



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



**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

---

**Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro, actividad antioxidante y determinación de polifenoles de las proteínas de papillas para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*)**

---

Trabajo de Titulación. Modalidad Proyectos de Investigación, presentado como requisito previo a 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.

**Autora:** Glenda Nataly Pilicita Clavón

**Tutora:** Ing. Liliana Patricia Acurio Arcos M.Sc.

AMBATO – ECUADOR

Octubre – 2017

## **APROBACIÓN DE LA TUTORA**

Ing. Liliana Patricia Acurio Arcos M.Sc.

### **CERTIFICO:**

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

Ambato, 04 de Agosto del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Liliana Acurio', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Ing. Liliana Patricia Acurio Arcos M.Sc.

C.I: 1804067088

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Glenda Nataly Pilicita Clavón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas.



-----  
Glenda Nataly Pilicita Clavón

C.I: 050350707-1

**AUTORA**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

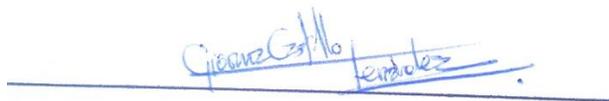


**Presidente del Tribunal**



**Dr. López Hernández Orestes Darío**

**C.I. 175478488-4**



**Mg. Castillo Fernández Giovanna Victoria**

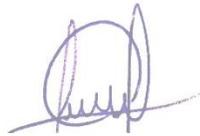
**C.I. 180389187-6**

Ambato, 1 de septiembre del 2017

## **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.



Glenda Nataly Pilicita Clavón

C.I: 050350707-1

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

A Dios y la Virgen Santísima del Cisne por la salud y vida que he recibido en todos estos años y que me han permitido cosechar grandes éxitos.

A mis padres, Luz y Julio, que han sido el pilar fundamental en la consecución de este sueño. Les dedico este triunfo en agradecimiento por cada palabra, consejo y por compartir conmigo cada experiencia. A mis ñaños, Mauro, Andy y Evelin, por brindarme amor incondicional y por apoyarme con todo lo necesario para cumplir esta meta tan anhela.

Además, dedico este trabajo a mi familia Pili, no seremos la familia perfecta pero me es suficiente y grato al tenerlos a todos. Agradezco ese apoyo incondicional en las buenas y malas que siempre me han ofrecido, nunca dejaron de creer en mí, pese a los momentos difíciles que hemos vivido pero siempre sonriéndole a vida hemos salido adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica de Ambato, a la carrera de Ingeniería en Alimentos que me dio la oportunidad de formarme y me ha convertido en una excelente profesional.

A Ing. Dolores Robalino e Ing. Liliana Acurio, autoras del proyecto "Papilla para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papa nativa (*Solanum tuberosum* ssp.), variedades Yema de huevo y Santa rosa sabor a mora y taxo" (Resolución 1149-CU-P-2012), por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por guiarme durante la realización del presente documento.

A los docentes del grupo BIO – PROPEPTI: Ph.D. Ismael Carrillo, Dra. Cecilia Carpio, y Ph.D. Dayana Morales, gracias por su valioso tiempo en el cual transmitieron sus conocimientos e inclusive anécdotas.

A mis amigas, "las benditas", Carla y Estefanía gracias por compartir conmigo cada locura, aunque nunca dejamos de ser responsables. Y a mis "ladys", gracias por esa amistad incondicional durante estos años y espero que siga perdurando muchos años más.

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN .....	1
EL PROBLEMA.....	2
1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	2
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos .....	3
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	4
2.2 HIPÓTESIS.....	6
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES .....	6
2.3.1 Variable Independiente .....	6
2.3.2 Variable Dependiente .....	6
CAPÍTULO III .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1 MATERIALES .....	7
3.1.1 Materia Prima .....	7
3.2 MÉTODOS.....	8
3.2.1 Aislamiento de las proteínas de la papilla .....	8
3.2.2 Caracterización de aislados proteicos .....	8
3.2.2.1 Electroforesis (SDS-PAGE) .....	8
3.2.2.2 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC)	
10	
3.2.3 Cuantificación proteica por el método Dumas.....	10
3.2.4 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro .....	10

3.2.4.1 Digestión gástrica .....	10
3.2.4.2 Digestión Duodenal .....	11
3.2.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos por el método TBARS....	11
3.2.6 Determinación de polifenoles totales.....	12
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	13
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	13
4.1.1 Aislamiento de las proteínas de las papillas .....	13
4.1.2 Caracterización de los concentrados proteicos .....	14
4.1.2.1 Electroforesis (SDS-PAGE).....	14
4.1.2.2 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC) 20	
4.1.3 Cuantificación proteica por el método DUMAS .....	23
4.1.4 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro .....	23
4.1.4.1 Digestión gástrica-duodenal.....	23
4.1.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos por el método TBARS ....	25
4.1.6 Determinación del contenido de polifenoles totales .....	27
4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS .....	28
<b>CAPÍTULO V</b> .....	29
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>5.1 CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	30
<b>ANEXO A:</b> .....	38
<b>A.1. RENDIMIENTO EN EL AISLAMIENTO DE PROTEÍNA</b> .....	38
<b>A.2. DATOS PARA LA CARACTERIZACIÓN PROTEICA POR ELECTROFORESIS</b> .....	39
<b>A.2.1. VALORES DE LA MOVILIDAD RELATIVA</b> .....	40
<b>A.3. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE DUMAS</b> .....	41
<b>A.4. SIMULACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y DUODENAL</b> .....	42

<b>A.5.</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO TBARS.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO B: ILUSTRACIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>B.1</b>	<b>AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>46</b>
<b>B.2</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DUMAS.....</b>	<b>47</b>
<b>B.3</b>	<b>ELECTROFORESIS.....</b>	<b>47</b>
<b>B.4</b>	<b>CROMATOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>B.5</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MÉTODO TBARS.....</b>	<b>48</b>
<b>B.6</b>	<b>POLIFENOLES POR EL MÉTODO FOLIN .....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Formulación papillas .....	7
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento (%) de los aislados proteicos.....	13
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación proteica (%) por método DUMAS .....	23
<b>Tabla 4.</b> Datos promedios de los concentrados proteicos de las papillas .....	38
<b>Tabla 5.</b> Datos estándares para la curva .....	39
<b>Tabla 6.</b> Movilidad relativa de los concentrados proteicos .....	40
<b>Tabla 7.</b> Movilidad relativa de los concentrados proteicos para digestibilidad gástrica y duodenal con 2-β-mercaptoetanol a pH 3,2.....	42
<b>Tabla 8.</b> Datos para el control positivo y negativo .....	42
<b>Tabla 9.</b> Valores promedios de actividad antioxidante de BHT .....	42
<b>Tabla 10.</b> Valores promedios de actividad antioxidante 24 horas .....	43
<b>Tabla 11.</b> Valores promedios de actividad antioxidante 48 horas .....	44
<b>Tabla 12.</b> Valores para la curva estándar GAE a 750 nm.....	45
<b>Tabla 13.</b> Promedio de absorbancia para la determinación de polifenoles.....	45

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Precipitación isoelectrica de la papilla SRM .....	14
<b>Ilustración 2.</b> Gel Native-PAGE YHT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación .....	14
<b>Ilustración 3.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol YHT a pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	15
<b>Ilustración 4</b> Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol YHT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	15
<b>Ilustración 5.</b> Gel Native-PAGE YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación. ....	16
<b>Ilustración 6.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación. ....	16
<b>Ilustración 7.</b> Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	17
<b>Ilustración 8.</b> . Gel Native-PAGE SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación .....	17
<b>Ilustración 9.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	18
<b>Ilustración 10.</b> Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	18
<b>Ilustración 11.</b> Gel Native-PAGE SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación. ....	19
<b>Ilustración 12.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	19
<b>Ilustración 13.</b> Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.....	20
<b>Ilustración 14.</b> Pefiles cromatográficos.....	21
<b>Ilustración 15.</b> Perfiles cromatográficos simulación gástrica (línea negra) y duodenal (línea roja).....	22

