja de *Ilex guayusa* por medio del método DUMAS.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

Investigaciones previas acerca de la caracterización de proteínas extraídas de hojas de *Ilex guayusa* no han sido realizadas o no se encuentran disponibles. La información científica acerca de la proteína de esta planta es escasa. Se ha encontrado textos de su composición en cuanto a componentes antioxidantes, el alto contenido de cafeína de las infusiones y su utilización ancestral en las comunidades autóctonas del Oriente ecuatoriano sin embargo no se han estudiado sus componentes aislados y propiedades. **Cerda Tapuy (2013)** asegura que la composición química de *Ilex guayusa* ha mostrado algunos componentes beneficiosos para la salud como el contenido de cafeína de 2,90 a 3,28 % en peso seco, actividad antioxidante mayor que la presentada por el té verde, asimismo muestra en su composición todos los aminoácidos esenciales para el ser humano. El autor afirma que el alto poder antioxidante retarda el envejecimiento además contiene 15 de los 20 aminoácidos esenciales así como ácido ferúlico, que ayuda a la circulación sanguínea. El interés internacional por bebidas estimulantes presenta una oportunidad para la industrialización de la planta, por ende el crecimiento económico para la zona en donde es cultivada.

Gonçalves, N et al. (1997) señalaron que existen estudios previos de obtención de extractos de proteína vegetales por medio de precipitación acida en el punto isoelectrico, obteniendo un aislado proteico de harina de colza con 86% de proteína. **Vioque, J. (2001)** señala que se han realizado concentrados y aislados proteicos de origen vegetal, para la elaboración de alimentos funcionales. Los métodos comúnmente utilizados para la obtención de estos productos son extracción por hallazgo del punto isoelectrico: con agua, por medio de aplicación de energía térmica o extracción con soluciones hidroalcoholicas. Los aislados proteicos se obtienen comúnmente por precipitación isoelectrica o ultrafiltración.

En este estudio se ha elegido el aislamiento mediante precipitación isoelectrica de *Ilex guayusa*. **Martínez, E et al. (1996)** indicaron haber obtenido la caracterización de aislados proteicos de amaranto obtenidos por precipitación isoelectrica, los mismos que fueron fraccionados a diferentes pH encontrando el mayor rendimiento a pH 8.0 y mayor cantidad de albúminas y globulinas a pH 4.0 y a pH 5.0 respectivamente. Además de correr los fraccionamientos de proteína con electroforesis SDS-PAGE permitiendo conocer el tamaño molecular de las proteínas extraídas. **Avanza, M. & Añon M et al. (2004)** también analizaron los aislados proteicos de la harina de amaranto, teniendo en cuenta la modificación en la estructura de la proteína debido al tratamiento térmico aplicado comúnmente en la industria alimentaria. El análisis se llevó a cabo por medio de electroforesis y en la extracción mostrando un óptimo en rendimiento a pH 4.0 y a pH 4.5 estableciendo las condiciones de extracción a los dos pH establecidos anteriormente por rendimiento y verificando la mayor cantidad proteica con las bandas de electroforesis.

Melo, V (2014) determinó el poder antioxidante del té de hoja de Guayusa recolectada en diferentes puntos geográficos de la amazonia, mediante el análisis fitoquímico conocido como poder antioxidante de reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés). La capacidad antioxidante de la hoja de guayusa mostro el contenido de teobromina en valores de 0.56 mg/g y de cafeína con 16,64 mg/g de peso seco de la hoja fresca.

Swanston-Flatt, D et al. (1989) y **Martínez, A et al. (2006)** revelan información sobre estudios en control de diabetes demostrando que la infusión de guayusa retarda el proceso de hipoglicemia así como la reducción de la hiperfagia , polidipsia, pérdida de peso corporal y hemoglobina glucosilada.

Delaporte, R et al. (2001) indicaron que el estudio de la actividad antiinflamatoria en extractos vegetales han sido de gran interés en los últimos años. Se requiere compuestos nutraceuticos para uso terapéutico pero a su vez que se pueda comprobar su efectividad.

Degen de Arrúa, R & González, Y. (2014) estudiaron 32 plantas de la región Sudamericana encontrando la actividad antiinflamatoria en 32%.de las especies endémicas analizadas. Además señalan la importancia de diferenciar los resultados de los estudios *in vivo* de los *in vivo* debido al cambio de condiciones de absorbancia y digestión de los componentes de las

plantas medicinales. Lo que indica que los extractos de *Ilex guayusa* pueden ser considerados para utilización de sus péptidos con actividad antiinflamatoria.

Los polifenoles forman parte de los constituyentes menores de extractos vegetales y alimentos. Muchos de estos compuestos presentan actividad antioxidante; esta actividad contribuye positivamente a la salud humana; los compuestos fenólicos son también un indicador de calidad biológica debido a que aporta nutricionalmente en forma de oligoelementos como vitaminas (Muñoz, O et al, 2007). Existen varios componentes naturales que previenen la oxidación celular estudiados en diversas frutas (guanábana, uva, chirimoya, guayaba, entre otros), los antioxidantes son moléculas capaces de retardar y prevenir la oxidación de otras. Se reconoce compuestos como vitamina E, vitamina C, albúmina y polifenoles como antioxidantes naturales presentes en diferentes alimentos (Castañeda, B et al. 2008)

2.2 Hipótesis

2.2.1 Rendimiento de la proteína de *Ilex guayusa* aislada a diferentes pH; con 1 y 2 extracciones.

Hipótesis Nula

H₀: El pH y el número de extracciones no tiene influencia en el rendimiento de la proteína de *Ilex guayusa* y en la cuantificación proteica.

Hipótesis Alternativa

H_a: El pH y el número de extracciones tiene influencia en el rendimiento de la proteína de *Ilex guayusa* y en la cuantificación proteica.

2.2.2 Digestión gástrica y duodenal (*in vitro*) de aislados proteicos de *Ilex guayusa*.

Hipótesis Nula

H₀: El aislado proteico de *Ilex guayusa* no es digerido en su totalidad tanto en digestión gástrica y duodenal simulada *in vitro*.

Hipótesis Alternativa

H_a: El aislado proteico de *Ilex guayusa* es digeridos en su totalidad tanto en digestión gástrica y duodenal simulada *in vitro*.

2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante (in vitro) de las proteínas de *Ilex guayusa*.

Hipótesis Nula

H₀: El aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones no presenta actividad antioxidante en relación al antioxidante comercial BHT.

Hipótesis Alternativa

H_a: El aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones presenta actividad antioxidante en relación al antioxidante comercial BHT.

2.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (in vitro) de las proteínas de *Ilex guayusa*.

Hipótesis Nula

H₀: El aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones no presenta actividad antiinflamatoria en relación al antiinflamatorio comercial Diclofenaco.

Hipótesis Alternativa

H_a: El aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones presenta actividad antiinflamatoria en relación al antiinflamatorio comercial Diclofenaco.

2.2.5 Cuantificación de polifenoles presentes en el sobrenadante de la extracción de proteína de *Ilex guayusa*

Hipótesis Nula

H₀: El sobrenadante resultante en la extracción de proteína de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 no tiene presencia de polifenoles expresados en mg de ácido gálico.

Hipótesis Alternativa

H_a: El sobrenadante resultante en la extracción de proteína de *Ilex guayusa* a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 tiene presencia de polifenoles expresados en mg de ácido gálico.

2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1 Variable independiente

Aislados proteicos de *Ilex guayusa*, caracterización de la proteína mediante SDS-PAGE, digestibilidad, cuantificación de polifenoles, actividad antiinflamatoria y antioxidante

- Diferentes niveles de pH para la precipitación de la proteína.
- Número de extracciones.

Actividades biológicas de los concentrados proteicos

- Concentración de los aislados proteicos en actividades antiinflamatoria y antioxidante.

2.3.2 Variable dependiente

Aislados proteicos de *Ilex guayusa*.

- Cuantificación proteica por el método de DUMAS de los aislados a distintos niveles de pH.
- Rendimiento de la proteína de *Ilex guayusa*.

Caracterización de la proteína mediante SDS-PAGE

- Electroforesis SDS PAGE de los hidrolizados a diferentes pH.
- Digestión gástrica y duodenal a pH 4.
- Efecto del pH sobre la digestión de *Ilex guayusa*.

Cuantificación de polifenoles

- Cuantificación de polifenoles a diferente pH de los aislados.

Actividad antiinflamatoria y antioxidante

- Actividad antiinflamatoria en todos los pH de extracción.
- Actividad antioxidante en todos los pH de extracción.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental del proyecto se realizó en el Laboratorio de Alimentos Funcionales BIO-PROPEPTI, la investigación es parte de proyecto de la Universidad IKIAM: “*Value creation along the agro-industrial chain of Guayusa: feasibility study of protection of the Ilex guayusa Loes as a domination of origin and further uses in food and non food markets*” y el Laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

1000 gramos de hoja de Guayusa proveniente de la ciudad del Tena, provincia de Napo con secado con humo, técnica autóctona. Se realizó un molienda general y tamizado con un rendimiento de harina sin fibra de 40%, se dividió los 400 gramos de harina para 5 ensayos por cada pH utilizado con 3 réplicas.

3.1.2 Equipos

- Agitador eléctrico vortex Mixer
- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Cámara fotográfica
- Centrifuga, eppendorf Modelo 5702
- Congelador -80°C Panasonic MDF-U33V-PA
- Congelador Mabe
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD 1D y 2D
- Equipo para cuantificación de proteína DUMAS nitrogen analyzer NDA 701, VELP SCIENTIFICA
- Espectrofotómetro Thermo scientific evolution 201
- Estufa lan incubator Modelo In-010

- Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics Modelo BTP-3ES0VW
- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Micro incubador, Esco, Provolcell Shaking
- pH metro Mettler Toledo
- pH metro Thermo Scientific Orion Star A211
- Placas de agitación VWR Hotplate/stirrer
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470 24
- Kit para electroforesis Bio-Rad
- Unidad destiladora de agua, MiliQ

3.1.3 Reactivos

- Aceite de Ungurahua (oxidado y sin oxidación)
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico 1N.
- Ácido Tiobarbitúrico TBA
- Albumina de huevo
- Azul de bromofenol, # 161-0404, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 161-0158, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 15512-023, Invitrogen
- Bicarbonato de sodio 1 M.
- Buffer 6,8 fosfato
- Coomassie blue R, Blue R-250, # 161-011, BIO-RAD
- Diclofenaco
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) # 161-0302, BIO-RAD
- Enzima proteolíticas para digestión *in vitro*
- Estándar de proteínas, TriColor, # 161-0374, BIO-RAD
- Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- Glicerol, Invitrogen # 15514-011
- Hidróxido de sodio 1 N.
- Hidróxido de potasio 1 M.
- 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- Reactivo de Folin
- Persulfato de amonio (PSA), # 161-0700, BIO-RAD
- Pepsina de mucosa gástrica porcina # P6887-106
- Pancreatina
- Soluciones buffer para pH metro.
- Tris (C₄H₁₁NO₃) # 161-0716, BIO-RAD

- TEMED (N,N,N',N'-Tetra methyl etilen diamina), BIO-RAD
- Yoduro de potasio

3.1.4 Insumos y utensilios

- Agua destilada
- Agua ultra pura MiliQ
- Bandejas plásticas
- Envases de plásticos 500 ml.
- Espátulas
- Guantes de látex
- Gradillas
- Material de vidrio: vasos de precipitación, probeta, embudo, balón de aforo.
- Micropipetas
- Mortero
- Papel absorbente
- Papel de aluminio.
- Papel de filtro 10 μ m
- Parafilm
- Puntas de micropipetas
- Tubos eppendorf (1.5 y 2 ml)
- Tubos para centrifuga de 50 ml

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de harina de *Ilex guayusa*

Se trituro 1000 gramos de hojas secas de *Ilex guayusa* en un procesador de alimentos para proceder a la molienda manual, obteniéndose un polvo con alto contenido de fibra, por lo que se tamizó en *mesh #10*, resultando en un polvo muy fino. El polvo de la hoja se almacenó en un recipiente hermético para evitar el contacto con la humedad.

Figura 1. Hojas de guayusa frescas, secadas tradicionalmente y polvo molido



3.2.2. Aislado de proteínas de *Ilex guayusa*

Se pesó 10 g del polvo obtenido de la harina de *Ilex guayusa* en 1000 ml de agua destilada, se ajustó el pH de solubilización a pH 8.0 con KOH (1N). La mezcla fue agitada en la plancha VWR Hotplate/stirrer por 30 minutos a velocidad constante. Luego la mezcla homogenizada fue centrifugada a 4400 rpm por 30 minutos, El sobrenadante fue filtrado con papel filtro en un embudo de vidrio. El precipitado obtenido de la centrifugación se retuvo para realizar una segunda extracción.

Figura 2. Extracción de proteína



3.2.2.1. Primera extracción

El pH del líquido filtrado se ajustó a los diferentes pH de precipitación (pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0) utilizando HCl (1N). El líquido reposó a 4 °C durante 24 horas. El sobrenadante fue retirado y almacenado para el análisis de compuestos fenólicos. Para disminuir la coloración verde intensa de la clorofila se lavó el precipitado añadiendo 40 ml de agua destilada. La mezcla fue centrifugada durante 20 minutos a 6000 rpm para posteriormente ser filtrado con papel filtro de tamaño de poro de 10 µm. El filtrado fue colocado en envases plásticos de capacidad de 200 ml uno por cada pH de precipitación (pH 3, pH 3.5, pH 4, pH 4.5 y pH 5) con tres réplicas de cada tratamiento. En total se utilizó 15 tratamientos para la primera extracción, para ser llevados al congelador de -80 °C. Posteriormente fue liofilizado en el Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics Modelo BTP-3ES0VW. Finalmente el liofilizado fue pesado para obtener el rendimiento. El liofilizado fue almacenado a 4 °C en 15 recipientes herméticos.

Figura 3. Centrífuga y pH-metro



3.2.2.2. Segunda extracción

El precipitado obtenido de la primera centrifugación se solubilizó a pH 8.0 en 1000 ml de agua destilada. Los pasos de la primera extracción fueron repetidos y en la etapa de pesado fue añadido al obtenido de la primera extracción.

Figura 4. Liofilizador



3.2.3. Análisis proximal

La hoja de *Ilex guayusa* fue sometida a un análisis proximal en el Laboratorio de LACONAL en Ambato utilizando los siguientes métodos y parámetros:

Tabla 1. Metodología utilizada para el análisis proximal

| MUESTRAS | ENSAYOS | MÉTODOS |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Harina de hoja de Guayusa | Humedad | PE15-5.4-FQ. AOAC Ed 19,2012 925.10 |
| | Cenizas | PE14-5.4-FQ. AOAC Ed 19,2012 923.03 |
| | Grasa | MO-LSAI-01.03 |
| | Proteína | PE17-5.4-FQ. AOAC Ed 19,2012 2003.06 |
| | Fibra cruda | INEN 542 |
| | Carbohidratos totales | Cálculo |

Condiciones ambientales: 19.8 °C; 48% HR

Fuente: LACONAL.