<b>Ilustración 16.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol digestión gástrica (G) y duodenal (D) de los concentrados proteicos a pH 3,2. ....	24
<b>Ilustración 17.</b> Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol digestión gástrica (G) y duodenal (D) de los concentrados proteicos a pH 3,2 .....	24
<b>Ilustración 18.</b> Actividad antioxidante YHM (a: 24 horas; b: 48 horas).....	25
<b>Ilustración 19.</b> Actividad antioxidante YHT (a: 24 horas; b: 48 horas).....	26
<b>Ilustración 20.</b> Actividad antioxidante SRM (a: 24 horas; b: 48 horas) .....	26
<b>Ilustración 21.</b> Actividad antioxidante SRT (a: 24 horas; b: 48 horas).....	26
<b>Ilustración 22.</b> Contenido de polifenoles (letras diferentes indican diferencia significativa al 95% de confianza). ....	28
<b>Ilustración 23.</b> Obtención de % proteína por DUMAS .....	41
<b>Ilustración 24.</b> Curva estándar de calibración .....	45
<b>Ilustración 26.</b> Congelación a -80 ° C - Liofilización de muestras .....	46
<b>Ilustración 25.</b> Materia prima - Ajuste del pH .....	46
<b>Ilustración 28.</b> Equipo Bio-Rad (modelo Mini Protean II) .....	47
<b>Ilustración 27.</b> Calcinación de muestras - Elaboración de pastillas .....	47
<b>Ilustración 29.</b> Análisis por UHPLC .....	48
<b>Ilustración 30.</b> Preparación de muestra - Espectrofotómetro .....	48
<b>Ilustración 31.</b> Preparación de las muestras - Espectrofotómetro .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
BCA	ácido bicinconínico
BHT	butilhidroxitolueno
D.S	desviación estándar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	gramos
GAE	equivalente de ácido gálico
h	horas
HCL	ácido clorhídrico
kDa	kilo dalton
M	molar
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
NaOH	hidróxido de sodio
NATIVE	electroforesis nativa
nm	nanómetros
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PSA	persulfato de sodio
rpm	revoluciones por minuto
RP-UHPLC	Reversed phase-high performance liquid (cromatografía líquida de alta eficacia)
SDS	sodio dodecilsulfato
SRM	Santa Rosa con sabor a mora
SRT	Santa Rosa con sabor a taxo
TBARS	ácido 2-tiobarbitúrico
TEMED	tetrametiletilenediamina
TFA	ácido trifluoroacético

uL	Microlitros
V	Voltios
YHM	Yema de huevo con sabor a mora
YHT	Yema de Huevo con sabor a taxo

## RESUMEN

Las papillas para niños deben poseer compuestos nutricionales que aporten a su crecimiento y correcto desarrollo. Por ello, en esta investigación se evaluó la digestibilidad gastrointestinal de cuatro papillas elaboradas a base de harinas de papas nativas ecuatorianas. La cuantificación proteica realizada por el método Dumas determinó que estas papillas poseen un porcentaje de proteína de entre 28,59% a 36,91%, obteniendo mejores rendimientos a pH de solubilización 4. Los perfiles electroforéticos revelaron presencia de albúminas y globulinas (10,92-134,93 kDa) en las muestras evaluadas. El contenido de actividad antioxidante se determinó por el método de Tbars en tiempos de 24 y 48 h, a diferentes concentraciones de concentrados de proteína y pH de precipitación, obteniendo diferencias entre los factores al ser comparados con el antioxidante comercial. La determinación de polifenoles se realizó por el método de Folin, obteniendo mayor contenido de polifenoles a pH 6 para las papillas elaboradas con la variedad Yema de Huevo (411,46 y 410,16 mg AGE/100 g) y a pH 5 para las papillas elaboradas con la variedad Santa Rosa (482,02 y 531,90 mg AGE/100 g).

**Palabras clave:** proteínas, digestibilidad in vitro, actividad antioxidante, polifenoles, papas nativas ecuatorianas, papillas.

## SUMMARY

Baby food must have nutritional compounds that contribute to their growth and normal development. Therefore this research evaluated gastrointestinal digestibility of four processed products made with native Ecuadorian potatoes. The protein quantification performed by the Dumas method determined that these baby foods have a protein percentage of 28.59% to 36.91%, showing better results at solubilization pH of 4. Electrophoretic profiles revealed the presence of albumins and globulins (10.92-134.93 kDa) in the samples evaluated. Antioxidant activity was determined by Tbars method at times of 24 and 48h, at different concentrations of isolated proteins and pH of precipitation, obtaining differences between the factors when compared with the commercial antioxidant. Determination of polyphenols was made by Folin method, obtaining a higher content of polyphenols at pH 6 for baby food made with “Yema de Huevo” variety (411.46 and 410.16 mg AGE/100 g) and at pH 5 for baby food made with “Santa Rosa” variety (482.02 and 531.90 mg AGE/100 g).

**Keywords:** protein, in vitro digestibility, antioxidant activity, polyphenols, native Ecuadorian potatoes, porridge.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es originaria de los andes de Suramérica y es el cuarto cultivo alimenticio de mayor importancia, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, después del trigo, arroz y maíz (**Horton, 1992**). Dentro del extenso catálogo de variedades de papas, existen cultivos nativos característicos de cada país de la región. Estos cultivos despiertan el interés de investigadores debido a que algunas variedades nativas presentan mejores cualidades nutricionales frente a las variedades comerciales. Por ejemplo, la variedad Yema de huevo presenta el doble de contenido de proteína (**Gómez, 2008**).

El desarrollo de productos a partir de papas nativas pretende revalorizar estos cultivos. Y es así que debido a la cantidad de proteína, el proyecto consideró pertinente desarrollar papillas infantiles, con la finalidad de ser el alimento puente entre la lactancia y la alimentación propia, y así contribuir con la correcta alimentación del infante para evitar un desfase nutricional (**Berruezo et al., 2009; Arizaga & Valencia, 2015**).

Dentro del desarrollo del producto es importante conocer la cantidad de nutrientes asimilados por el infante al ingerir un alimento, es por ello que se realizó el estudio de digestibilidad, simulando las fases de la digestión en el ser humano, la primera que consiste en la hidrólisis de las moléculas complejas de cada alimento y la segunda que consiste en la absorción de pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino (**Manríquez, 1994**).

Así mismo, se evaluó la actividad antioxidante de compuestos fenólicos debido a que los antioxidantes contribuyen significativamente en la salud del ser humano, debido a su actividad biológica que actúa en la prevención de algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico (**Zavaleta et al., 2005; Echavarría, 2009**). Y se determinó la cantidad de polifenoles. Estos compuestos son un amplio grupo de sustancias químicas con diferentes actividades biológicas, estructuras y propiedades químicas. Para su respectiva determinación se utilizó el método Folin-Ciocalteu, que se basa en la capacidad de reacción de los fenoles con agentes oxidativos (**Avella et al., 2008**).

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro, actividad antioxidante y determinación de polifenoles de las proteínas de papillas para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*)

### 1.2 JUSTIFICACIÓN

La papa (*Solanum tuberosum L*) es el cuarto cultivo de mayor importancia mundial por ser fuente de carbohidratos digeribles, proteínas, nutrientes esenciales y vitaminas (**Horton, 2016**). Además, posee cantidades importantes de minerales y fitoquímicos (compuestos antioxidantes, ácidos fenólicos, carotenoides) necesarios para el correcto funcionamiento del cuerpo humano (**Suttle, 2008; Reddivari et al., 2007**).

Existen muchas variedades de papas en el mundo entre ellas se encuentran las papas nativas que son cultivos específicos de cada sector. Las papas nativas tienen diversas formas y colores; además aportan mayor cantidad de proteínas y compuestos funcionales (vitamina C, carotenos) frente a las variedades comunes (**Monteros & Reinoso, 2010; Villacrés et al., 2011**). Esta característica nutricional puede ser aprovechada mediante el desarrollo de productos, como por ejemplo papillas infantiles, que pueden desarrollarse con la mezcla de otros vegetales que complementen su calidad alimenticia. En este sentido, **Castro (2015)**, demostró que la mezcla de harinas de cereales, leguminosas y tubérculos aportan un 40% de las necesidades calóricas y 100% de necesidades proteicas de niños de entre 6 a 36 meses.

El estudio pretendió evaluar si la digestibilidad en las papillas instantáneas es más elevada frente a un alimento crudo, debido a que el tratamiento térmico aplicado puede permitir la disminución de factores anti nutricionales mejorando así la digestibilidad (**Alvarado, 2004**).

Por otra parte, se evaluó la actividad antioxidante, debido a que es una característica importante de los alimentos por su carácter protector frente a las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Porrás & López, 2009). Y la cantidad de polifenoles debido a que se relacionan con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal tanto en fresco como procesado (Martínez et al., 2000).

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar la digestibilidad gastrointestinal in vitro, actividad antioxidante y polifenoles de las proteínas de papillas para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*)

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la digestibilidad gastrointestinal in vitro de las proteínas de papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas simulando condiciones fisiológicas humanas.
- Determinar la actividad antioxidante de las proteínas de papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas utilizando el método TBARS (ácido 2- tiobabitúrico).
- Determinar la cantidad de polifenoles totales presentes en papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Las papas nativas tienen alta demanda por sus propiedades organolépticas (sabor, color, textura y forma). Además, tienen un alto contenido de proteínas y sustancias antioxidantes naturales (carotenoides, flavonoides y antocianinas) frente a variedades comerciales (**López et al., 1998; Bonierbale et al., 2004**). En Ecuador las papas nativas más cultivadas son las variedades Yema de huevo, Uvilla, Leona negra, Coneja negra y Santa rosa. Las zonas de mayor producción son las provincias de Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar y Chimborazo (**Monteros et al., 2005**).

La ventaja principal de la utilización de papa en la formulación de diversos productos es su disponibilidad durante todo el año. Por ejemplo, la harina de papa ha sido incluida en el desarrollo de diferentes alimentos teniendo resultados importantes. La utilización de harina de papa como sustituto parcial de harina de trigo en la elaboración de pan tipo enrollado ha dado buenos resultados sensoriales con una sustitución del 20% (**Villavicencio & Zavala, 2015**). Asimismo, **Pazuña (2011)** mostró que los fideos elaborados con sustitución de harina de papa (20% papa y 80% trigo) presentan mayor aceptabilidad en los consumidores en comparación de los fideos de harina de quinua (30% quinua y 70% trigo) y de harina de trigo importado (100%). Además, **Coloma (2012)**, comprobó que la variedad nativa Yema de huevo permite desarrollar tortillas precocidas enriquecidas con pasta de amaranto blanco (*Amaranthus albus*) (25 y 30%) con gran aceptabilidad por parte de los catadores frente a las otras variedades estudiadas (Chaucha roja y Leona negra).

Por otra parte, la papilla es un alimento de consistencia cremosa que se les da a los niños de corta edad (6 meses a 3 años) e inclusive a personas con problemas de digestión (**Ramírez et al., 2014**). Las papillas para niños deben poseer compuestos nutricionales que aporten a su crecimiento y correcto desarrollo. Sin embargo, sin un estudio de digestibilidad gastrointestinal se desconocería la cantidad de nutrientes que pueden ser asimilados por el infante durante el consumo del producto. La digestibilidad de la proteína se puede estimar por métodos biológicos, químicos y enzimáticos; éste último es el más utilizado ya que simula al organismo digiriendo las proteínas

con enzimas (pepsina y pancreatina) o la vez una mezcla (tripsina, quimotripsina y peptidasa) **(Cerón, 2006)**.

Complementariamente se debe determinar las proteínas presentes en mayor cantidad en el alimento, para ello se usa la electroforesis. Éste es un método analítico semi-preparativo en el que se separan biomoléculas de acuerdo a su carga y masa molecular mediante un campo eléctrico. Fue empleado por primera vez por Tiselius en 1937 y perfeccionado rápidamente hasta lograr la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) **(Pérez, 2000)**. Por otro lado, la cuantificación de antioxidantes es de importancia científica debido a que estos compuestos permiten mantener las condiciones fisiológicas óptimas en el ser humano **(García et al., 2011)**. Por ejemplo, pueden disminuir o retardar las reacciones de oxidación, pueden neutralizar radicales libres y retardar la descomposición de peróxidos **(Montoya et al., 2009)**. Dicha actividad antioxidante se debe a las propiedades redox de éstos compuestos **(Porrás & López, 2009)**. La determinación de antioxidantes por el método espectrofotométrico del radical catiónico ABTS<sup>+</sup> es el más usado en la determinación de la actividad antioxidante total, tanto para extractos puros, mezclas acuosas y bebidas **(Re et al., 1999)**.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas ya que en su estructura poseen varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas **(Maureen & Prieto, 1999)**. Los efectos de la ingesta de polifenoles son beneficiosos en la salud ya que actúan en procesos celulares contribuyendo al sistema cardiovascular, este efecto se debe a sus propiedades antioxidantes **(Quiñones et al., 2012)**. La determinación de polifenoles se realiza comúnmente por el método de Folin-Ciocalteu mediante reacción redox, en el que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. Una ventaja importante de éste método es que es preciso y sensible **(García et al., 2015)**.

## **2.2 HIPÓTESIS**

### **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

El pH de precipitación aplicado no influye sobre el rendimiento de proteínas, actividad antioxidante y contenido de polifenoles de las papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*).

### **Hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>)**

El pH de precipitación aplicado influye sobre el rendimiento de proteínas, actividad antioxidante y contenido de polifenoles de las papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*).

## **2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES**

### **2.3.1 Variable Independiente**

- pH de precipitación (pH: 3, 4, 5 y 6)

### **2.3.2 Variable Dependiente**

- Rendimiento de proteína
- Digestión gástrica y duodenal
- Actividad antioxidante
- Contenido de polifenoles

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Materia Prima

La investigación forma parte del proyecto “Papilla para niños de 6 a 36 meses a base de harina de papa nativa (*Solanum tuberosum ssp.*) variedades Yema de huevo y Santa rosa con sabor a mora y taxo” financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Técnica de Ambato (resolución 1149-CU-P-2012). Para la elaboración se siguió el método reportado por **Robalino et al. (2014)**, considerando las variables: papa nativa (YH: Yema de huevo y SR: Santa rosa) y pulpa de fruta (T: taxo y M: mora) (Tabla 1). Siendo así: Yema de huevo con sabor a mora (YHM), Yema de huevo con sabor a taxo (YHT), Santa rosa con sabor a mora (SRM), Santa rosa con sabor a taxo (SRT).

**Tabla 1.** Formulación papillas

<b>Material</b>	<b>Porcentaje</b>
Variedad de papa (Santa rosa/Yema de huevo)	38,61
Pulpa de fruta (mora/taxo)	17,98
Harina de arroz	10,58
Leche en polvo	9,88
Harina de maíz	6,52
Malta de cebada líquida	5,50
Aceite de girasol	5,08
Yema de huevo	3,22
Leche de soya	1,76
Fosfato tricálcico	0,53
Piro fosfato férrico	0,25
Mezcla de vitaminas/minerals	0,09
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Aislamiento de las proteínas de la papilla**

Se utilizó el método de precipitación isoelectrica siguiendo el protocolo reportado por **Martínez & Añón (1996)**, con modificaciones. Se pesó 10 g de papilla y se añadió 10 mL de agua destilada. Se ajustó a pH 8 con una solución de NaOH 1 M y se agitó durante 1 h.

Las muestras se centrifugaron a 4400 rpm/30 min. Los sobrenadantes se ajustaron a pH: 3, 4, 5 y 6 con una solución de HCl 1 M. Se dejó reposar en una refrigeradora a 4 °C por 12 h para lograr la separación de fases. Posteriormente los sobrenadantes se refrigeraron (4 °C) y los concentrados se congelaron a -80 °C y se liofilizaron. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.2.2 Caracterización de aislados proteicos**

#### **3.2.2.1 Electroforesis (SDS-PAGE)**

Se utilizó la metodología descrita por **Laemmli (1970)**, con modificaciones. La técnica consiste en la utilización de un gel de Dodecil sulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE) que es sometido a campo eléctrico de 200 voltios en un equipo Bio-Rad (modelo Mini Protean II).

#### **a. Preparación de la muestra**

En tubos de 1,5 mL se pesaron 10 mg de los concentrados proteicos a los diferentes pH de precipitación (3, 4, 5, y 6) y se añadió 1 mL de agua destilada. Se agitó y se mezcló 200 µL de las soluciones con 200 µL de buffer native, 200 µL buffer con 2-β-mercaptoetanol y 200 µL buffer sin 2-β-mercaptoetanol, y se incubó a 90 °C por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 500 rpm y se almacenó a -20 °C hasta la determinación.

#### **a.1. Preparación de buffer nativa**

Se mezcló 4,8 mL agua destilada; 2 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1 mL de glicerol puro y una punta de espátula de azul de bromofenol.

### **a.2. Preparación de buffer con 2-β-mercaptoetanol**

Se mezcló 4,8 mL de agua destilada; 2 mL de Tris-HCL 0,5 M pH 6,8; 1 mL de glicerol puro, 2 mL de SDS al 10%, 0,6 mL de 2-ME y una punta de espátula de azul de bromofenol.