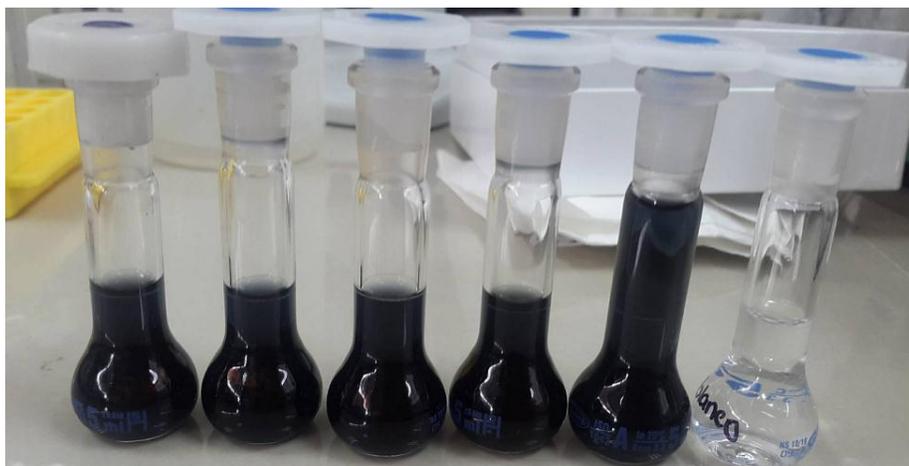
3.2.4. Determinación de fenoles totales (FT)

La concentración de fenoles solubles se midió mediante el método de Folin y Ciocalteu (1927). Esta metodología tiñe los compuestos fenólicos a productos azules por medio de la reducción del complejo fosfowolframato–fosfomolibdato.

Se midió 0.1 ml del sobrenadante de cada pH y un blanco realizado con agua destilada, en balones de aforo de 5 ml de volumen luego se añadió el reactivo de Folin (0,1 ml) y se agitó continuamente durante 3 minutos en un Vortex. Seguido se añadió 2 ml Na₂CO₃ al 7,5%, se aforó a 5 ml con agua destilada, la mezcla se dejó reposar por 60 minutos a temperatura ambiente. La medición se realizó con un espectrofotómetro a la absorbancia de 750 nm.

Para la interpretación de resultados se utilizó una curva de calibración de equivalentes de ácido gálico (GAE, por sus siglas en inglés) con un rango entre 50 a 200 ppm (Vasco, Ruales et al. 2008).

Figura 5. Muestras para determinación de polifenoles con el reactivo Folin



3.3. Caracterización del aislado proteico

3.3.1. Cuantificación proteica

La cuantificación proteica se determinó por medio del método DUMAS descrito por **Bellomonte, Costantini et al. (1987)**. Esta metodología permitió la cuantificación tanto de nitrógeno orgánico como inorgánico, además de minimizar riesgos en el análisis por no poner en contacto al analista con ácidos fuertes como en el método Kjeldahl.

El equipo se encendió y acondicionó por 24 horas. Se realizó una curva de calibración con EDTA con concentraciones de 10 a 100 miligramos en rangos diferencia de 10 mg. Se pesó el polvo de EDTA en los *alumin folds* del equipo y se colocó en el equipo. Luego se pesó 50 miligramos de cada una de las muestras de cada pH y se colocó en el equipo a analizar.

Figura 6. Equipo Dumas



Figura 7. Curva de calibración de EDTA

NDA Dumas Nitrogen Analyser - Calibration

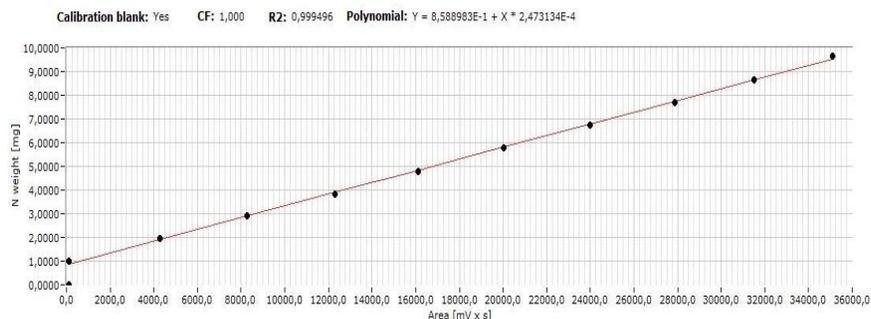


Tabla 2. Curva de calibración con EDTA para el equipo DUMAS

| Number | Standard | Standard Weigth [mg] | Area [mV x s] | N theoretical [mg] | N [mg] | N [%] | Blank [mV x s] | Residual error [mg] | Relative error [%] | Show | Date [dd/mm/yy] |
|--------|-------------------|----------------------|---------------|--------------------|--------|-------|----------------|---------------------|--------------------|------|-----------------|
| 1 | Calibration blank | 0,000 | 108,5 | 0,0000 | 0,8857 | ND | 0,0 | 0,8857 | ND | Yes | 30/05/16 |
| 2 | EDTA | 10,270 | 110,6 | 0,9859 | 0,8862 | 8,629 | 0,0 | -0,0997 | -10,110 | Yes | 30/05/16 |
| 3 | EDTA | 20,210 | 4292,8 | 1,9402 | 1,9206 | 9,503 | 0,0 | -0,0196 | -1,010 | Yes | 30/05/16 |
| 4 | EDTA | 30,210 | 8286,8 | 2,9002 | 2,9083 | 9,627 | 0,0 | 0,0082 | 0,282 | Yes | 30/05/16 |
| 5 | EDTA | 39,840 | 12313,8 | 3,8246 | 3,9043 | 9,800 | 0,0 | 0,0796 | 2,082 | Yes | 30/05/16 |
| 6 | EDTA | 50,010 | 16115,2 | 4,8010 | 4,8444 | 9,687 | 0,0 | 0,0434 | 0,905 | Yes | 30/05/16 |
| 7 | EDTA | 60,300 | 20045,1 | 5,7888 | 5,8163 | 9,646 | 0,0 | 0,0275 | 0,475 | Yes | 30/05/16 |
| 8 | EDTA | 70,220 | 23993,6 | 6,7411 | 6,7928 | 9,674 | 0,0 | 0,0517 | 0,767 | Yes | 30/05/16 |
| 9 | EDTA | 80,370 | 27868,3 | 7,7155 | 7,7511 | 9,644 | 0,0 | 0,0356 | 0,461 | Yes | 30/05/16 |
| 10 | EDTA | 90,100 | 31488,3 | 8,6496 | 8,6464 | 9,596 | 0,0 | -0,0032 | -0,037 | Yes | 30/05/16 |
| 11 | EDTA | 100,640 | 35093,1 | 9,6614 | 9,5379 | 9,477 | 0,0 | -0,1235 | -1,279 | Yes | 30/05/16 |

3.3.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

Para el análisis de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad LifeScience, USA) con un voltaje constante de 200 voltios según la técnica descrita por **Laemmli (1970)** con las siguientes modificaciones en la preparación de las soluciones de los geles.

Se pesaron 10 mg de aislados proteicos de *Ilex guayusa* de cada pH. Se disolvió en 1 ml de agua destilada; 200 µl se tomaron de esta disolución 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). La muestra se incubó en un microincubador a una temperatura de 80°C a 400 rpm por 10 minutos.

Para el análisis de la muestra se utilizó un equipo de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad LifeScience, USA) Tetra System. Los geles utilizados tienen diferentes concentraciones de poliacrilamida con un espesor de 1 mm.

Se usaron 2 geles: el concentrado o superior con 4% de poliacrilamida y el separador o inferior con una concentración del 12%. Se utilizó muestras con presencia de 2- β -Mercaptoethanol (β -ME) para la ruptura de los puentes disulfuro S-S.

3.3.2.1. Gel concentrado

Se utilizó agua destilada, Tris HCL 1M. de pH 8.8, acrilamida (4%), SDS (10%), tetrametiletilenediamina (TEMED), persulfato amónico y PSA (10%).

3.3.2.2. Gel separador

Agua destilada, Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, acrilamida (12%), SDS (10%), TEMED, PSA (10%).

El estándar utilizado fue un Dual Color de Bio Rad # 161-03734 el cual abarca las franjas de 10 a 250 kDa.

Los geles fueron colocados en la cámara de electroforesis vertical con el equipo BIO-RAD con una solución de Buffer 6,8 fosfato por 30 minutos. Finalizada la corrida se colocó el gel en un recipiente con solución Coomassie brilliant blue R-250 durante 24 horas para la tinción de las bandas.

Se destiñó con una solución de 50 % Metanol, 5% Ácido acético y 45% Agua. Se lavó con agua destilada y se realizaron fotografías.

Los geles fueron colocados en la cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD) con un voltaje continuo de 200 V durante 30 minutos sumergidos en buffer de corrida.

3.3.2.3. Electroforesis bidimensional

El aislado proteico de guayusa obtenido a pH 4.0 fue analizado mediante electroforesis bidimensional. Para ello se usaron geles comerciales de la marca BIO-RAD para realizar la separación en función del punto isoeléctrico. Estos geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, por sus siglas en inglés) fueron previamente rehidratados con la solución de rehidratación de BIO-RAD.

La muestra fue diluida a la concentración de 100 μ g/ml en la solución de rehidratación, 200 μ l de esta solución con la muestra fue puesta sobre el gel en la bandeja isoelectroforética (IEF). Se cubrió el gel con 500 μ l de aceite mineral de almendras, se colocó en la bandeja de

la cámara de rehidratación del equipo IEF-BIORAD con un voltaje continuo de 50 V a 20 °C durante 16 horas. Una vez transcurrida la rehidratación se procedió a realizar la separación por isoelectroenfoque. Para ello se retiró el exceso de la solución de rehidratación y se cubrió nuevamente el gel en el aceite mineral. Se procedió a la separación con 50 mA , se realizó una primera corrida de 8000 V, una segunda corrida de 20000 V y finalmente una tercera corrida de 30000 V. Esto ocurrió durante 6 horas y 30 minutos.

Figura 8. Equipo Protean IEF y bandeja de rehidratación



3.3.2.4. Preparación del gel

Se realizó con el gel de poliacrilamida al 12%, se colocó la tira IPG sobre la caja plástica del gel armado. Se rellenó de agarosa 1.5 ml, se colocó en el pocillo 150 μ l del kit de peso moleculares. La agarosa se dejó solidificar durante 5 minutos, el gel se colocó en la cubeta, se añadió el buffer y se realizó la corrida a 200 V. Posteriormente se tinturó y se lavó como el gel de una dimensión.

Figura 9. Cámara de electroforesis BIO-RAD



3.3.3. Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* en proteína

3.3.3.1. Digestión gástrica

La técnica utilizada fue la descrita por **Jiménez Saiz (2012)**, a través de la cual se simuló el proceso de digestión gástrica y duodenal *in vitro*, emula la digestión fisiológica del cuerpo humano.

Para ello se ensayó a pH 3.2 que simula el pH del estómago de niños no lactantes.

Para realizar la digestión gástrica se pesaron 10 mg del aislado de proteínas de guayusa obtenido a pH 4.0. El aislado fue disuelto en una solución llamada fluido gástrico simulado (SGF) constituida por NaCl 0.35 M, seguidamente se ajustó a un pH 3.2 con HCl 1N.

Finalmente se agregaron 50 µl de la solución de pepsina en una concentración de 200 U/mg. La digestión se llevó a cabo en un Micro incubador, Esco Provolcell Shaking a 37°C por 2 horas y 450 rpm. Para inactivar la reacción enzimática al final de la incubación se colocó 200 µl de bicarbonato de sodio 1 M. Posteriormente se calentó la mezcla a 80 °C durante 10 minutos a 450 rpm para terminar con la reacción. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el análisis de electroforesis SDS-PAGE.

3.3.3.2. Digestión duodenal

Se mezclaron 1 ml del hidrolizado de la fase gástrica con 1 ml de la solución de pancreatina a 100 U/mg en relación 1:1 vol. /vol. La solución de pancreatina contiene una mezcla de enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, colipasa, lipasa) además contenía sales biliares 10 nM y CaCl₂ 1.5 Mm, el pH fue ajustado a pH 7.0. Las muestras fueron sometidas a incubación con agitación. Para esto se utilizó un Microincubador ESCO.

Las muestras fueron incubadas a 37°C durante dos horas con 450 RPM. Una vez transcurrido ese tiempo la reacción de las enzimas fue detenida con calor a 90°C durante 5 minutos. Después las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

3.3.4. Actividad antioxidante de los aislados proteicos (Método TBARS)

La técnica que se utilizó para el análisis fue descrita por **Guzmán-Chozas, Vicario et al. (1997)**. Se trabajó con las siguientes concentraciones: 100 µg/ml; 200 µg/ml; 500 µg/ml y

1000 µg/ml de aislado proteico disuelto en agua destilada. Se colocó como estándar aceite de Ungurahua oxidado (500 µl) con la muestra (500 µl) en relación 50:50.

El aceite de Ungurahua y la muestra se calentaron a 28 °C por 8 horas en una microincubadora. Luego del calentamiento se añadió 1 ml TBA 0.05 M, la solución de TBA se preparó con ácido acético glacial al 90%. Posteriormente se calentó la muestra a 95°C por 60 minutos, al finalizar se enfrió en agua por 5 minutos. Se leyó la muestra con una absorbancia de 532 nm con la ayuda de un espectrofotómetro de la marca Thermo scientific evolution 201.

Se repitió el proceso para un blanco, aceite de Ungurahua no oxidado y con concentraciones de BHT 100, 200, 500 y 1000 µg/ml con aceite de Ungurahua oxidado.

3.3.5. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Se utilizó la técnica descrita por **Alhakmani, Kumar et al. (2013)** con modificaciones en las concentraciones de las muestras. Las concentraciones de proteína de *Ilex guayusa* de todos los pH fueron 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml y un control positivo de Diclofenaco de las mismas concentraciones que la proteína; tomando en cuenta que cada pastilla recubierta tiene una concentración de 50 mg del compuesto activo.

Se colocó en tubos de ensayo 2 ml de control de Diclofenaco de cada concentración y de cada pH del aislado de proteína de guayusa: (pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0). Se añadió 2 ml de albúmina de huevo y 2.8 ml de solución fosfato de pH 6.8 y se mezcló. Se colocó 2 ml de la mezcla en tubos eppendorf de 2 ml. Se llevó a la microencubadora por 15 minutos a 27°C seguido de 10 minutos a 70 °C. Se diluyó 1 parte de la solución en 3 de agua destilada. Las muestras fueron leídas a 660 nm en el espectrofotómetro. Cada concentración se realizó por triplicado y un blanco con agua destilada, en total 75 tubos de ensayo.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los rendimientos de los diferentes pH se utilizó un ANOVA de dos factores, donde el factor A fue el número de extracciones con sus niveles a0: 1 extracción y a1: 2 extracciones; y en el factor B los diferentes pH de precipitación de proteína con sus

niveles b0: pH 3.0; b1: pH 3.5; b2: pH 4.0; b3: pH 4.5 y b4: pH 5.0 Posteriormente se utilizó la prueba de comparación múltiple de TUKEY en el programa GRAPPHAD PRISM.