### **a.3. Preparación de buffer sin 2-β-mercaptoetanol**

Se mezcló 4,8 mL de agua destilada; 2 mL de Tris-HCL 0,5 M pH 6,8, 1 mL de glicerol puro, 2 mL de SDS al 10% y una punta de espátula de azul de bromofenol.

## **b. Preparación de los geles**

El gel inferior se preparó a 16% de concentración (1,2 mL agua destilada, 1,3 mL Tris HCL pH 8,8 1 M, 2,7 mL de acrilamida al 30%, 75 μL SDS al 10%, 10 μL TEMED y 20 μL PSA). El gel superior se preparó a 4% de concentración (2,2 mL agua destilada, 0,42 mL Tris HCl pH 6,8 1 M, 0,7 mL acrilamida al 30%, 3,3 μL SDS al 10%, 6 μL TEMED y 20 μL PSA), formando así un solo gel de 1 mm de espesor.

### **b.1. Preparación de la solución buffer running**

Se mezcló 3 g de Tris-HCl, 15 g de glicina y 1 g de SDS en un litro de agua destilada. Esta preparación se utilizó para los geles con y sin 2-β-mercaptoetanol.

### **b.2. Preparación de la solución nativa**

Se mezcló 3 g de Tris-HCl y 15 g de glicina en un litro de agua destilada.

### **b.3. Análisis de las muestras**

Los geles se ubicaron en el equipo de electroforesis mini-protean Tetra System BIO-RAD con las soluciones de buffer running y buffer native. En los geles se colocó 15 μL de las muestras preparadas y se analizó con un voltaje continuo de 200 V por 30 min. Posteriormente los geles se llevaron a una solución de azul Coomassie (0,1 g de azul de Coomassie R 250, 50 mL de metanol, 10 mL ácido acético glacial y 40 mL de agua destilada) por 2 horas a 350 rpm. Finalmente los geles se llevaron a una solución de desteñido (50 % metanol, 5 % de ácido acético glacial y 45 % agua destilada) y se fotografiaron. Para la interpretación se midió la distancia de

cada banda y se determinó la medida convencional de movilidad de la proteína relativa frente a la migración (RF). Los valores RF se compararon con los pesos moleculares estándares.

### **3.2.2.2 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC)**

Los concentrados proteicos de las papillas fueron analizados mediante la técnica RP-UHPLC, el cual, se pesó 5 mg de concentrado proteico y se añadió 1 mL de agua Milli-Q en tubos de 1,5 mL. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min y se filtraron con membranas de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  en los viales correspondientes, posteriormente los viales se cerraron mediante presión. Los viales se trasladaron al equipo Agilent technologies -1200 infinity series. Se trabajó con una fase A con agua Milli-Q y 0,27 % de TFA y una fase B con metanol y 0,37% de TFA. El gradiente de trabajo fue de 0% B hasta 70% B en una tiempo de 12 min con un flujo de 1 mL/min. Finalmente se obtuvieron los cromatogramas de las muestras.

### **3.2.3 Cuantificación proteica por el método Dumas**

Se utilizó la metodología descrita por **Bellomonte et al. (1987)**. El método permite la cuantificación de nitrógeno orgánico y nitrógeno inorgánico, y tiene la ventaja de no poner en riesgo al analista con ácidos fuertes en comparación con el método Kjeldahl.

Se realizó una curva de calibración con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a concentraciones de 10 a 100 mg. La curva estándar se analizó hasta obtener un coeficiente de determinación de 0,999.

Para la determinación con las muestras se pesó 50 mg del concentrado proteico y se formó una pastilla bajo presión. Las pastillas se colocaron en los carretes correspondientes para su respectiva calcinación. Finalmente se obtuvo las mediciones de cada muestra.

### **3.2.4 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro**

#### **3.2.4.1 Digestión gástrica**

Se aplicó el método descrito por **Jiménez-Saiz (2012)**, con modificaciones. Para la simulación se trabajó con los concentrados proteicos del mejor rendimiento de extracción (pH 4). Se pesó 10 mg

del concentrado proteico en tubos de 1,5 mL y se añadió 1 mL de SGF (cloruro de sodio 0,35 M pH 3,2) y 100 µL de solución pepsina U/mg.

La mezcla se agitó y se incubó a 37 °C por 1 h a 500 rpm. Para detener la reacción se añadieron 200 µL de una solución de bicarbonato de sodio 1 M y se incubó a 90 °C por 10 min a 500 rpm. Finalmente para realizar el análisis de electroforesis SDS-PAGE en 200 µL de la solución anterior se añadió 200 µL de buffer con 2-β-mercaptoetanol y se calentó a 90 °C por 5 min a 500 rpm.

#### **3.2.4.2 Digestión Duodenal**

En 10 mg de concentrado proteico se añadió 1 mL de SGF (cloruro de sodio 0,35 M pH 3,2) y 100 µL de solución pepsina U/mg. Se agitó y se incubó a 37 °C por 1 h a 500 rpm. Posteriormente en 1 mL de solución anterior se añadió 1 mL de pancreatina 100 U/mg y se incubó a 37°C por 2 h a 500 rpm; recorrido ese tiempo se elevó la temperatura a 90 °C por 10 min a 500 rpm. Finalmente para realizar el análisis de electroforesis SDS- PAGE a 200 µL de la solución anterior se añadió 200 µL de buffer con 2-β-mercaptoetanol y se llevó a calentamiento de 90 °C por 5 min a 500 rpm.

#### **3.2.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos por el método TBARS**

Se aplicó el método TBARS descrito por **Guzmán- Chozas et al. (1997)**, con modificaciones.

Se prepararon soluciones de concentrados proteicos en agua destilada (0,2; 0,4; 1 y 2 µg/mL). En tubos de 2 mL se colocaron 500 µL de las soluciones anteriores y 500 µL de aceite de oliva oxidado, y se llevaron a un calentamiento a 28 °C durante 24 y 48 horas. Posteriormente, se añadió 1 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 1% (0,5 g TBA, 40 mL de ácido acético y 10 mL agua destilada), y se realizó un control positivo (1 mL de aceite oxidado y 1 mL de TBA al 1%) y un control negativo (1 mL de aceite no oxidado y 1 mL de TBA al 1%). La mezcla se calentó a 95 °C por 1 h a 300 rpm seguido de un enfriamiento en agua helada por 5 min. Finalmente, se leyó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 532 nm. El proceso se repitió para las diferentes concentraciones y para un blanco con BHT. La determinación se realizó a 24 y 48 horas a pH de precipitación de: 3, 4, 5 y 6.

### **3.2.6 Determinación de polifenoles totales**

Se utilizó la metodología descrita por **Vasco et al. (2008)**, con modificaciones. Se utilizaron los sobrenadantes a cada pH (3, 4, 5 y 6). Se colocó 0,1 mL de muestra en un balón de aforo de 5 mL y se añadió 0,1 ml de Folin-Ciocalteu. La mezcla se agitó por 3 min en un Vortex y se añadió 2 ml de Bicarbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 7,5% y se aforó con agua destilada. Las preparaciones reposaron por 1 hora a temperatura ambiente y se llevaron a un espectrofotómetro a 750 nm de absorbancia. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

##### 4.1.1 Aislamiento de las proteínas de las papillas

Para la obtención de los concentrados proteicos de las papillas se trabajó a pH de solubilización igual a 8, debido a que **Callisaya et al. (2009)** mencionan que trabajar con pH alcalinos (mayor a 9) afecta los aminoácidos azufrados (lisina) e inclusive llega a desnaturalizar e hidrolizar las proteínas, obteniendo así un concentrado proteico de baja calidad.

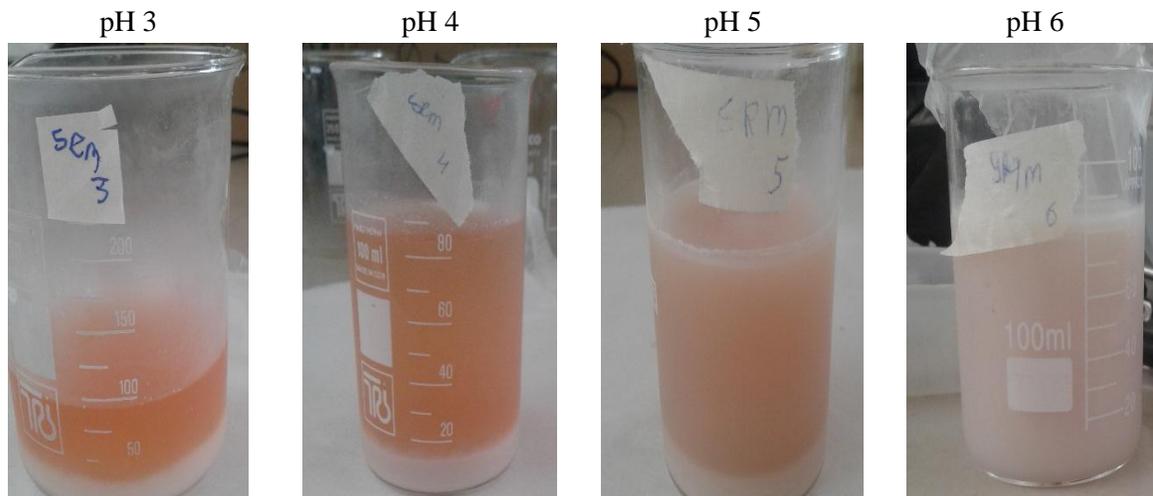
En las cuatro muestras evaluadas se observó mayor rendimiento al trabajar a pH de precipitación 4 (Tabla 2). Por el contrario, a pH 6 se observó menor rendimiento en todas las muestras, con diferencia significativa con los otros valores de pH (3, 4 y 5). Similar al presente estudio **Munive (2009)**, demostró que la precipitación ácida (pH 4,5) permite obtener mayor rendimiento (82,96%) en hidrolizados de soya y maíz, debido al punto isoelectrico de las proteínas predominantes en la muestra. Una vez realizado el análisis por electroforesis se encuentra relación con el rendimiento hallado, debido a que las muestras contienen globulina y patatina, con un punto isoelectrico de 4,2-4,8 y 4,5-5,2 respectivamente (**Domínguez, 2006; Van Koningsveld, 2001**).

**Tabla 2.** Rendimiento (%) de los aislados proteicos

	YHM	YHT	SRM	SRT
pH 3	6,16 ± 1,21 <sup>b</sup>	5,31 ± 1,02 <sup>b</sup>	3,88 ± 0,75 <sup>b</sup>	3,81 ± 0,34 <sup>b</sup>
pH 4	6,43 ± 1,50 <sup>b</sup>	5,55 ± 0,79 <sup>b</sup>	4,16 ± 0,89 <sup>b</sup>	4,40 ± 1,31 <sup>b</sup>
pH 5	5,06 ± 0,86 <sup>b</sup>	4,75 ± 0,44 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,43 <sup>b</sup>	3,29 ± 0,79 <sup>b</sup>
pH 6	0,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,11 <sup>a</sup>

\*Promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativa al 95% de confianza evaluado mediante test Tukey.

Nótese en la Ilustración 1 la cantidad de precipitado formado a cada pH evaluado (3, 4, 5 y 6). El mayor rendimiento obtenido a pH 4 es evidente y se observó similar comportamiento en las cuatro muestras evaluadas.

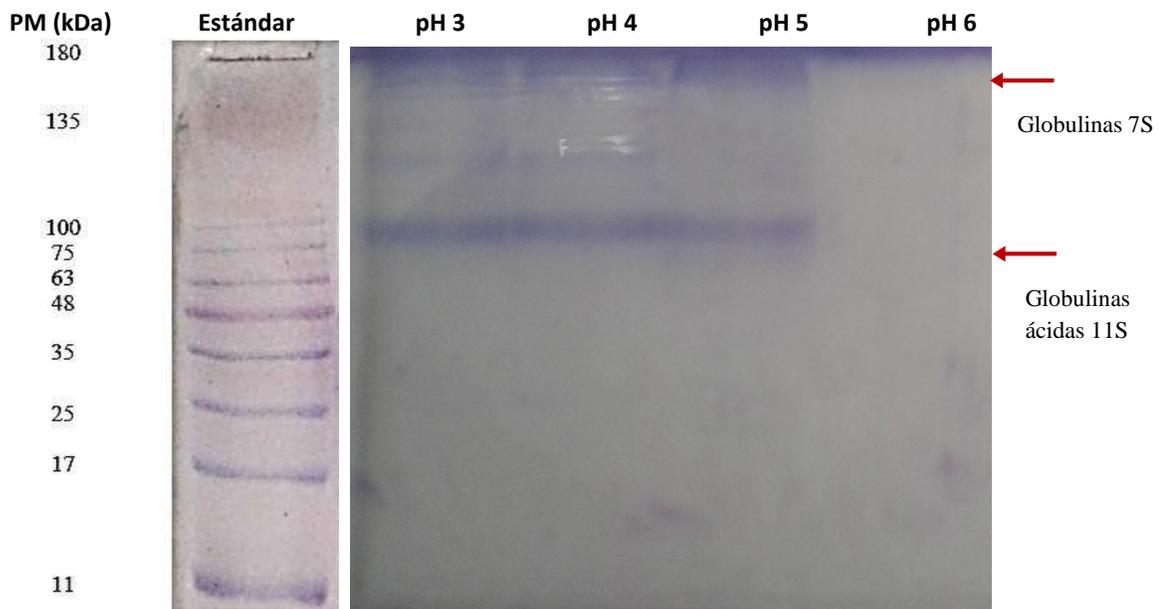


**Ilustración 1.** Precipitación isoelectrica de la papilla SRM

#### 4.1.2 Caracterización de los concentrados proteicos

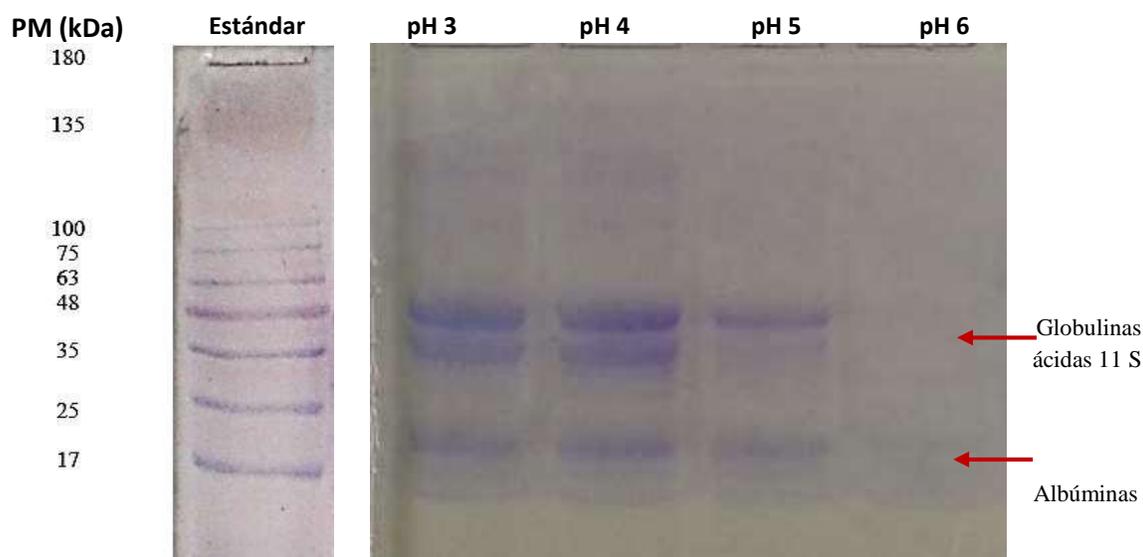
##### 4.1.2.1 Electroforesis (SDS-PAGE)

En la muestra YHT se observan dos bandas a una rango de peso molecular entre 117 - 134,9 kDa que podrían corresponden a globulinas 7 S que se poseen peso moleculares de entre 150– 190 kDa (Shewry et al., 1995). Además, se encuentran bandas a un rango de 34 - 77,8 kDa que corresponden a globulinas ácidas 11 S (37 - 40 kDa). Tendencia similar se observó a pH 3, 4 y 5, en los tres tipos de geles evaluados (Ilustración 2, 3 y 4).