Se aplicó el mismo análisis para la actividad antiinflamatoria y antioxidante con el factor A: concentraciones de la proteína con los niveles a0: 100; a1:200; a2:500 y a3 1000 µg/ml y el factor B: pH de la proteína con sus niveles b0: pH 3.0; b1: pH 3.5; b2: pH 4.0; b3: pH 4.5 y b4: pH 5.0 En ambos análisis se aplicó la prueba de DUNNET, se comparó con un patrón en el caso de la actividad antiinflamatoria con Diclofenaco y en el caso de la actividad antioxidante con BHT. La cuantificación de polifenoles se analizó con un ANOVA de un solo factor con una posterior prueba de comparación múltiple de TUKEY.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Análisis proximal

Se realizó el análisis proximal la harina de *Ilex guayusa* dispuesto en la *Tabla 3* encontrando entre los componentes de mayor porcentaje: carbohidratos con 61% seguido de proteína con 18.2%; un porcentaje proteico alto para ser una planta de arbusto a comparación de diferentes plantas medicinales como se indica en la *Tabla 4* en donde el loto indio contiene 10.60% de proteína siendo de los más altos porcentajes de plantas medicinales originarias de India estudiadas por (Indrayan, A at al. 2005).

Tabla 3. Análisis proximal de la harina de *Ilex guayusa*

| Componentes | % |
|--------------------------|-------------|
| Cenizas | 6.67 |
| Proteína (Nx6.25) | 18.2 |
| Humedad | 6.59 |
| Grasa | 3.97 |
| Fibra cruda | 3.58 |
| Carbohidratos totales | 61.0 |
| Cenizas | 6.67 |

Fuente: Análisis elaborado de LACONAL

Por otra parte **Barquero, A (2007)** indicó que la Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales y el estudio de sus posibles aplicaciones mediante la investigación científica, señaló también el gran interés de la extracción de proteínas de plantas medicinales con fines terapéuticos, logrando ser una producción diversificada gracias a la biotecnología ya que ofrece la adquisición de drogas a precios accesibles. Siendo la guayusa una posible fuente de aislados con actividad antioxidante y antiinflamatoria en sus péptidos activos.

Tabla 4. Información nutricional de plantas medicinales

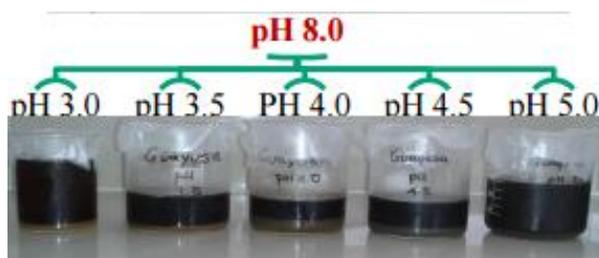
| Componentes | Plantas medicinales | | | |
|-----------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|
| | <i>N. nucifera</i> | <i>E. ribes</i> | <i>E. jambolana</i> | <i>A. heterophyllus</i> |
| | (loto indio) | (zarzaparrilla) | (pésjua) | (yaca) |
| | % | % | % | % |
| Cenizas | 4.5 | 6.70 | 22.32 | 8.20 |
| Proteína | 10.60 | 2.42 | 8.20 | 5.70 |
| Humedad | 10.50 | 5.23 | 12.45 | 57.90 |
| Grasa | 1.93 | 3.61 | 1.26 | 2.50 |
| Fibra cruda | 2.70 | 5.32 | 15.14 | 7.20 |
| Carbohidratos totales | 72.17 | 82.04 | 55.77 | 10.70 |

Fuente: Indrayan, A et al. (2005).

4.1.2. Aislamiento de la proteína de *Ilex guayusa*

Se utilizó un pH 8.0 para la solubilización de la harina de guayusa con una relación de 100 gramos en 1000 ml de agua destilada. Se utilizó KOH 1M para ajustar el pH con agitación y se observó en general estabilidad en la solución, el proceso se realizó durante 30 minutos; se evaluó el rendimiento según el pH de precipitación pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0. **Martínez, E & Añón, M. (1996)** indicaron que el rendimiento de aislados proteicos en amaranto dependió de la combinación de las condiciones de pH tanto de extracción como de solubilización. Adicionalmente **Wang, M et al. (1999)** corroboró que un pH de solubilización demasiado alcalinos (mayores a pH 8.0) pueden causar desnaturalización e hidrólisis de proteínas, incrementar la reacción de Maillard obteniendo productos de coloración oscura, así como el incremento de la extracción de componentes no proteicos reduciendo la calidad del aislado obtenido.

Figura 10. Extracción a diferentes pH

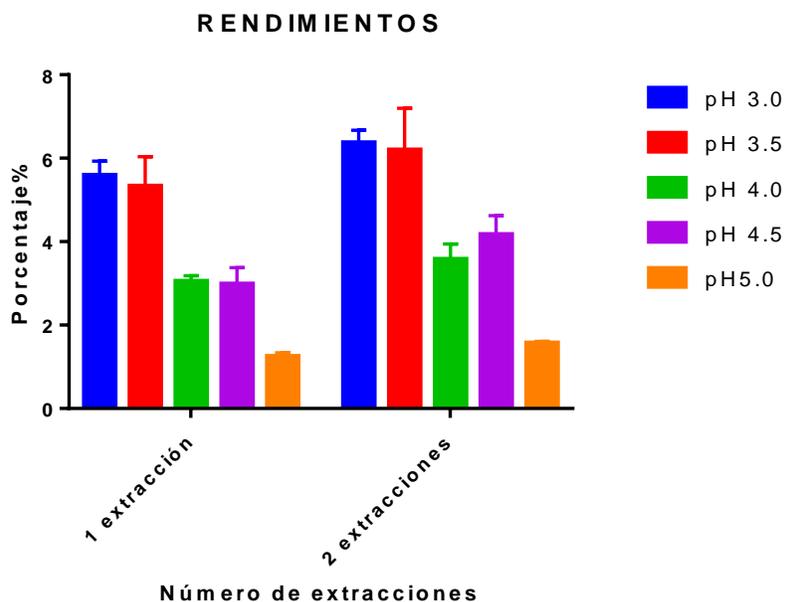


El mayor rendimiento se observó a pH 3.0 y pH 3.5 como se indica en la *Tabla 5* con valores porcentuales de 5,59% y 5,33% respectivamente. El ANOVA de dos variables determinó que existió influencia del pH y del número de extracciones, sin embargo no existe interacciones de influencia en el rendimiento entre ambos factores. En el análisis estadístico de comparación múltiple se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas para la primera y segunda extracción en los pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0 y pH 5.0. Siendo en el pH 4.5 en donde aumentó el rendimiento significativamente de 2.98% a 4.17% en la segunda extracción. En la *Figura 11* se observó que existe mayor rendimiento a pH ácidos con un punto isoeléctrico de la proteína extraída de *Ilex guayusa* estimada entre pH 3.0 y pH 3.5.

Tabla 5. Promedio de rendimientos de aislados proteicos de *Ilex guayusa* con una y dos extracciones.

| pH | Extracción | Porcentaje | DS | V |
|-----|------------|------------|------|------|
| 3.0 | 1 | 5,59 | 0,34 | 0,08 |
| | 2 | 6,37 | 0,30 | 0,06 |
| 3,5 | 1 | 5,33 | 0,70 | 0,33 |
| | 2 | 6,20 | 1,00 | 0,67 |
| 4.0 | 1 | 3,05 | 0,14 | 0,01 |
| | 2 | 3,58 | 0,37 | 0,09 |
| 4.5 | 1 | 2,98 | 0,39 | 0,10 |
| | 2 | 4,17 | 0,46 | 0,14 |
| 5.0 | 1 | 1,25 | 0,08 | 0,09 |
| | 2 | 1,57 | 0,04 | 0,12 |

Figura 11. Comparación de rendimiento en diferentes pH: pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH4.5 y pH 5.0. Con una y dos extracciones.



4.1.3. Cuantificación proteica con el método DUMAS

Tabla 6. Cuantificación proteica de asilados proteicos de *Ilex guayusa*.

| pH del aislado proteico | Proteína (%) |
|-------------------------|--------------|
| 3.0 | 64.575 |
| 3.5 | 35.843 |
| 4.0 | 35.332 |
| 4.5 | 31.122 |
| 5.0 | 34.262 |

La cuantificación proteica se realizó con el método DUMAS, este método permitió determinar el contenido de proteína por medio de la combustión de la muestra y la medición de los gases nitrogenados tanto orgánicos como inorgánicos.

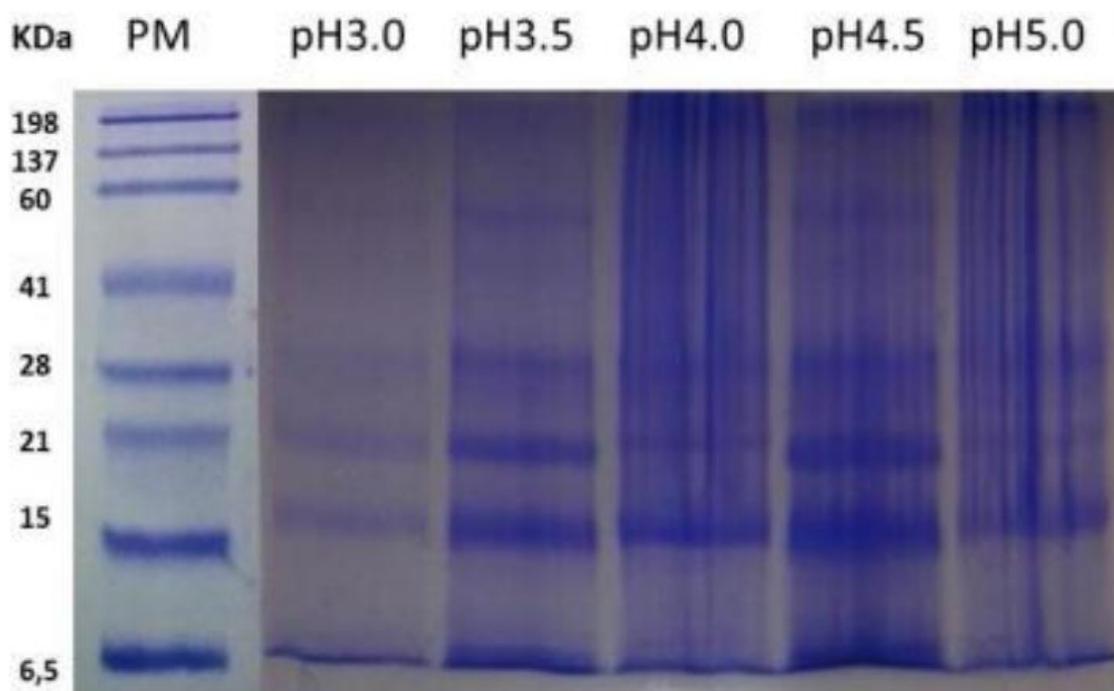
Los resultados mostraron el mayor contenido proteico en el aislado a pH 3.0 de extracción con 64.575% de proteína como se observó en la *Tabla 6*. Este dato se corroboró con el mayor

rendimiento en el mismo pH 3.0; los demás pH de precipitación mostraron contenidos similares entre sí: para el pH 3.5, pH 4.0 y pH 4.5 se obtuvieron valores de 35.843%, 35.332% y 31.112% de proteína en los aislados respectivamente, lo que mostró que el pH en donde las proteínas se precipitaron en mayor cantidad es en el pH 3.0 que se relaciona con la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas aisladas de guayusa.

4.1.4. Electroforesis

4.1.4.1. Electroforesis unidimensional

Figura 12. Gel de electroforesis *Ilex guayusa* en presencia de 2-β mercaptoetanol a pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH4.5 y pH 5.0 en agua con 12% de acrilamida.



Las bandas marcadas se encontraron entre 6.5 kDa y 60 kDa. Se observó bandas muy marcadas para 6.5 kDa, 15 kDa, 21 kDa, 28 kDa y 60 kDa. Para el pH 4.0 y pH 4.5 la tinción fue más fuerte que para el pH 3.0, pH 3.5 y pH 5.0 lo que indicó una mayor presencia proteica en la tinción a pH 4 y pH 5. El análisis SDS PAGE de los aislados de guayusa fue realizado en diferentes pH de disolución en agua destilada como se observa en la *Figura 12*.

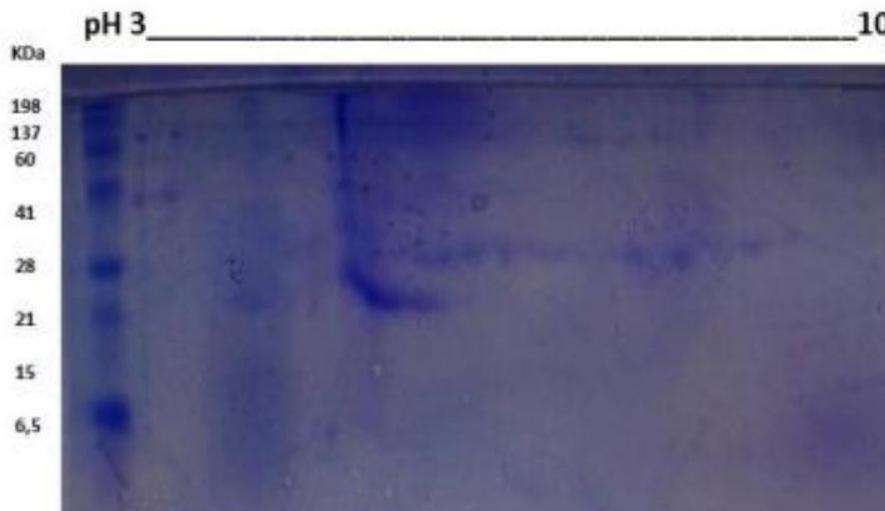
López, L (2012) y **Cantú, D (2002)** determinaron el perfil electroforético para hojas de *Pentacalia nitidao* (conocida como Guasquin), hojas de girasol y otras plantas medicinales.

Se observó separación de proteínas desde 6 kDa hasta 104 kDa, las bandas de menor peso molecular coinciden en el análisis de *Ilex guayusa*. Ambos autores coinciden que las hojas tienen proteínas de bajos pesos moleculares en comparación con semillas y oleaginosas. Además señalaron la importancia de la etapa de floración en la que se encontró la hoja al momento de la extracción proteica.

Blanco-Labra, A (2000) manifiesta que las proteínas de bajo peso molecular 6-22 kDa están relacionadas con la defensa natural de las plantas en especial en tejido vegetativo como hojas y se relacionan con la inhibición de amilasas y proteasas y por lo general son proteínas de reserva, existen una variedad de proteínas clasificadas en esta función como la tripsina. **Báez, F& González, O (2000)** también determinó que las lecitinas presentes en plantas tienen un peso de 30-35 kDa, las mismas que están relacionadas con la eliminación de glicoproteínas por lo que se puede relacionar con la actividad antidiabética que se ha estudiado para *Ilex guayusa*, además de eliminar células tumorales con efectos antioxidantes debido a las proteínas de defensa natural.

4.1.4.2. Electroforesis bidimensional

Figura 13. Gel bidimensional a pH 4.0 de los aislados de proteína de *Ilex guayusa*

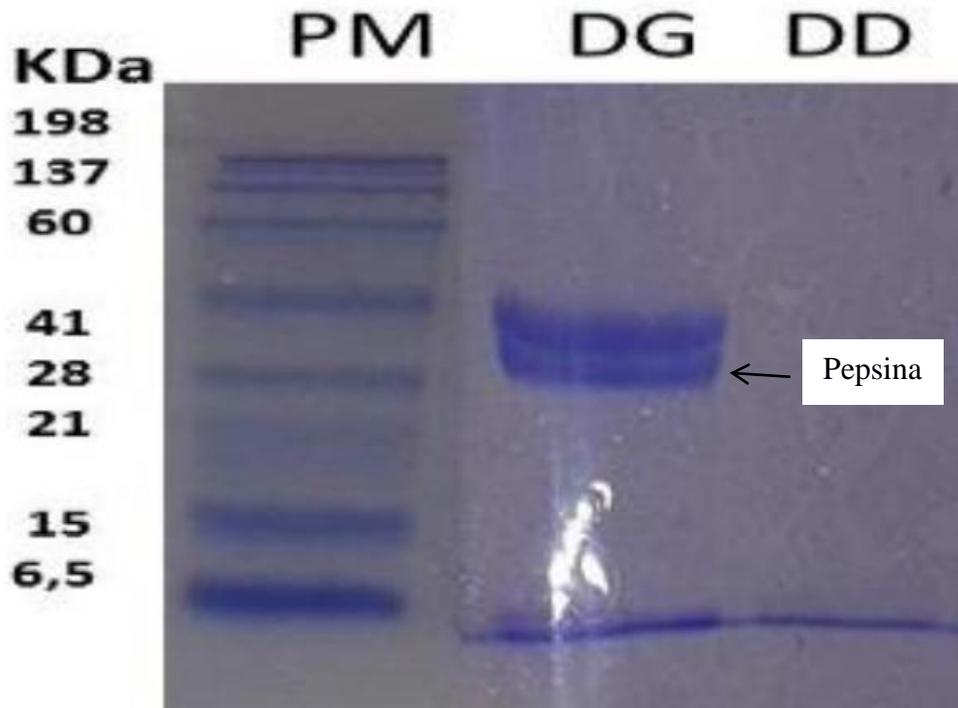


La *Figura 13* mostró el perfil de peso molecular y punto isoeléctrico del aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 4.0, se utilizó este pH debido a que es el que mostró mayor tinción en la electroforesis unidimensional por ende mayor cantidad de proteína. Se observó que las bandas se separaron desde el pH 4.0 a pH 5.0 con una mayor tinción en este intervalo de pH;

se observó bandas en 30 kDa como se observó en el SDS-PAGE de una dimensión con diferentes puntos isoeléctricos, lo que indicó la existencia de isómeros de la proteína.

4.1.5. Digestión *in vitro*

Figura 14. Gel de poliacrilamida de la digestión gástrica y duodenal *in vitro* del aislado a pH 4.0 de *Ilex guayusa*



La Figura 14 evidenció la simulación *in vitro* del aislado de proteína de *Ilex guayusa* a pH 4.0 todas las proteínas fueron totalmente hidrolizadas en condiciones gástricas y duodenales, se observó bandas no digeridas en la etapa gástrica con pepsina a pH 3.2 pero se concluyó que dichas bandas correspondieron a la pepsina presente en la digestión simulada, la misma que desapareció en la etapa duodenal con pancreatina y pH 7.0.

Lo que indicó que el aislado proteico de *Ilex guayusa* fue fácilmente digerido en condiciones simuladas del tracto intestinal, **Juárez-Roldán, A & Jiménez-Munguía, M (2011)** y **Jadan, C. (2013)** señalaron el modelo convencional de digestibilidad *in vitro* como el procesos que simula la digestión en tres fases la gástrica, entérica y entérica fecal como se indica en la Figura 15. Los autores indicaron también las condiciones óptimas para recrear el proceso digestivo en sus tres fases por lo que el procesos gástrico se simuló a pH 3.2 con

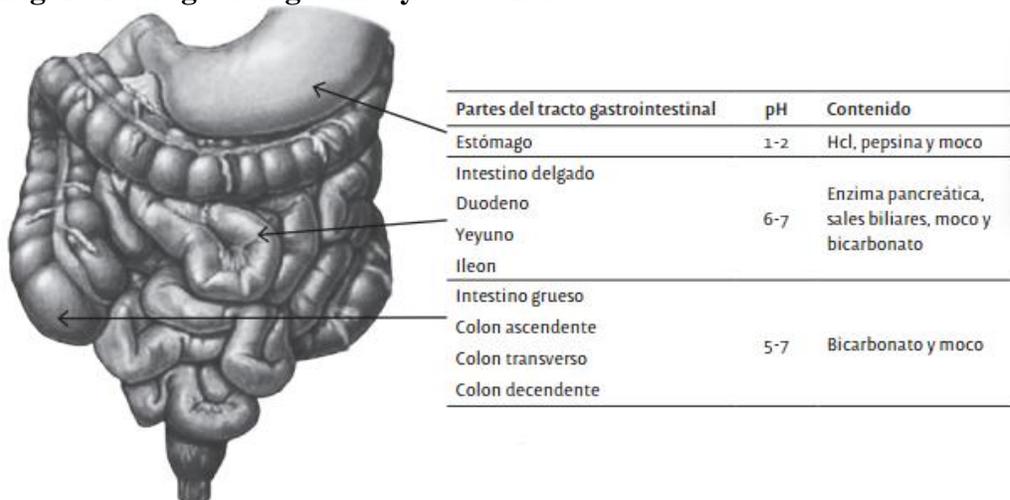
la presencia de pepsina. Posteriormente se procedió a simular el proceso entérico fecal a pH 7.0, con la presencia de pancreatina y mayor temperatura. Esta metodología permitió acercarse a la concentración de ácidos y enzimas del estómago humano, este proceso permitió evaluar la descomposición de proteínas ya que en estas condiciones el epitelio del estómago puede absorber los nutrientes para luego ser transportados en el torrente sanguíneo. Se utilizó el pH de 4.0 que simula el tracto intestinal infantil, se eligió estas condiciones debido a que son menos agresivas. La proteína de la guayusa es digerible en este pH por lo que es un

indicativo que se puede digerir en el tracto digestivo de adulto y de un estómago con patologías de acidez.

Martínez O. & Martínez E. (2006) señalaron que la calidad proteica está determinada por el perfil de aminoácidos y la digestibilidad, indicaron también que en especial la digestibilidad permite conocer el sistema de metabolización de la proteína. Por lo que la proteína aislada de *Ilex guayusa* permite la degradación de las proteínas en el intestino y puede ser asimilada de mejor manera. **World Health Organization (1985)** propone evaluar el porcentaje de aminoácidos multiplicado por la digestibilidad en el tracto gastrointestinal, a este valor se lo denominó como computo de aminoácidos corregido con la digestibilidad de la proteína (PDCAAS por sus siglas en inglés) y es un valor reconocido mundialmente para proteínas destinadas a la nutrición humana. En el caso de los aislados proteicos de *guayusa* la digestibilidad no puede ser evaluada en este estudio con PDCAAS debido a la metodología, pero es corroborada con electroforesis.

Señalan a la digestibilidad y análisis SDS-PAGE como técnicas de análisis recomendadas en el caso de los aislados proteicos de las hojas de *Cannabis sativa L.*; **Wang, X. et al. (2008)** indicó que la digestibilidad de la proteína fue de 91% (PDCAAS) debido a que las proteínas encontradas tuvieron bajo peso molecular de 10 -120 kDa; lo que se puede comparar con los aislados proteicos *Ilex guayusa* debido a que las proteínas encontradas oscilan en valores similares 6-60 kDa.

Figura 15. Digestión gástrica y duodenal



Fuente: Juárez-Roldán, A & Jiménez-Munguía, M 2013.

4.1.6. Cuantificación de polifenoles

Figura 16. Contenido de polifenoles en los sobrenadantes de los diferentes pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 de *Ilex guayusa*

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES SOLUBLES

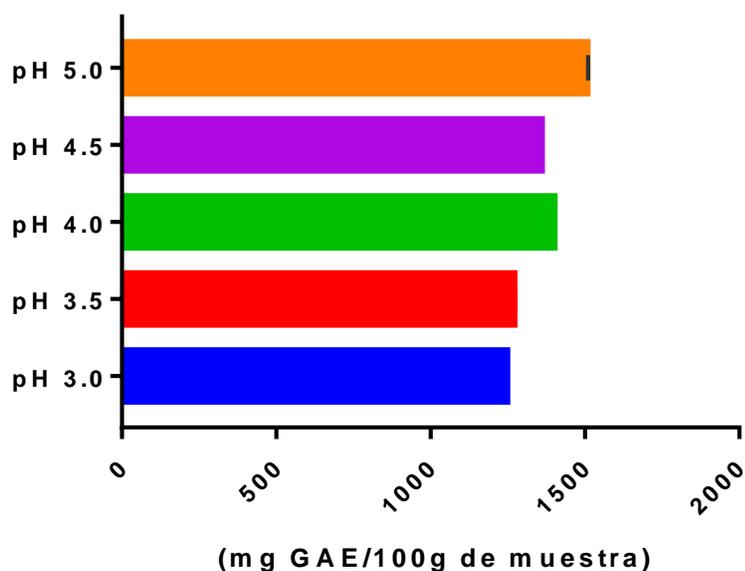


Tabla 7. Contenido de polifenoles totales solubles (mg GAE/100g de muestra)

| pH | mg GAE/100 g de muestra | DS | V |
|--------|-------------------------|------|------|
| pH 3.0 | 1248,61 | 1,12 | 1,25 |
| pH 3.5 | 1271,79 | 0,84 | 0,70 |
| pH 4.0 | 1401,36 | 0,28 | 0,08 |
| pH 4.5 | 1360,31 | 1,12 | 1,25 |
| pH 5.0 | 1508,03 | 2,51 | 6,32 |

La evaluación de los resultados mostró diferencias significativas como se muestra en la Figura 16 para los diferentes pH, en la prueba de comparación múltiple se mostró a los pH

con mayor contenido de polifenoles. pH 4.0, pH 4.5 y pH 5.0 con valores de 1401.36, 1360.31 y 1248.61 mg GAE/ 100 g. de muestra respectivamente.

Se encontró el mayor contenido de polifenoles en el pH 5.0 con 1248,61 mg GAE/ 100 g, el contenido de polifenoles del sobrenadante en general es más alto cuando la coloración es más oscura es decir a medida de que el pH es más básico. La *Tabla 7* indica la cantidad de polifenoles presentes en los sobrenadantes de la extracción de proteínas en los diferentes pH.

Estudios comparativos muestran diferentes datos de los extractos de *Ilex guayusa* **Villanueva-Tiburcio, J. E et al. (2010)** y **Naranjo, A (2013)** señalaron valores para la cascara de *Myrciaria dubia* y para las flores de Jamaica de 770 y 291 mg de GAE / 100 gramos de muestra respectivamente. Al ser comparado con los valores obtenidos de los sobrenadantes de *Ilex guayusa* muestran que la guayusa posee valores altos, indicando un potencial uso comercial como aditivo alimentario debido al poder antioxidante de los polifenoles. Los autores también señalaron que los polifenoles vegetales presentes como ácido gálico en la naturaleza tienen aplicaciones importantes como antioxidantes naturales, además de ser industrializados como colorantes. **Rojano, B (2011)** mostró también que los extractos de alimentos ricos en polifenoles pueden ser utilizados en la industria cárnica y láctea como colorante y antioxidantes evitando la peroxidación lipídica. La guayusa podría ser utilizada como colorante en la industria alimenticia, el extracto tiene un color verde oscuro e intenso.

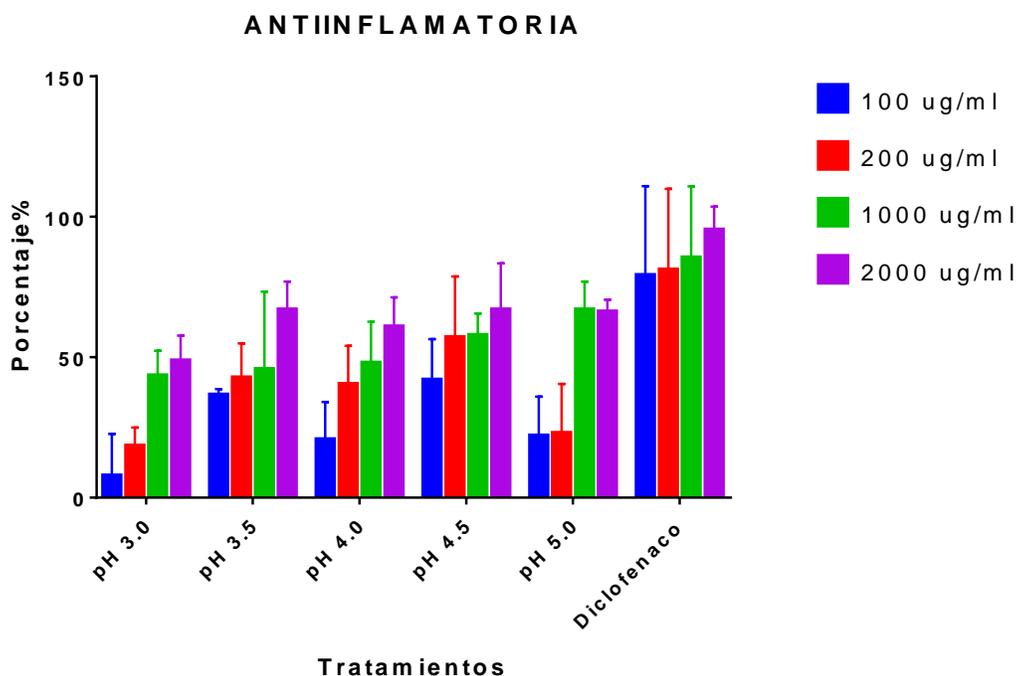
Como ingrediente de alimentos funcionales los aislados proteicos de guayusa pueden formar parte de alimentos funcionales, debido a que el alto porcentaje de fenoles. **Hervert, D. (2011)** indicó una relación aproximada entre la cantidad de polifenoles ingeridos y el poder antioxidante indicando una ingesta 180.9 ± 12.5 mg de ácido gálico/persona/día con una capacidad antioxidante mayor a 1000 μ mol de trolox (antioxidante con aplicaciones biológicas para reducir el estrés oxidativo o daño, equivalente a la vitamina E) por día por cada persona evaluada. Los polifenoles contenidos en los sobrenadantes de la extracción de *Ilex guayusa* contienen la cantidad de antioxidante necesaria para considerarse beneficiosos para la salud.