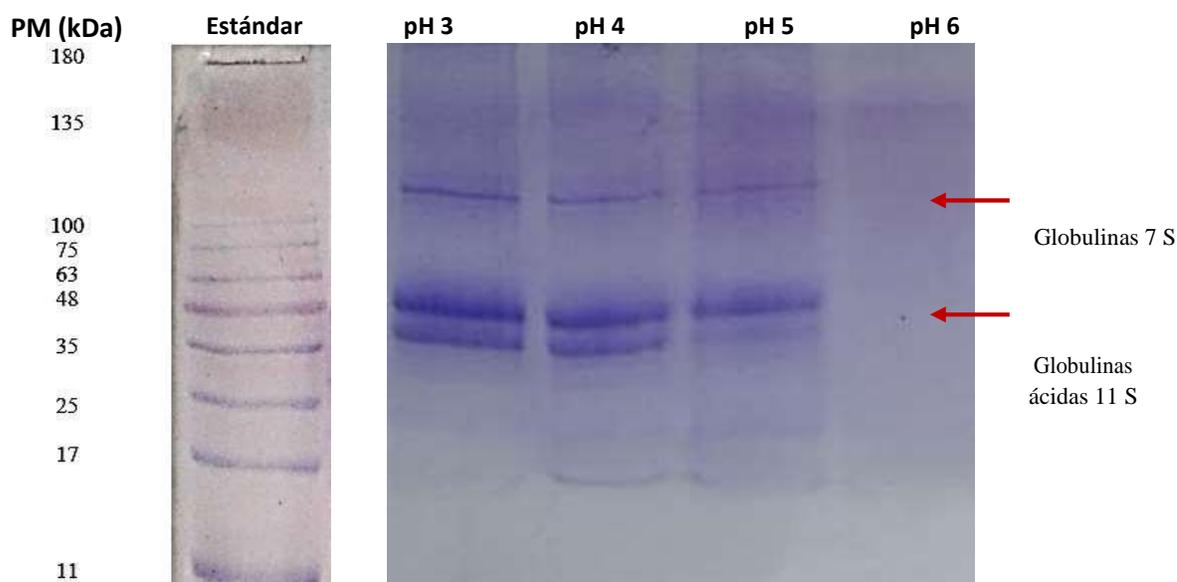


**Ilustración 2.** Gel Native-PAGE YHT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación

En la determinación realizada con el agente reductor (2-β-mercaptoetanol) se observan bandas más claras, debido a que el agente reductor permite la ruptura de los puentes disulfuro (Carrillo et al., 2013). Además, aparece una banda a un peso molecular de 14,9 kDa que podría corresponder a albúminas 2 S que presentan peso molecular menor a 14 kDa (Abdel-Aal et al., 1997) (Ilustración 3). A pH 6 no se observa ninguna banda en los tres tipos de geles trabajados.

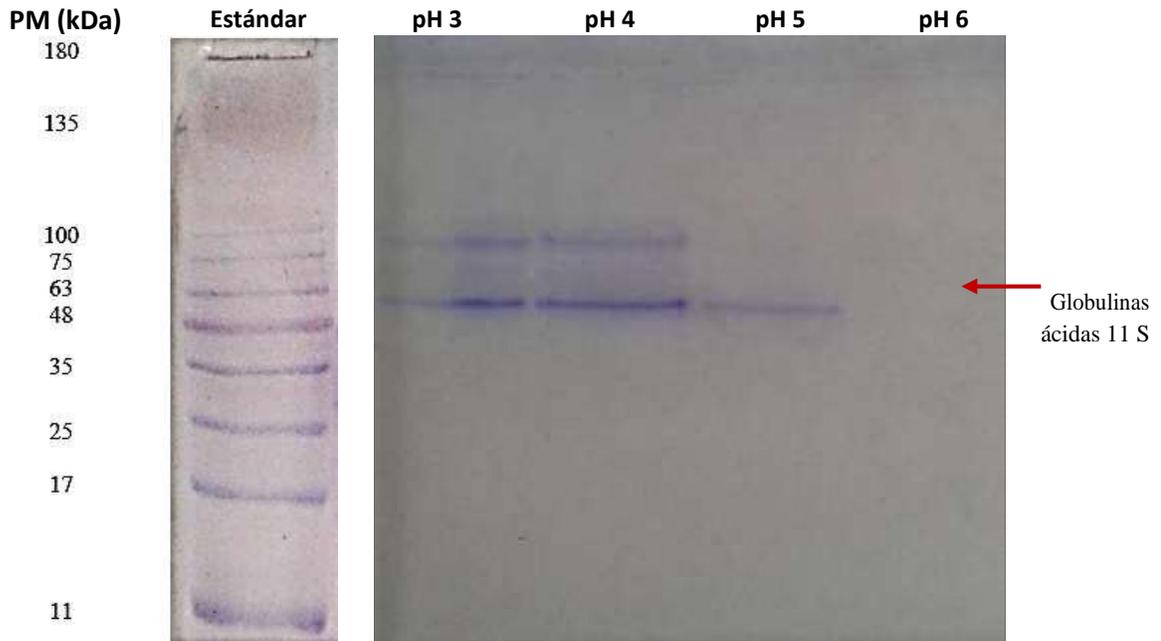


**Ilustración 3.** Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol YHT a pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

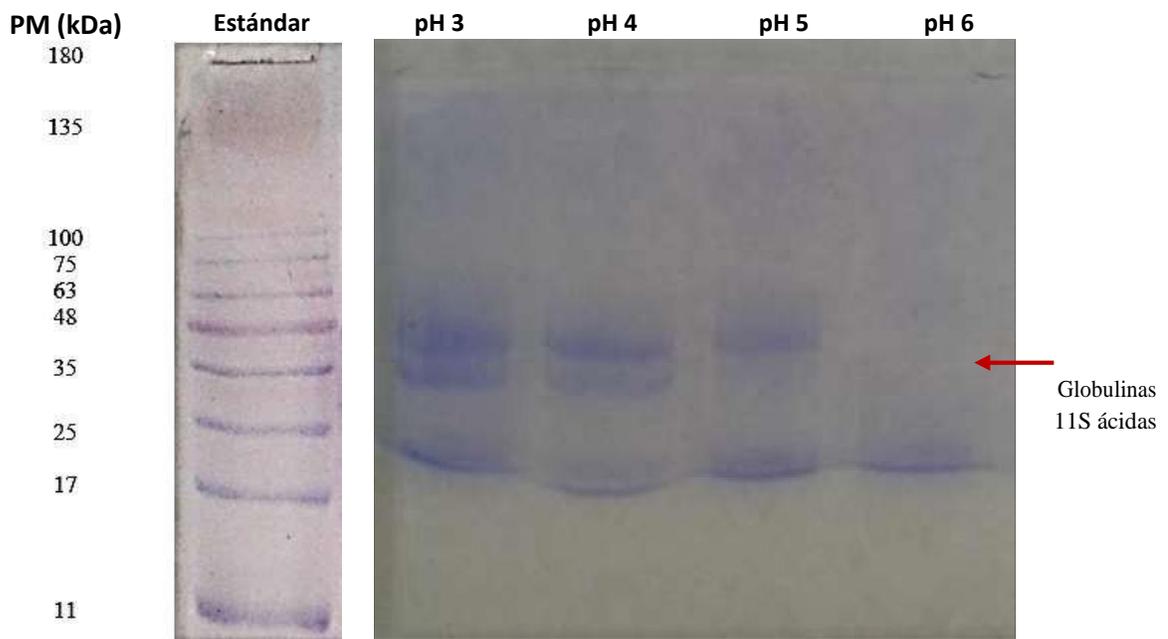


**Ilustración 4.** Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol YHT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

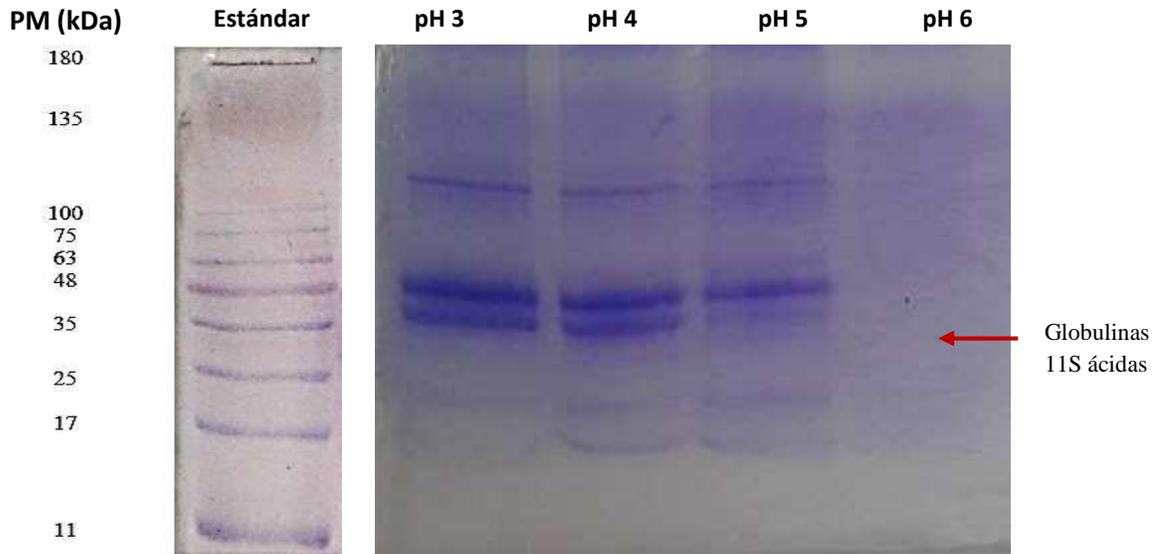
En el caso de YHM se observan bandas a una rango de peso molecular entre 26,8 – 89,3 kDa correspondientes a globulinas ácidas 11 S, a pH 3, 4 y 5 en los tres tipos de geles evaluados (Ilustración 5, 6 y 7). Similarmente a la muestra YHM, no se observa ninguna banda a pH de solubilización 6 en los tres tipos de geles trabajados.