4.1.7. Actividad antiinflamatoria

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de *Ilex guayusa* en comparación al control negativo de albúmina de huevo.

| pH | Concentración (µg de proteína) | Porcentaje de inhibición de inflamación | DS | V |
|--------------------|--|--|-----------|------------|
| 3.0 | 100 | 7,576 % | +/-0,007 | 2,9556E-05 |
| | 200 | 18,182 % | +/-0,003 | 0,000006 |
| | 500 | 43,182 % | +/-0,004 | 1,0667E-05 |
| | 1000 | 48,485 % | +/-0,004 | 1,0889E-05 |
| 3.5 | 100 | 36,364 % | +/-0,001 | 6,6667E-07 |
| | 200 | 42,424 % | +/-0,006 | 2,0222E-05 |
| | 500 | 45,455 % | +/-0,012 | 0,00010067 |
| | 1000 | 54,667 % | +/-0,005 | 1,3556E-05 |
| 4.0 | 100 | 20,455 % | +/-0,006 | 0,000024 |
| | 200 | 40,152 % | +/-0,006 | 2,4889E-05 |
| | 500 | 47,727 % | +/-0,007 | 2,8667E-05 |
| | 1000 | 60,606 % | +/-0,005 | 1,4889E-05 |
| 4.5 | 100 | 41,667 % | +/-0,007 | 2,8222E-05 |
| | 200 | 56,818 % | +/-0,010 | 0,000062 |
| | 500 | 57,576 % | +/-0,004 | 8,2222E-06 |
| | 1000 | 66,667 % | +/-0,007 | 3,6222E-05 |
| 5.0 | 100 | 21,742 % | +/-0,006 | 2,6242E-05 |
| | 200 | 22,727 % | +/-0,008 | 4,0667E-05 |
| | 500 | 67,889 % | +/-0,005 | 1,3556E-05 |
| | 1000 | 69,909 % | +/-0,002 | 2,6667E-06 |
| Diclofenaco | 100 | 41,871 % | +/-0,003 | 1,2E-05 |
| | 200 | 44,549 % | +/-0,074 | 5,4E-03 |
| | 500 | 51,852 % | +/-0,002 | 3,0E-06 |
| | 1000 | 82,716 % | +/-0,001 | 1,3E-06 |

Figura 17. Actividad antiinflamatoria de los aislados de *Ilex guayusa* y del Diclofenaco comercial en diferentes pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0; en distintas concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml.



En la *figura 17* se puede observar el efecto antiinflamatorio del control positivo Diclofenaco 1000 µg/ml el que presentó 82.719% de actividad antiinflamatoria *in vitro*. El aislado de guayusa obtenido a pH 4.5 presentó un 66.667% de actividad antiinflamatoria siendo la más alta para la concentración de 1000 µg/ml. Se observó que el aislado de guayusa obtenido a pH 5.0 a la concentración de 500 µg/ml presentó un 67.889% de actividad. Este valor es el porcentaje de inhibición de la inflamación más alto de todos las muestras teniendo en cuenta que la concentración de 500 µg/ml no es la más alta. La prueba de comparación múltiple se realizó con las diferentes muestras con el control positivo (Diclofenaco). La *Tabla 8* indica el porcentaje de actividad antiinflamatoria de los diferentes pH de los aislados de *Ilex guayusa*. Las muestras analizadas se tomaron de los pH de los aislados: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0, en diferentes concentraciones: 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. Como el método es espectrofotométrico se comparó las lecturas con un control positivo de Diclofenaco, un antiinflamatorio no esteroide comercial conocido, las concentraciones fueron las mismas que las utilizadas con las muestras de los aislados proteicos de guayusa. Ambas muestras los aislados de proteína y el Diclofenaco se midieron por medio de la espectrofotometría con una

absorbancia de 660 nm en un espectrofotómetro de marca Thermo scientific evolution 201. El efecto anti-inflamatorio de todas las muestras ensayadas en este estudio fueron directamente proporcional a la concentración lo que indica que a mayor concentración mayor actividad antiinflamatoria presentada por los péptidos activos de los aislados proteicos de *Ilex guayusa*.

El control positivo Diclofenaco es comparado por ser de clase no esteroica por lo que **Calvo-Alén, J 2013** señaló la existencia de dos clases de antiinflamatorios: los esteroides que tienen efectos secundarios y son de estricto control médico; la otra clase de antiinflamatorios son de tipo AINES o antiinflamatorios no esteróicos estos medicamentos inhiben la acción enzimática del COX1 y COX2 ambas enzimas actúan por medio de la prostaglandina , la inhibición de esta enzima permiten que el epitelio del tracto intestinal se lastime; por ello en antiinflamatorios regulares como Diclofenaco e Ibuprofeno deben ser ingeridos en conjunto con protectores gástricos. El ensayo se realizó en albumina de huevo debido a que las proteínas séricas son albúminas en un 95%. Existe gran interés por encontrar antiinflamatorios que no lastimen el tracto digestivo.

Los extractos vegetales como la guayusa y otras plantas medicinales con efectos antiinflamatorios son apreciados nutricionalmente no solo por su aporte de aminoácidos esenciales sino también debido a sus propiedades funcionales dentro de las matrices alimentarias. Existe una nueva industria que emerge de la utilización de biopéptidos, estos componentes se encuentran inactivos y son pequeñas partes de la proteína que con hidrólisis o la digestión humana pueden ser beneficiosos para la salud. Entre sus actividades destacan la actividad antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, entre otras; convirtiéndose en parte de los alimentos funcionales con beneficios para la salud (**Vioque, J. 2000**)

Se corrobora el efecto antinflamatorio con el contenido de polifenoles de los extractos de guaysua. Algunos estudios como **García, L (2002)** indican los posibles componentes responsables de la actividad antiinflamatoria, el autor afirma que existen compuestos antioxidantes como polifenoles, tocoferol y flavonoides encontrados en extractos de plantas medicinales responsables de la actividad antiinflamatoria. Debido a ello se puede atribuir esta actividad a los extractos de *Ilex guayusa* ya que se comprobó la existencia de compuesto

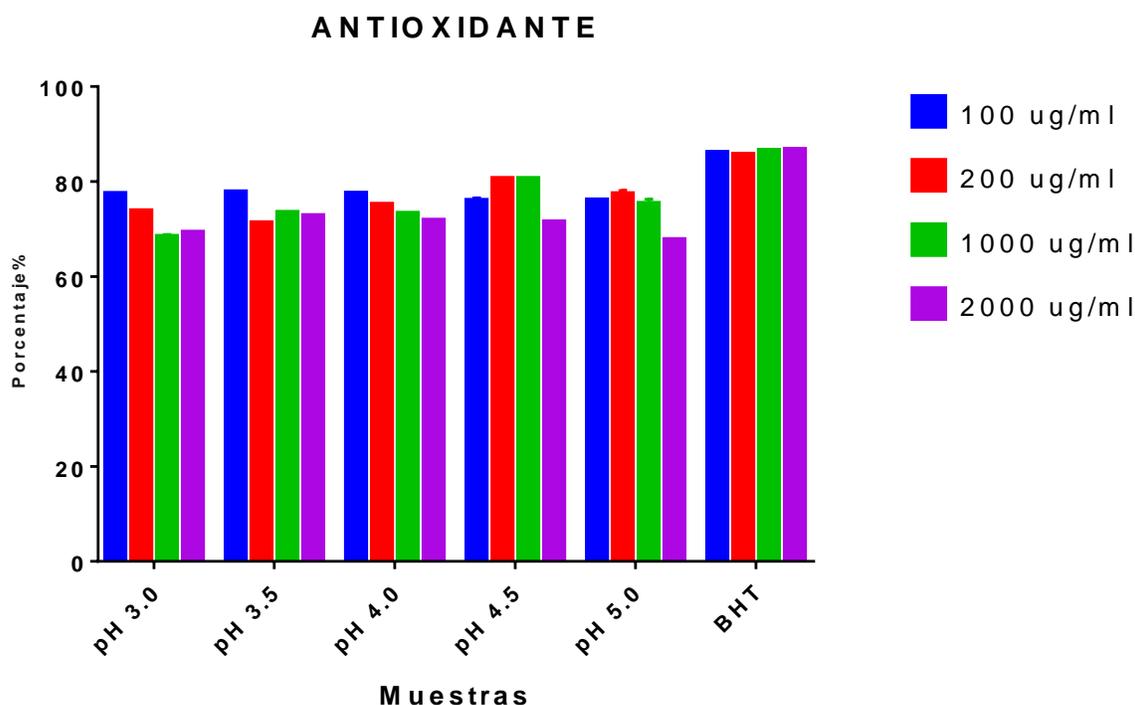
fenólicos en los sobrenadantes de los diferentes pH. **Arranz, E (2013)** indicó también haber identificado dos componentes de importante actividad antiinflamatoria que son el ácido carnósico y carnosol en extracto proteico de romero y manifiesta haber logrado una mayor estabilidad de estos componentes con encapsulación en caseína, ya que son de naturaleza termolábil. Siendo una alternativa para utilizar los extractos de guayusa con actividad antiinflamatoria en alimentos funcionales.

4.1.8. Actividad antioxidante

Tabla 9. Actividad antioxidante de los diferentes pH: pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 de los aislados proteicos de *Ilex guayusa* en diferentes concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml el efecto antioxidante se probó en el aceite de Ungurahua.

| pH | 100 µg/ml | DS | VAR | 200 µg/ml | DS | VAR |
|------------|-----------|---------------|-----------|------------|--------------|-----------|
| 3.0 | 77,291% | +/-4,844E-03 | 2,324E-03 | 76,045% | +/-1,732E-03 | 3,000E-06 |
| 3.5 | 77,647% | +/- 4,761E-03 | 7,310E-03 | 75,422% | +/-2,309E-03 | 5,333E-06 |
| 4.0 | 77,351% | +/-2,179E-02 | 1,070E-03 | 76,579% | +/-2,082E-03 | 4,333E-06 |
| 4.5 | 75,808% | +/-1,136E-02 | 2,811E-03 | 77,573% | +/-3,464E-03 | 1,200E-05 |
| 5.0 | 75,912% | +/-6,807E-03 | 6,333E-06 | 76,134% | +/-1,940E-02 | 3,763E-04 |
| BHT | 85,927% | +/-3,201E-02 | 1,091E-03 | 85,775% | +/-2,400E-02 | 1,011E-03 |
| pH | 500 µg/ml | DS | VAR | 1000 µg/ml | DS | VAR |
| 3.0 | 74,859% | +/-6,083E-03 | 3,700E-05 | 73,657% | +/-1,323E-02 | 1,750E-04 |
| 3.5 | 73,272% | +/-3,786E-03 | 1,433E-05 | 71,091% | +/-2,082E-03 | 4,333E-06 |
| 4.0 | 75,793% | +/-4,041E-03 | 1,633E-05 | 74,977% | +/-1,000E-03 | 1,000E-06 |
| 4.5 | 79,086% | +/-2,646E-03 | 7,000E-06 | 80,465% | +/-2,309E-03 | 5,333E-06 |
| 5.0 | 76,683% | +/-4,933E-03 | 2,433E-05 | 77,232% | +/-2,376E-02 | 5,643E-04 |
| BHT | 85,643% | +/-6,403E-02 | 4,031E-03 | 85,525% | +/-2,105-02 | 0 |

Figura 18. Actividad antioxidantes de los aislados proteico de *Ilex guayusa* en diferentes pH 3.0, pH3.5, pH 4.0,pH 4.5 y pH 5.0; en distintas concentraciones 100, 200, 500 y 1000 µg/ml.



Como se muestra en la *tabla 9* la actividad antioxidante fue evaluada para los diferentes pH de los aislados; se evaluó el poder antioxidante de la proteína de *Ilex guayusa* en aceite oxidado de Ungurahua, mediante el método TBARS. El control positivo fue un antioxidante comercial sintetizado químicamente butilhidroxitolueno (BHT); las muestras fueron evaluadas por medio de espectrofotometría, con una longitud de onda de 532 nm con un espectrofotómetro de marca Thermo scientific evolution 201.

La mayor actividad antioxidante se encontró en el pH 4.5 en las concentraciones de 100 y 1000 µg/ml con un porcentaje de inhibición de oxidación del aceite de 79.0896% y 80.465% respectivamente. De acuerdo a la concentración más baja de 100 µg/ml los pH con mayor actividad antioxidante son pH 3.0, pH 3.5 y pH 4.0 con porcentajes de inhibición de la oxidación de 77.292, 77.647 y 77.351% respectivamente. La *figura 18* mostró el porcentaje de inhibición de la oxidación, en el análisis estadístico se determinó que existe influencia del

pH del aislado, así como la concentración y la interacción de ambos factores. Cabe recalcar que no existen diferencias significativas para los porcentajes presentados en las muestras con diferentes concentraciones lo que indica que el nivel de saturación con las concentraciones utilizadas es alta por lo que se recomienda trabajar con menores concentraciones tanto de aislados proteicos como del control positivo BHT.

Los péptidos activos de los aislados de proteínas de guayusa son de interés en alimentos nutraceúticos. En algunos estudios se ha indicado los beneficios de estos compuestos para la salud siendo así **Ruiz, J. 2012.** indicó que los alimentos con altos porcentajes de compuestos antioxidantes como fenoles brindan beneficios a la salud debido a que previenen enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cáncer, obesidad, degenerativas, entre otras.

4.2. Verificación de Hipótesis.

4.2.1. Rendimiento de la proteína de *Ilex guayusa* aislada a diferentes pH; con una y dos extracciones

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta rendimiento se utilizó dos factores el pH del tratamiento y el número de extracciones (ANEXO A) , el análisis de doble variable de ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos (pH) y para el número de extracciones. Por lo tanto, a un nivel de confianza del 95% se acepta la hipótesis alternativa que indica que el pH influyó en el rendimiento al igual que el número de extracciones de *Ilex guayusa*. (ANEXO B)

4.2.2. Digestión gástrica y duodenal de aislados proteicos de *Ilex guayusa*.

El aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 4.0 es digerido en su totalidad tanto en digestión gástrica y duodenal simulada *in vitro* así como se mostró en la **figura 14**, la hidrólisis de pancreatina hidroliza por completo la proteína del extracto.

4.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante (in vitro) de las proteínas de *Ilex guayusa*.

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta actividad antioxidante en relación al antioxidante de uso comercial BHT (ANEXO G), se utilizó dos factores: el pH del tratamiento y la concentración del aislado proteico, el análisis de doble variable de

ANOVA mostró diferencias significativas para el pH, la concentración y presentó interacción entre ambos factores. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa con el 95% de confianza debido a que el aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones presenta actividad antioxidante en relación al antioxidante comercial BHT (ANEXO H).

4.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (in vitro) de las proteínas de *Ilex guayusa*.

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta actividad antiinflamatoria en relación al antiinflamatorio de uso comercial Diclofenaco (ANEXO E), se utilizó dos factores: el pH del tratamiento y la concentración del aislado proteico, el análisis de doble variable de ANOVA mostró diferencias significativas para el pH, la concentración sin embargo no presentó interacción entre ambos factores. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa con el 95% de confianza de aislado proteico de *Ilex guayusa* a pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 en diferentes concentraciones presenta actividad antiinflamatoria en relación al antiinflamatorio de uso comercial Diclofenaco (ANEXO F).

4.2.5 Cuantificación de polifenoles presentes en el sobrenadante de la extracción de proteína de *Ilex guayusa*

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta unidades equivalentes de ácido gálico (UEAG) como cuantificación de polifenoles presentes en el sobrenadante de la extracción de *Ilex guayusa* se utilizó el factor pH del tratamiento (ANEXO C). El análisis de una variable de ANOVA mostró diferencias significativas para el pH. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa con el 95% de confianza debido a que el sobrenadante resultante en la extracción de proteína de *Ilex guayusa* a pH 3.0; pH 3.5; pH 4.0; pH 4.5 y pH 5.0 tiene presencia de polifenoles expresados en mg de ácido gálico (ANEXO D).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se caracterizó la proteína extraída de la hoja seca de *Ilex guayusa* mediante el análisis proximal, en el que se conoció que el contenido de proteína es del 18%. Un porcentaje proteico alto para ser una planta de arbusto a comparación del loto indio contiene 10.60%. Se determinó el mayor rendimiento con 5.59 % a pH 3.0 mediante la precipitación isoelectrica. La segunda extracción aumentó significativamente el rendimiento de 2,98 a 5.63% a pH 4.5.
- El análisis SDS-PAGE para los extractos proteicos de *Ilex guayusa* mostró bandas de proteínas con pesos moleculares entre 6 a 60 kDa, las bandas de mayor coloración se mostraron a pH 3.5 y 4.0; para la electroforesis bidimensional se determinó el punto isoelectrico entre pH 3.0-4.0 y el peso molecular de 30 kDa; se reconoció la existencia de proteínas isómeras en el gel de dos dimensiones.
- La digestibilidad de los aislados proteicos indicaron que es totalmente degradada por la pepsina en la digestión tanto en la fase gástrica en un pH 3.2 y la pancreatina en la fase duodenal con un pH 7.0.
- Se evaluó el contenido de polifenoles en los sobrenadantes de los tratamientos para aislar proteínas de *Ilex guayusa* en diferentes pH. El sobrenadante con mayor cantidad de polifenoles fue de 1508,03 mg de ácido gálico por 100 gramos de muestra a pH 5.0.
- Se comparó la actividad antiinflamatoria *in vitro* del Diclofenaco comercial con los extractos proteicos de *Ilex guayusa* en diferentes pH y concentraciones; el aislado de guayusa obtenido a pH 4.5 presentó 66.667% de actividad antiinflamatoria a la concentración de 1000 µg/ml a comparación del Diclofenaco que a la misma

concentración obtuvo 82,716%. La mayor actividad presentada fue de 67.889% a pH 5.0 a la concentración de 500 µg/ml que al compararse con el Diclofenaco a la misma concentración es de 51.852% lo que indica que es la concentración óptima para la actividad antiinflamatoria del extracto de guayusa. Se determinó que el mejor tratamiento es el extracto de pH 5.0 en concentración de 500 µg/ml y que el efecto es directamente proporcional a la concentración.

- La actividad antioxidante se valoró en comparación con un antioxidante químico comercial hidroxibutiltolueno (BHT) se encontró que para los aislados de proteína de *Ilex guayusa* el pH de mayor actividad antioxidante fue a 4.5 en las concentraciones de 100 y 1000 µg/ml con un porcentaje de inhibición de oxidación del aceite de Ungurahua 79.0896% y 80.465% respectivamente. Los pH con mayor actividad en la concentración de 100 µg/ml es el pH 3.0, pH 3.5 y pH 4.0 con porcentajes de inhibición de la oxidación de 77.292, 77.647 y 77.351% respectivamente. Cabe recalcar que no existen diferencias significativas para los porcentajes presentados en las muestras con diferentes concentraciones lo que indica que el nivel de saturación con las concentraciones utilizadas es alto.

5.2 Recomendaciones

- Ampliar el rango de pH de solubilización para mejorar el rendimiento.
- Evaluar diferentes especies para la extracción de proteínas de *Ilex guayusa* como la guayusa de color morado de la que no existe datos pre-existentes.
- La cuantificación proteica por DUMAS se debe comparar con más métodos; se intentó métodos espectrofotométricos que no se realizaron satisfactoriamente debido a la coloración de la *Ilex guayusa*.

- Determinar el perfil de aminoácidos de *Ilex guayusa*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante en ensayos *in vivo* para los aislados proteicos de *Ilex guayusa*
- Utilizar concentraciones menores de BHT y concentración de aislados proteicos para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro*. Debido a que los valores no presentan diferencias significativas entre concentraciones indicando que existe una saturación de antioxidante a esas concentraciones.

BIBLIOGRAFÍA

Adas G., Elizabeth A., Arias Arias R. V. and Manzano Santana P. (2013). "Estudio Comparativo del Té de la especie (*Ilex guayusa*) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa". Aromas del Tungurahua.

Alhakmani F., Kumar S. and Khan S. A. (2013). "Estimation of total phenolic content, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*". Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: 623-627.

Arranz Gutiérrez, E. M. (2013). "Estudio de antiinflamatorios naturales para el diseño de alimentos de uso específico para la salud".

Avanza, M. V., & Añon, M. C. (2004). "Modificaciones de las proteínas de amaranto por tratamiento térmico". Universidad Nacional del Nordeste/Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

Báez, F. A. G., & González, O. M. (2000). "Lectina concanavalina A: obtención y purificación".

Barquero, A. A. (2007). "Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro". Revista Química Viva: 2.

Bellomonte, G., Costantini A. and Giammarioli S. (1987). "Comparison of modified automatic Dumas method and the traditional Kjeldahl method for nitrogen determination in infant food." Journal - Association of Official Analytical Chemists: 227-229.

Blanco-Labra, A., & Mancilla, C. A. (2000). "Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas". Red Acta Universitaria.

Calvo-Alén, J., Silva-Fernández, L., Úcar-Angulo, E., Pego-Reigosa, J. M., Olivé, A., Martínez-Fernández, C. & Gómez-Reino, J. J. (2013). "Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre el uso de terapias biológicas en el lupus eritematoso sistémico". Reumatología Clínica: 281-296.

Cantú, D. J., García, R. R., García, J. R., Luis, J., & Sánchez, A (2002). "Characterization of Proteins from Sunflower Leaves and Seeds: Relationship of Biomasa and Seed Yield".

Cañavate J. L. R. (1994). "Fitoterapia de la inflamación." Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas : 80-85.

Castañeda, B. C., Llica, E. R., & Vasquez, L. I. (2008). "Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas". Horizonte Médico:1.

Cerda-Tapuy L. L. (2013). "Runa y su impacto en la amazonía su modelo base del desarrollo sostenible en la amazonía ecuatoriana".

Clemente A., Millán F., Pedroche J., Vioque J. and Yust M. d. M. (2001). "Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos." Grasas y Aceites: 132-136.

De Wapu E. L. C. (2009). "Plan de manejo de la especie guayusa." Plantas Medicinales Ecuador: 1.

Degen de Arrúa, R., & González, Y. (2014). "Plantas utilizadas en la medicina popular paraguaya como antiinflamatorias". Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas:3.

Delaporte, R. H., Sánchez, G. M., Cuellar, A. C., & Mello, J. C. P. (2001). "Control de calidad y actividad antiinflamatoria de las drogas vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold". Acta Farmacéutica Bonaerense: 39-46.

Fernandez J., Gharahdaghi F. and Mische S. M. (1998). "Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)." Electrophoresis: 1036-1045.

Freire W., Ramírez M., Belmont P., Mendieta M., Silva K., Romero N., Sáenz K., Pineiros P., Gómez L. and Monge R. (2011). "Encuesta nacional de salud y nutrición." CITY, Ecuador: 2013.

Gallegos Tintoré, S. M., Chel Guerrero, L., & Martínez Ayala, A. L. (2013). "Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales". OmniaScience Monograph.

García Bacallao L., Rojo Domínguez D. M., García Gómez L. V. and Hernández Ángel M. (2002). "Plantas con propiedades antiinflamatorias." Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas : 214-216.

Gonçalves, N., Vioque, J., Clemente, A., Sánchez Vioque, R., Bautista-Gallego, J., & Millán, F. (1997). "Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza".

Guillén Sans R., Guzmán Chozas M. and Vicario Romero I. (1997). "Utilización del ensayo del ácido 2-tiobarbiturico (ATB) para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos."

Guzmán-Chozas M., Vicario I. M. and Guillén-Sans R. (1997). "Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry : 2452-2457.

Hartinger J., Stenius K., Högemann D. and Jahn R. (1996). "16-BAC/SDS-PAGE: A Two-Dimensional Gel Electrophoresis System Suitable for the Separation of Integral Membrane Proteins." Analytical Biochemistry: 126-133.

Hervert Hernández, D. (2011). "Contribución de las bebidas a la ingesta dietética de polifenoles y capacidad antioxidante en mujeres con obesidad de zonas rurales de México". REDUCA:12.

Indrayan, A. K., Sharma, S., Durgapal, D., Kumar, N., & Kumar, M. (2005). "Determination of nutritive value and analysis of mineral elements for some medicinally valued plants from Uttaranchal". Current science-bangalore: 1252.

Jadan Piedra, C. A. (2013). "Evaluación de las etapas y los factores que influyen en la solubilización de mercurio y selenio durante la digestión gastrointestinal de productos pesqueros".

Jiménez Saiz R. (2012). "Digestibilidad alergenicidad in vitro y efecto inmunomodulador de proteínas de huevo procesado", CSIC-UAM - Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL).

Juárez-Roldán, A. R., & Jiménez-Munguía, M. T. (2013). "Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados".

Jung S., Rickert D. A., Deak N. A., Aldin E. D., Recknor J., Johnson L. A. and Murphy P. A. (2003). "Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products." Journal of the American Oil Chemists' Society : 1169-1173.

Laemmli U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature: 680-685.

Lewis W. H., Kennelly E. J., Bass G. N., Wedner H. J., Elvin-Lewis M. P. and D. F. W (1991). "Ritualistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivaro Indians." Journal of Ethnopharmacology : 25-30.

López Quimbayo, L. D. (2012). "Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de pentacalia nítida y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso.

Martínez-Valverde I., Periago and Ros G. (2000). "Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta." Archivos Latinoamericanos de Nutrición : 5-18.

Martínez Augustin O. and Martínez de Victoria E. (2006). "Proteínas y péptidos en nutrición enteral." Nutrición Hospitalaria: 01-14.

Martínez E. N. and Añón M. C. (1996). "Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study." Journal of Agricultural and Food Chemistry: 2523-2530.

Melo Gallegos, V. A. (2014). "Composición y análisis químico de la especie *Ilex guayusa* Loes". Universidad San Francisco de Quito.

Millán F., Pedroche, Sánchez Vioque R., Vioque J. and Yust M. d. M. (2001). "Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos." Grasas y Aceites: 127-131.

Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carriere F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D. J., Menard O., Recio I., Santos C. N., Singh R. P., Vegarud G. E., Wickham M. S. J., Weitschies W. and Brodkorb A. (2014). "A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus." Food & Function: 1113-1124.

- Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R. C., & Montenegro, G. (2007). "Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante". Química Nova: 848.
- Naranjo Andrade, A. A. (2013). "Evaluación de la actividad diurética y cuantificación de polifenoles de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivada en Pomona, Pastaza-Ecuador".
- Patiño, V. M. (1968). "Guayusa, a neglected stimulant from the eastern Andean foothills". Economic Botany: 311-316.
- Radice M. and Vidari G. (2010). "Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes. y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial." Universidad degli Studi di Pavia. Italia.
- Rojano, B. A., Zapata Vahos, I. C., Alzate Arbeláez, A. F., Martínez, M., Juleza, A., Cortés Correa, F. B., & Gamboa Carvajal, L. (2011). "Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (açai colombiano)(*Euterpe oleracea* Mart)". Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín: 6213-6220.
- Ruiz, J. M. (2012). "Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales". Nutrición clínica y dietética hospitalaria: 8-20.
- Sarmiento-Rubiano L. A. (2006). "Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación." Química funcional 2006: 8.
- Suárez López M. M., Kizlansky A. and López L. B. (2006). "Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad." Nutrición Hospitalaria: 47-51.
- Swanston-Flatt S. K., Day C., Flatt P. R., Gould B. J. and Bailey C. J. (1989). "Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice." Diabetes research (Edinburgh, Scotland): 69-73.
- Vasco C., Ruales J. and Kamal-Eldin A. (2008). "Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador." Food Chemistry: 816-823.
- Villanueva-Tiburcio, J. E., Condezo-Hoyos, L. A., & Asquiere, E. R. (2010). "Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh)". Food Science and Technology (Campinas): 151-160.
- Vioque, J., Sánchez Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. D. M., & Millán, F. (2000). "Péptidos bioactivos en proteínas de reserva".
- Vioque, J., Sánchez Vioque, R., Pedroche, J., Yust, M. D. M., & Millán, F. (2001). "Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos". Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España): 0017-3495.

Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). "Preparation and functional properties of rice bran protein isolate". Journal of Agricultural and Food Chemistry: 411-416.

Wang, X. S., Tang, C. H., Yang, X. Q., & Gao, W. R. (2008). "Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins". Food Chemistry: 11-18.

World Health Organization. (1985). "Energy and protein requirements: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series, no 724). Geneva: World Health Organization".

ANEXOS

ANEXO A: DATOS RENDIMIENTOS DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEINA DE
Ilex guayusa

Tabla 10. Datos obtenidos para el rendimiento de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en peso

| pH | Extracción | R1 | R2 | R3 |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| 3.0 | 1 | 0,299 | 0,268 | 0,270 |
| | 2 | 0,018 | 0,064 | 0,032 |
| 3.5 | 1 | 0,227 | 0,295 | 0,277 |
| | 2 | 0,032 | 0,064 | 0,033 |
| 4.0 | 1 | 0,305 | 0,159 | 0,145 |
| | 2 | 0,036 | 0,006 | 0,054 |
| 4.5 | 1 | 0,171 | 0,141 | 0,134 |
| | 2 | 0,059 | 0,043 | 0,075 |
| 5.0 | 1 | 0,062 | 0,066 | 0,058 |
| | 2 | 0,015 | 0,013 | 0,017 |

El rendimiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$Rendimiento = \frac{\text{Peso obtenido del liofilizado de } g.}{\text{Peso utilizado de la ahrina de } Ilex \text{ guayusa}} * 100$$

Tabla 11. Rendimiento de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en porcentaje

| pH | Extracción | R1 | R2 | R3 | Promedios en porcentaje | DS |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|
| 3.0 | 1 | 5,98 | 5,37 | 5,41 | 5,59 | 0,33 |
| | 2 | 6,36 | 6,67 | 6,07 | 6,37 | 0,29 |
| 3.5 | 1 | 4,55 | 5,90 | 5,55 | 5,33 | 0,69 |
| | 2 | 5,19 | 7,19 | 6,21 | 6,20 | 0,99 |
| 4.0 | 1 | 3,05 | 3,18 | 2,91 | 3,05 | 0,13 |
| | 2 | 3,41 | 3,32 | 4,00 | 3,58 | 0,37 |
| 4.5 | 1 | 3,43 | 2,83 | 2,69 | 2,98 | 0,39 |
| | 2 | 8,99 | 3,70 | 4,19 | 5,63 | 2,92 |
| 5.0 | 1 | 1,25 | 1,34 | 1,17 | 1,25 | 0,08 |
| | 2 | 1,57 | 1,61 | 1,53 | 1,57 | 0,04 |

**ANEXO B: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO DE LA
EXTRACCIÓN DE PROTEINA DE *Ilex guayusa***

Tabla 12. Análisis ANOVA de dos variables del rendimiento de extracción de proteína de *Ilex guayusa*; $\alpha= 0.05$