**Ilustración 5.** Gel Native-PAGE YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

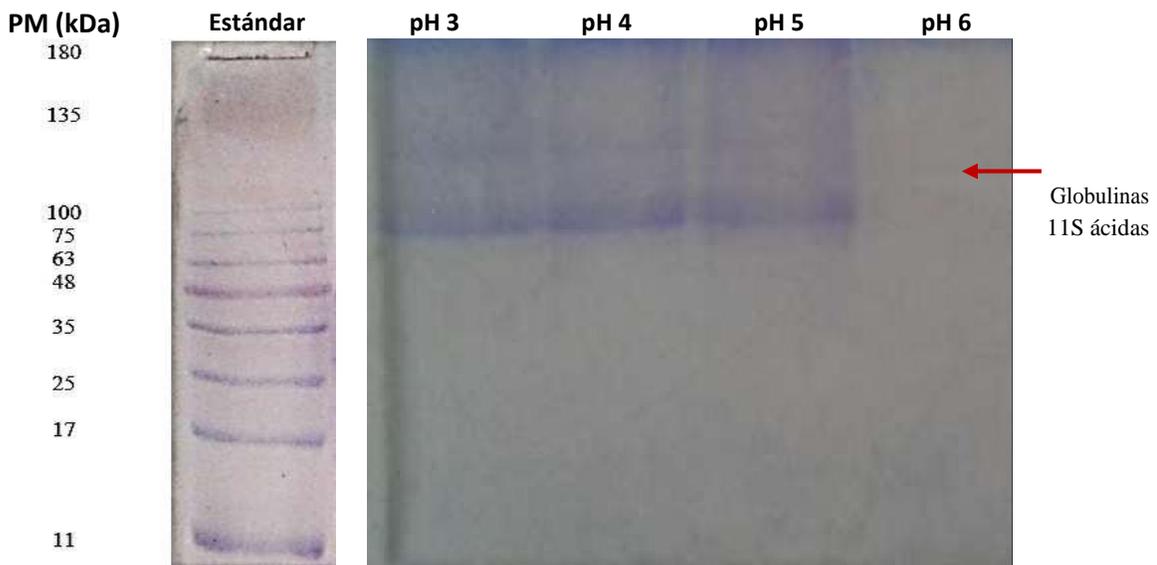


**Ilustración 6.** Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

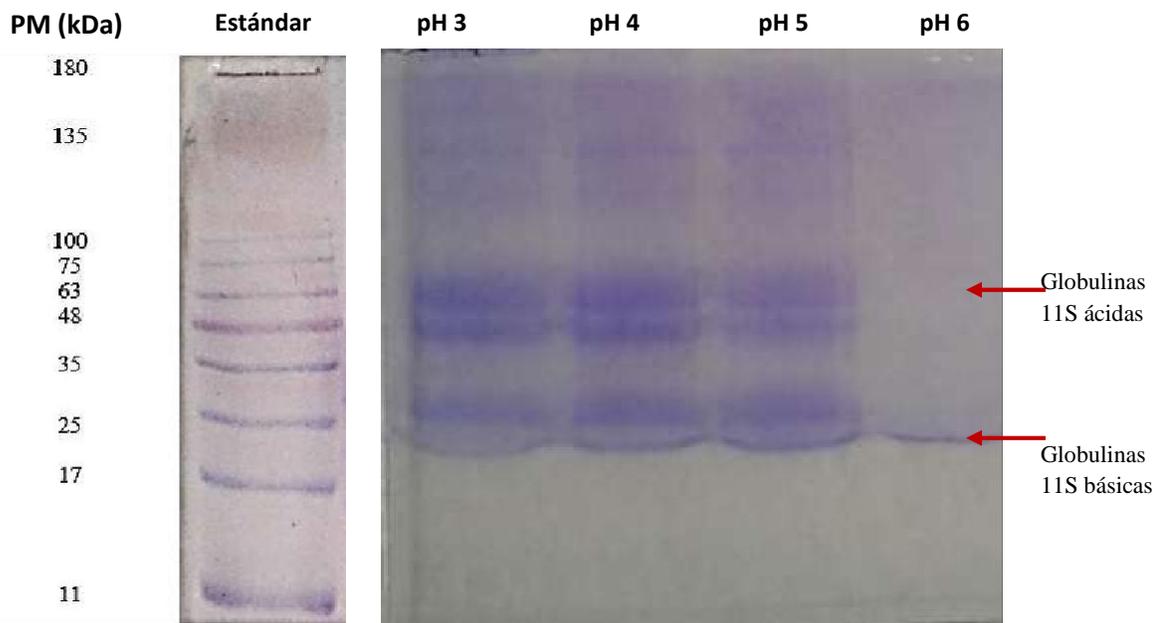


**Ilustración 7.** Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol YHM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

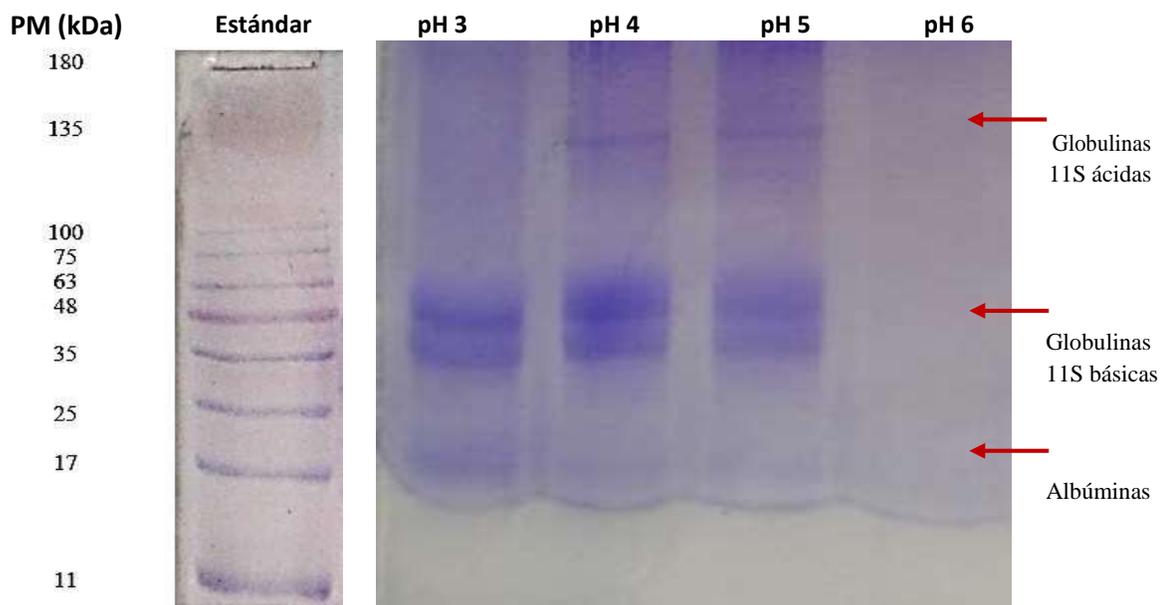
En la muestra SRT se observan bandas a una rango de 35,4 – 93,3 kDa que corresponden a globulinas ácidas 11 S. Además se observan bandas a un rango de 15,4 – 25 kDa correspondientes a globulinas básicas 11 S (20 kDa) (Shewry et al., 1995). Tendencia similar se observó a pH 3, 4 y 5, en los tres tipos de geles evaluados (Ilustración 8, 9 y 10). Además, aparece una banda que corresponde a proteínas con un peso molecular de 10,9 kDa, que podría corresponder a albúminas 2 S que presentan peso molecular menor a 14 kDa (Abdel-Aal et al., 1997) (Ilustración 10). A pH 6 no se observa ninguna banda en los tres tipos de geles trabajados.