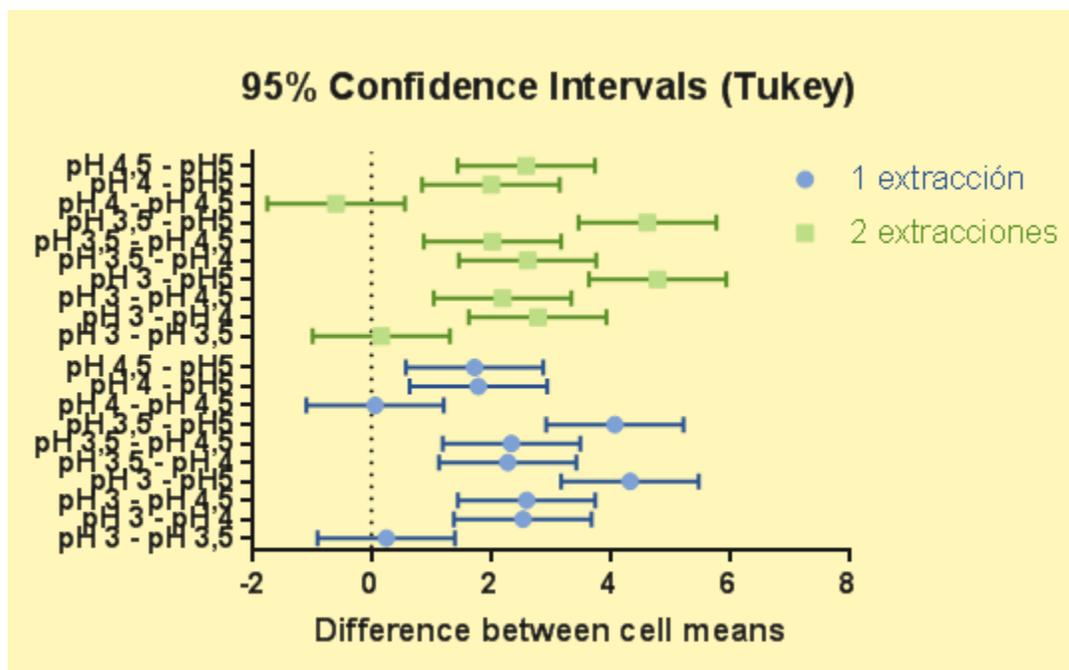
| Source of Variation | % of total variation | P value | P value summary | Significant |
|---------------------|----------------------|---------|-----------------|-------------|
| Interacción | 0,6863 | 0,5780 | Ns | No |
| Extracciones | 4,243 | 0,0004 | *** | Yes |
| pH | 90,41 | <0,0001 | **** | Yes |

Tabla 13. Prueba de comparación múltiple de tukey para el rendimiento de extracción de *Ilex guayusa* con α de 0.05

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95,00% CI of diff, | Significant | Summary |
|-----------------------------------|------------|--------------------|-------------|---------|
| 1 extracción | | | | |
| pH 3.0 vs. pH 3.5 | 0,2533 | -0,8986 to 1,405 | No | Ns |
| pH 3.0 vs. pH 4.0 | 2,54 | 1,388 to 3,692 | Yes | **** |
| pH 3.0 vs. pH 4.5 | 2,603 | 1,451 to 3,755 | Yes | **** |
| pH 3.0 vs. pH 5.0 | 4,333 | 3,181 to 5,485 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.0 | 2,287 | 1,135 to 3,439 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.5 | 2,35 | 1,198 to 3,502 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 5.0 | 4,08 | 2,928 to 5,232 | Yes | **** |
| pH 4.0 vs. pH 4.5 | 0,06333 | -1,089 to 1,215 | No | Ns |
| pH 4.0 vs. pH 5.0 | 1,793 | 0,6414 to 2,945 | Yes | ** |
| pH 4.5 vs. pH 5.0 | 1,73 | 0,5781 to 2,882 | Yes | ** |
| 2 eextracciones | | | | |
| pH 3.0 vs. pH 3.5 | 0,17 | -0,9819 to 1,322 | No | Ns |
| pH 3.0 vs. pH 4.0 | 2,79 | 1,638 to 3,942 | Yes | **** |

| | | | | |
|-------------------|-------|------------------|-----|------|
| pH 3.0 vs. pH 4.5 | 2,2 | 1,048 to 3,352 | Yes | *** |
| pH 3.0 vs. pH 5.0 | 4,797 | 3,645 to 5,949 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.0 | 2,62 | 1,468 to 3,772 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.5 | 2,03 | 0,8781 to 3,182 | Yes | *** |
| pH 3.5 vs. pH 5.0 | 4,627 | 3,475 to 5,779 | Yes | **** |
| pH 4.0 vs. pH 4.5 | -0,59 | -1,742 to 0,5619 | No | Ns |
| pH 4.0 vs. pH 5.0 | 2,007 | 0,8547 to 3,159 | Yes | *** |
| pH 4.5 vs. pH 5.0 | 2,597 | 1,445 to 3,749 | Yes | **** |

Figura 19. Diferencia en la prueba de comparación múltiple de tukey para el rendimiento de extracción de proteína de *Ilex guayusa*



ANEXO C:

**DATOS OBTENIDOS PARA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN
SOBRENADANTES DE LA EXTRACCIÓN PROTEÍCA DE *Ilex guayusa* EN
DIFERENTES pH**

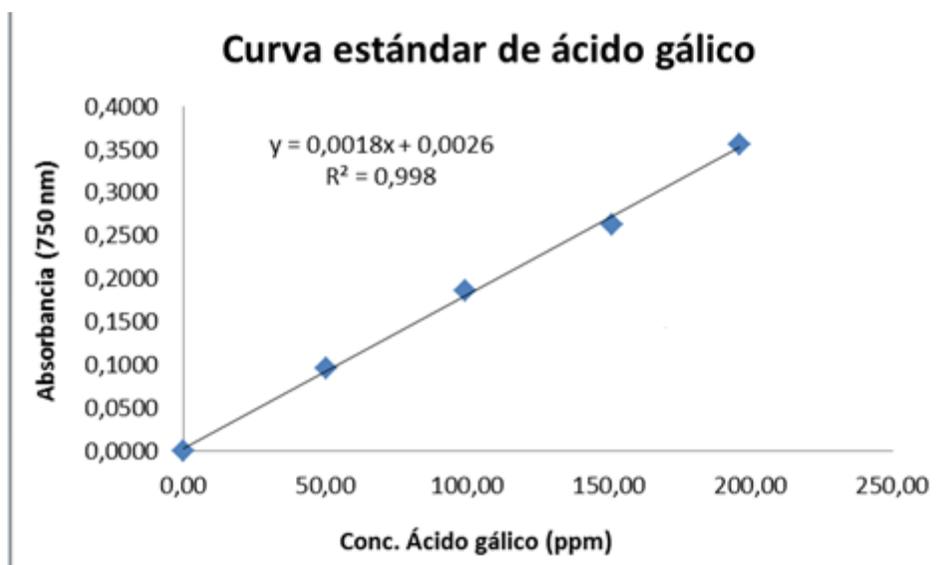
Tabla 14. Valores de absorbancia para la cuantificación de polifenoles leídos a 750 nm de muestra de los sobrenadantes de los extractos de proteínas en diferentes pH

| | R1 | R2 | R3 |
|---------------|-----------|-----------|-----------|
| pH 3.0 | 2,241 | 2,236 | 2,24 |
| pH 3.5 | 2,278 | 2,281 | 2,287 |
| pH 4.0 | 2,511 | 2,512 | 2,511 |
| pH 4.5 | 2,438 | 2,44 | 2,436 |
| pH 5.0 | 2,685 | 2,698 | 2,707 |

Tabla 15. Valores de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra de los sobrenadantes de los extractos de proteínas en diferentes pH

| | R1 | R2 | R3 | PROMEDIO | DS | VAR |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------|------------|
| pH 3.0 | 1248,615 | 1247,498 | 1249,732 | 1248,61 | 1,12 | 1,25 |
| pH 3.5 | 1270,954 | 1272,629 | 1271,792 | 1271,79 | 0,84 | 0,70 |
| pH 4.0 | 1401,079 | 1401,637 | 1401,358 | 1401,36 | 0,28 | 0,08 |
| pH 4.5 | 1360,310 | 1361,427 | 1359,193 | 1360,31 | 1,12 | 1,25 |
| pH 5.0 | 1508,027 | 1505,514 | 1510,540 | 1508,03 | 2,51 | 6,32 |

Figura 20. Curva de calibración de equivalentes de ácido gálico para cuantificación de polifenoles



ANEXO D:

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN
SOBRENADANTES DE LA EXTRACCIÓN PROTEÍCA DE *Ilex guayusa*
DIFERENTES pH**

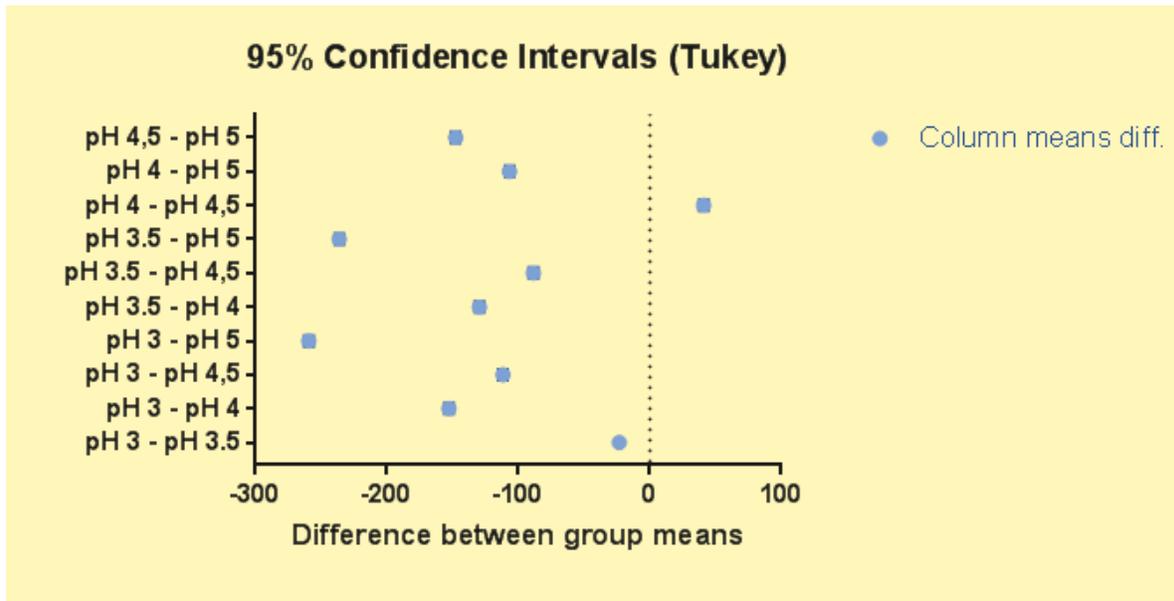
Tabla 16. Análisis de ANOVA de una sola variable para los datos de cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH con un valor $\alpha=0.05$

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|----------------|
| Treatment (between columns) | 131371 | 4 | 32843 | F (4, 10) = 17124 | P<0,0001 |
| Residual (within columns) | 19,18 | 10 | 1,918 | | |
| Total | 131390 | 14 | | | |

Tabla 17. Prueba de comparación múltiple de tukey para la cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH con un valor $\alpha =0.05$

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 90,00% CI of diff, | Significant? | Summary |
|--|-------------------|---------------------------|---------------------|----------------|
| pH 3.0 vs. pH 3.5 | -23,18 | -26,39 to -19,96 | Yes | **** |
| pH 3.0 vs. pH 4.0 | -152,7 | -156 to -149,5 | Yes | **** |
| pH 3.0 vs. pH 4.5 | -111,7 | -114,9 to -108,5 | Yes | **** |
| pH 3.0 vs. pH 5.0 | -259,4 | -262,6 to -256,2 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.0 | -129,6 | -132,8 to -126,4 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 4.5 | -88,52 | -91,73 to -85,31 | Yes | **** |
| pH 3.5 vs. pH 5.0 | -236,2 | -239,4 to -233 | Yes | **** |
| pH 4.0 vs. pH 4.5 | 41,05 | 37,84 to 44,26 | Yes | **** |
| pH 4.0 vs. pH 5.0 | -106,7 | -109,9 to -103,5 | Yes | **** |
| pH 4.5 vs. pH 5.0 | -147,7 | -150,9 to -144,5 | Yes | **** |

Figura 21. Prueba de comparación múltiple de tukey para la cuantificación de polifenoles de sobrenadantes de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH con un valor $\alpha = 0.05$



ANEXO E:

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN EXTRACTOS
DE PROTEINA DE *Ilex guayusa* EN DIFERENTES pH**

Tabla 18. Actividad antiinflamatorios *in vitro* de los extractos proteicos *Ilex guayusa* en diferentes pH con diferentes concentraciones

| PH | Concen. | R1 | R2 | R3 | PROM. | DS | CONTROL | % | V |
|------------|----------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|----------------|------------|-------------|
| 3.0 | 100 | 0,039 | 0,035 | 0,048 | 0,041 | 0,007 | 0,044 | 7,57575758 | 2,95556E-05 |
| | 200 | 0,033 | 0,039 | 0,036 | 0,036 | 0,003 | 0,044 | 18,1818182 | 0,000006 |
| | 500 | 0,021 | 0,029 | 0,025 | 0,025 | 0,004 | 0,044 | 43,1818182 | 1,06667E-05 |
| | 1000 | 0,022 | 0,027 | 0,019 | 0,023 | 0,004 | 0,044 | 48,4848485 | 1,08889E-05 |
| 3.5 | 100 | 0,028 | 0,029 | 0,027 | 0,028 | 0,001 | 0,044 | 36,3636364 | 6,66667E-07 |
| | 200 | 0,031 | 0,02 | 0,025 | 0,025 | 0,006 | 0,044 | 42,4242424 | 2,02222E-05 |
| | 500 | 0,038 | 0,019 | 0,015 | 0,024 | 0,012 | 0,044 | 45,4545455 | 0,000100667 |
| | 1000 | 0,019 | 0,015 | 0,01 | 0,015 | 0,005 | 0,044 | 66,6666667 | 1,35556E-05 |
| 4.0 | 100 | 0,041 | 0,035 | 0,029 | 0,035 | 0,006 | 0,044 | 20,4545455 | 0,000024 |
| | 200 | 0,033 | 0,025 | 0,021 | 0,026 | 0,006 | 0,044 | 40,1515152 | 2,48889E-05 |
| | 500 | 0,016 | 0,024 | 0,029 | 0,023 | 0,007 | 0,044 | 47,7272727 | 2,86667E-05 |
| | 1000 | 0,012 | 0,021 | 0,019 | 0,017 | 0,005 | 0,044 | 60,6060606 | 1,48889E-05 |
| 4.5 | 100 | 0,032 | 0,026 | 0,019 | 0,026 | 0,007 | 0,044 | 41,6666667 | 2,82222E-05 |
| | 200 | 0,015 | 0,03 | 0,012 | 0,019 | 0,010 | 0,044 | 56,8181818 | 0,000062 |
| | 500 | 0,022 | 0,019 | 0,015 | 0,019 | 0,004 | 0,044 | 57,5757576 | 8,22222E-06 |
| | 1000 | 0,009 | 0,012 | 0,023 | 0,015 | 0,007 | 0,044 | 66,6666667 | 3,62222E-05 |
| 5.0 | 100 | 0,0413 | 0,029 | 0,033 | 0,034 | 0,006 | 0,044 | 21,7424242 | 2,62422E-05 |
| | 200 | 0,039 | 0,025 | 0,038 | 0,034 | 0,008 | 0,044 | 22,7272727 | 4,06667E-05 |
| | 500 | 0,019 | 0,01 | 0,015 | 0,015 | 0,005 | 0,044 | 66,6666667 | 1,35556E-05 |
| | 1000 | 0,013 | 0,015 | 0,017 | 0,015 | 0,002 | 0,044 | 65,9090909 | 2,66667E-06 |

% ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

$$= \frac{\text{Abs. del Control positivo de inflamación} - \text{Abs. del tratamiento}}{\text{Abs. del Control de inflamación}}$$

* 100

ANEXO F:

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN
EXTRACTOS PROTEICOS DE *Ilex guayusa* DE DIFERENTES pH**

Tabla 19. Análisis de ANOVA de dos variables con $\alpha=0.05$ de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos proteicos de *Ilex guayusa* de diferentes pH en diferentes concentraciones

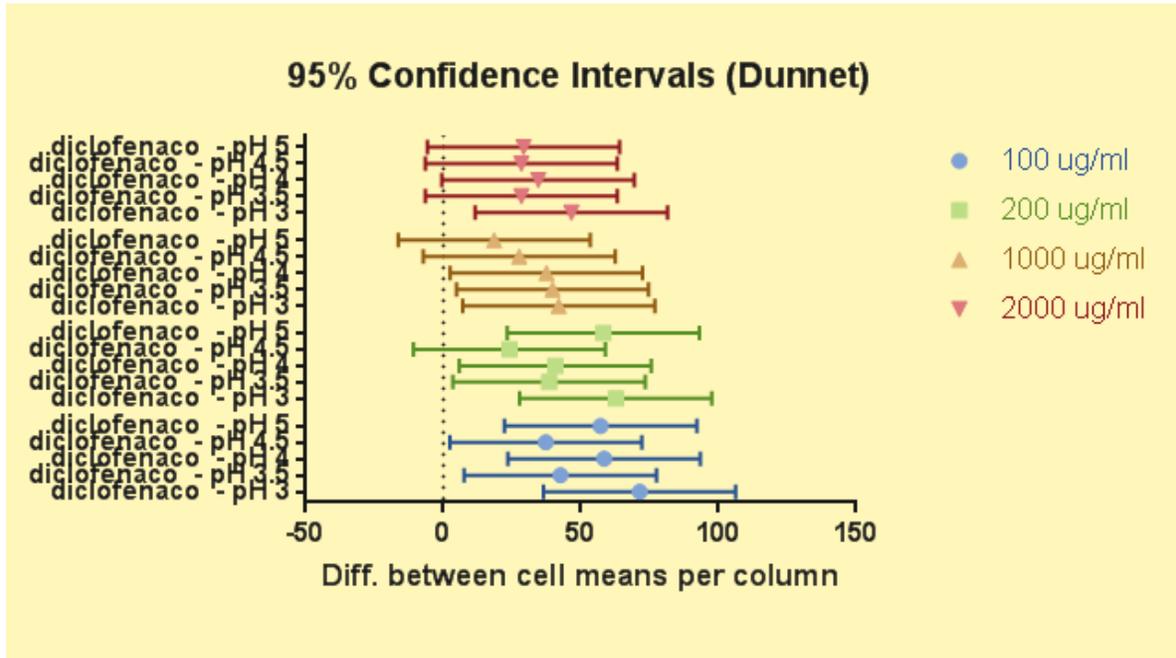
| Source of Variation | % of total variation | P value | P value summary | Significant? |
|---------------------|----------------------|---------|-----------------|--------------|
| Interaction | 6,85 | 0,641 | ns | No |
| Concentración | 43,44 | <,001 | *** | Yes |
| pH | 23,31 | <,001 | *** | Yes |

Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de Dunnett para la actividad antiinflamatoria extractos de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH con diferentes concentraciones con un valor $\alpha =0.05$

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95,00% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|--------------------|--------------|---------|
| 100 ug/ml | | | | |
| Diclofenaco vs. pH 3.0 | 71,36 | 36,43 to 106,3 | Yes | **** |
| Diclofenaco vs. pH 3.5 | 42,57 | 7,645 to 77,5 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 4.0 | 58,48 | 23,55 to 93,41 | Yes | *** |
| Diclofenaco vs. pH 4.5 | 37,27 | 2,342 to 72,19 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 5.0 | 57,19 | 22,27 to 92,12 | Yes | *** |
| 200 ug/ml | | | | |
| Diclofenaco vs. pH 3.0 | 62,7 | 27,77 to 97,63 | Yes | *** |
| Diclofenaco vs. pH 3.5 | 38,46 | 3,533 to 73,38 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 4.0 | 40,73 | 5,805 to 75,66 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 4.5 | 24,06 | -10,86 to 58,99 | No | ns |
| Diclofenaco vs. pH 5.0 | 58,16 | 23,23 to 93,08 | Yes | *** |

| 1000 ug/ml | | | | |
|-------------------------------|-------|------------------|-----|----|
| Diclofenaco vs. pH 3.0 | 41,99 | 7,066 to 76,92 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 3.5 | 39,72 | 4,793 to 74,64 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 4.0 | 37,45 | 2,52 to 72,37 | Yes | * |
| Diclofenaco vs. pH 4.5 | 27,60 | -7,328 to 62,52 | No | ns |
| Diclofenaco vs. pH 5.0 | 18,51 | -16,42 to 53,43 | No | ns |
| 2000 ug/ml | | | | |
| Diclofenaco vs. pH 3.0 | 46,57 | 11,65 to 81,5 | Yes | ** |
| Diclofenaco vs. pH 3.5 | 28,39 | -6,534 to 63,32 | No | ns |
| Diclofenaco vs. pH 4.0 | 34,45 | -0,4735 to 69,38 | No | ns |
| Diclofenaco vs. pH 4.5 | 28,39 | -6,534 to 63,32 | No | ns |
| Diclofenaco vs. pH 5.0 | 29,15 | -5,776 to 64,07 | No | ns |

Figura 22. Prueba de comparación múltiple de dunnet para la evaluación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH en diferentes concentraciones con un valor $\alpha = 0.05$



ANEXO G:
**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE
PROTEINA DE *Ilex guayusa* EN DIFERENTES pH**

**Tabla 21. Valores de absorbancia de actividad antioxidante de aislados proteicos de
Ilex guayusa con diferentes pH y concentraciones**

| pH | R1 | R2 | R3 |
|---------------|-----------|-----------|-----------|
| 100 µg/ml | | | |
| pH 3.0 | 0,51 | 0,511 | 0,51 |
| pH 3.5 | 0,501 | 0,506 | 0,5 |
| pH 4.0 | 0,512 | 0,51 | 0,505 |
| pH 4.5 | 0,562 | 0,539 | 0,53 |
| pH 5.0 | 0,549 | 0,539 | 0,536 |
| BHT | 0,51 | 0,511 | 0,51 |
| 200 µg/ml | | | |
| pH 3.0 | 0,594 | 0,591 | 0,591 |
| pH 3.5 | 0,651 | 0,651 | 0,647 |
| pH 4.0 | 0,564 | 0,563 | 0,56 |
| pH 4.5 | 0,443 | 0,437 | 0,437 |
| pH 5.0 | 0,534 | 0,502 | 0,499 |
| BHT | 0,594 | 0,591 | 0,591 |
| 500 µg/ml | | | |
| pH 3.0 | 0,729 | 0,709 | 0,704 |
| pH 3.5 | 0,598 | 0,602 | 0,599 |
| pH 4.0 | 0,604 | 0,605 | 0,603 |
| pH 4.5 | 0,442 | 0,438 | 0,438 |
| pH 5.0 | 0,585 | 0,542 | 0,546 |
| BHT | 0,729 | 0,709 | 0,704 |
| 1000 µg/ml | | | |
| pH 3.0 | 0,697 | 0,698 | 0,687 |
| pH 3.5 | 0,611 | 0,617 | 0,618 |
| pH 4.0 | 0,641 | 0,636 | 0,633 |
| pH 4.5 | 0,646 | 0,647 | 0,642 |
| pH 5.0 | 0,735 | 0,727 | 0,726 |
| BHT | 0,697 | 0,698 | 0,687 |

Tabla 22. Promedio de absorbancias de actividad antioxidante de aislados proteico de *Ilex guayusa* en diferentes pH y concentraciones

| pH | 100 µg/ml | DS | VAR | 200 µg/ml | DS | VAR |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| 3.0 | 5,103E-01 | 4,844E-03 | 2,324E-03 | 5,920E-01 | 1,732E-03 | 3,000E-06 |
| 3.5 | 5,023E-01 | 4,761E-03 | 7,310E-03 | 6,497E-01 | 2,309E-03 | 5,333E-06 |
| 4.0 | 5,090E-01 | 2,179E-02 | 1,070E-03 | 5,623E-01 | 2,082E-03 | 4,333E-06 |
| 4.5 | 5,437E-01 | 1,136E-02 | 2,811E-03 | 4,390E-01 | 3,464E-03 | 1,200E-05 |
| 5.0 | 5,413E-01 | 6,807E-03 | 6,333E-06 | 5,117E-01 | 1,940E-02 | 3,763E-04 |
| pH | 500 µg/ml | DS | VAR | 1000 µg/ml | DS | VAR |
| 3.0 | 6,940E-01 | 6,083E-03 | 3,700E-05 | 7,140E-01 | 1,323E-02 | 1,750E-04 |
| 3.5 | 6,153E-01 | 3,786E-03 | 1,433E-05 | 5,997E-01 | 2,082E-03 | 4,333E-06 |
| 4.0 | 6,367E-01 | 4,041E-03 | 1,633E-05 | 6,040E-01 | 1,000E-03 | 1,000E-06 |
| 4.5 | 6,450E-01 | 2,646E-03 | 7,000E-06 | 4,393E-01 | 2,309E-03 | 5,333E-06 |
| 5.0 | 7,293E-01 | 4,933E-03 | 2,433E-05 | 5,577E-01 | 2,376E-02 | 5,643E-04 |

$$\% \text{ ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE} = \frac{\text{Abs. del Control positivo de oxidación} - \text{Abs. del tratamiento}}{\text{Abs. del Control positivo de oxidación}} * 100$$

Tabla 23. Promedio de porcentajes de actividad antioxidante de aislados proteicos de *Ilex guayusa* en diferentes pH y concentraciones

| pH | 100 µg/ml | 200 µg/ml | 500 µg/ml | 1000 µg/ml |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|
| 3.0 | 77,2913 | 73,6573 | 68,2285 | 69,1185 |
| 3.5 | 77,6473 | 71,0912 | 73,3161 | 72,6190 |
| 4.0 | 77,3506 | 74,9774 | 73,1233 | 71,6697 |
| 4.5 | 75,8080 | 80,4654 | 80,4506 | 71,2989 |
| 5.0 | 75,9118 | 77,2319 | 75,1850 | 67,5462 |

Tabla 24. Control positivo y negativo con aceite de Ungurahua en porcentaje para actividad antioxidante

| Aceite oxidado | | | | | |
|--------------------------|--------|--------|--------|------------|-----------|
| R1 | R2 | R3 | PROM | DS | VAR |
| 2,2490 | 2,2420 | 2,2510 | 2,2473 | 0,00472582 | 2,233E-05 |
| Aceite no oxidado | | | | | |
| R1 | r2 | r3 | PROM | DS | VAR |
| 2,0760 | 2,1180 | 2,1360 | 2,1100 | 0,03078961 | 0,000948 |

ANEXO H:

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN
EXTRACTOS DE PROTEINA DE *Ilex guayusa* EN DIFERENTES pH**

Tabla 25. Análisis de ANOVA de dos variables con $\alpha=0.05$ de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos proteicos de *Ilex guayusa* de diferentes pH en diferentes concentraciones

| Source of Variation | % of total variation | P value | P value summary | Significant? |
|---------------------|----------------------|---------|-----------------|--------------|
| Interaction | 16,55 | <,001 | *** | Yes |
| pH | 71,08 | <,001 | *** | Yes |
| Concentración | 12,09 | <,001 | *** | Yes |

Tabla 26. Prueba de comparación múltiple de dunet para la actividad antioxidante en los extractos de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH con diferentes concentraciones con un valor $\alpha =0.05$

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 90,00% CI of diff, | Significant | Summary |
|-------------------------------------|------------|--------------------|-------------|---------|
| 100 ug/ml | | | | |
| pH 3.0 vs. BHT | -8,636 | -9,316 to -7,956 | Yes | *** |
| pH 3.5 vs. BHT | -8,28 | -8,96 to -7,6 | Yes | *** |
| pH 4.0 vs. BHT | -8,577 | -9,257 to -7,897 | Yes | *** |
| pH 4.5 vs. BHT | -10,12 | -10,8 to -9,439 | Yes | *** |
| pH 5.0 vs. BHT | -10,02 | -10,7 to -9,335 | Yes | *** |
| 200 ug/ml | | | | |
| pH 3.0 vs. BHT | -11,87 | -12,55 to -11,19 | Yes | *** |
| pH 3.5 vs. BHT | -14,43 | -15,11 to -13,75 | Yes | *** |
| pH 4.0 vs. BHT | -10,55 | -11,23 to -9,867 | Yes | *** |
| pH 4.5 vs. BHT | -5,06 | -5,74 to -4,379 | Yes | *** |
| pH 5.0 vs. BHT | -8,293 | -8,973 to -7,613 | Yes | *** |

| 1000 ug/ml | | | | |
|----------------|--------|------------------|-----|-----|
| pH 3.0 vs. BHT | -18,15 | -18,83 to -17,47 | Yes | *** |
| pH 3.5 vs. BHT | -13,06 | -13,74 to -12,38 | Yes | *** |
| pH 4.0 vs. BHT | -13,26 | -13,94 to -12,57 | Yes | *** |
| pH 4.5 vs. BHT | -5,928 | -6,608 to -5,248 | Yes | *** |
| pH 5.0 vs. BHT | -11,19 | -11,87 to -10,51 | Yes | *** |
| 2000 ug/ml | | | | |
| pH 3.0 vs. BHT | -17,44 | -18,12 to -16,76 | Yes | *** |
| pH 3.5 vs. BHT | -13,94 | -14,62 to -13,26 | Yes | *** |
| pH 4.0 vs. BHT | -14,89 | -15,57 to -14,21 | Yes | *** |
| pH 4.5 vs. BHT | -15,26 | -15,94 to -14,58 | Yes | *** |
| pH 5.0 vs. BHT | -19,01 | -19,69 to -18,33 | Yes | *** |

Figura 23. Prueba de comparación múltiple de dunnet para la evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de la extracción de proteína de *Ilex guayusa* en diferentes pH en diferentes concentraciones con un valor $\alpha = 0.05$