**Ilustración 8.** Gel Native-PAGE SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación



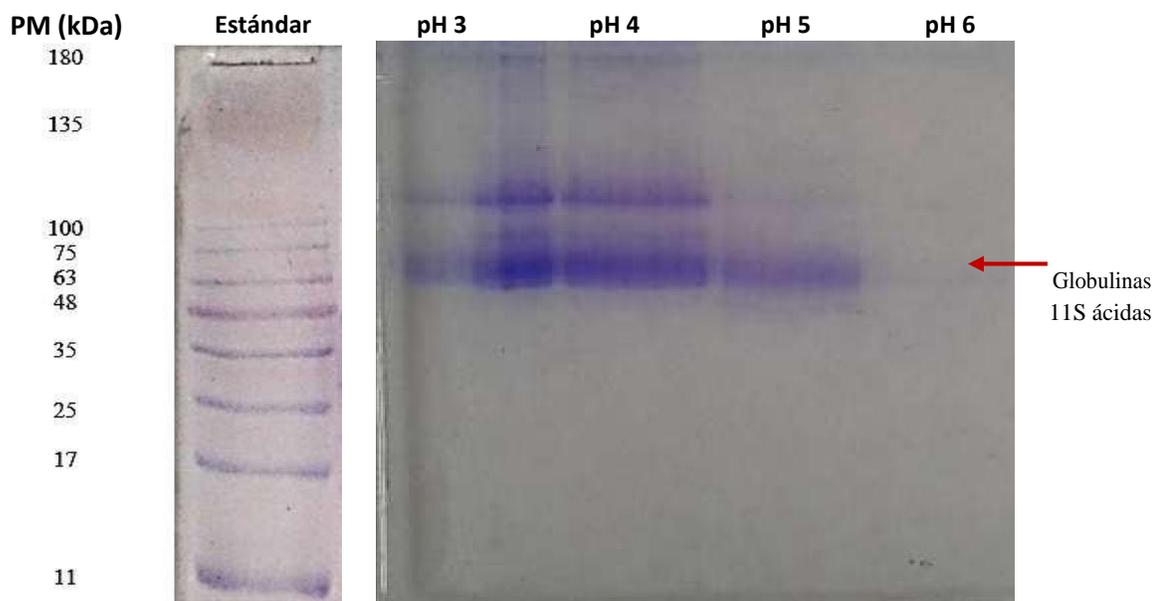
**Ilustración 9.** Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.



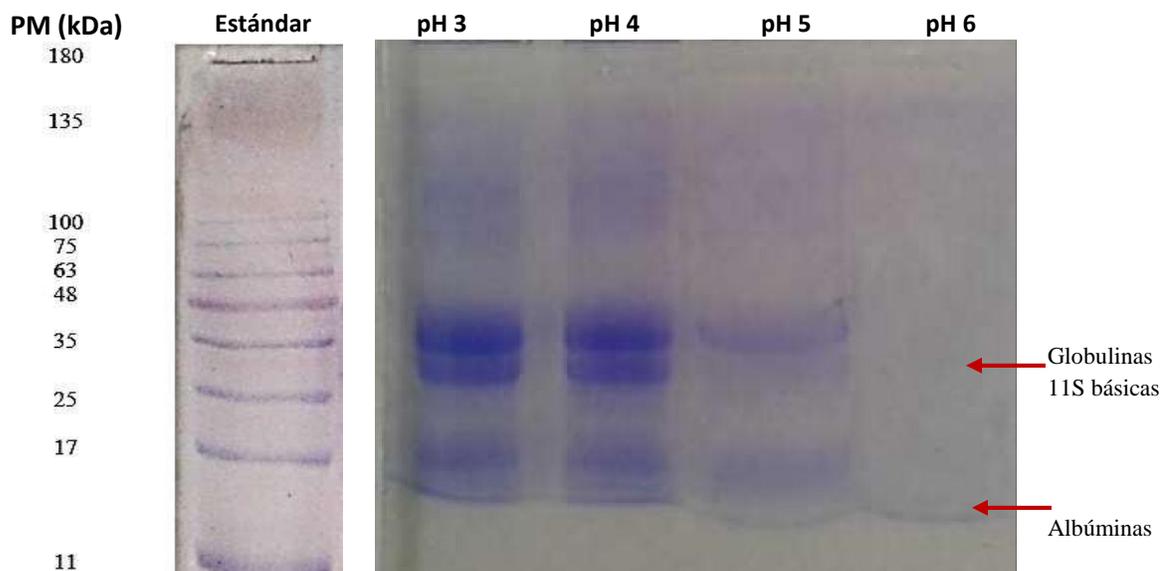
**Ilustración 10.** Gel SDS-PAGE sin 2-β-mercaptoetanol SRT pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

En la muestra SRM se observan bandas a un rango de peso molecular entre 30,8 - 100 kDa que corresponden a globulinas 11 S ácidas. Además, se visualizan bandas a un rango de 21,8 – 26,8 kDa correspondientes a las globulinas 11 S básicas. Tendencia similar se observó a pH 3, 4 y 5, en los tres tipos de geles evaluados (Ilustración 11, 12 y 13).

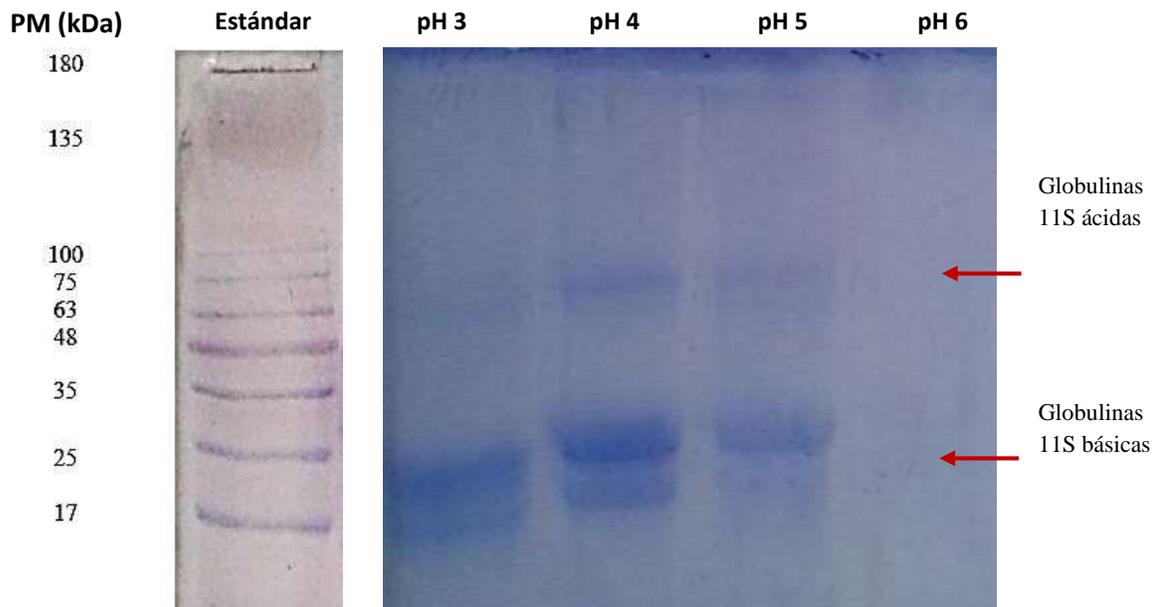
En la determinación realizada con el agente reductor (2-β-mercaptoetanol) se observan bandas más marcadas; además, aparece una banda que corresponde a proteínas con un peso molecular de 11,7 kDa, que podría corresponder a albúminas 2 S que presentan peso molecular menor a 14 kDa (Abdel-Aal et al., 1997) (Ilustración 12). Este efecto es debido a que el agente reductor actuó en la ruptura de los puentes disulfuro. A pH 6 no se observa ninguna banda en los tres tipos de geles trabajados.



**Ilustración 11.** Gel Native-PAGE SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.



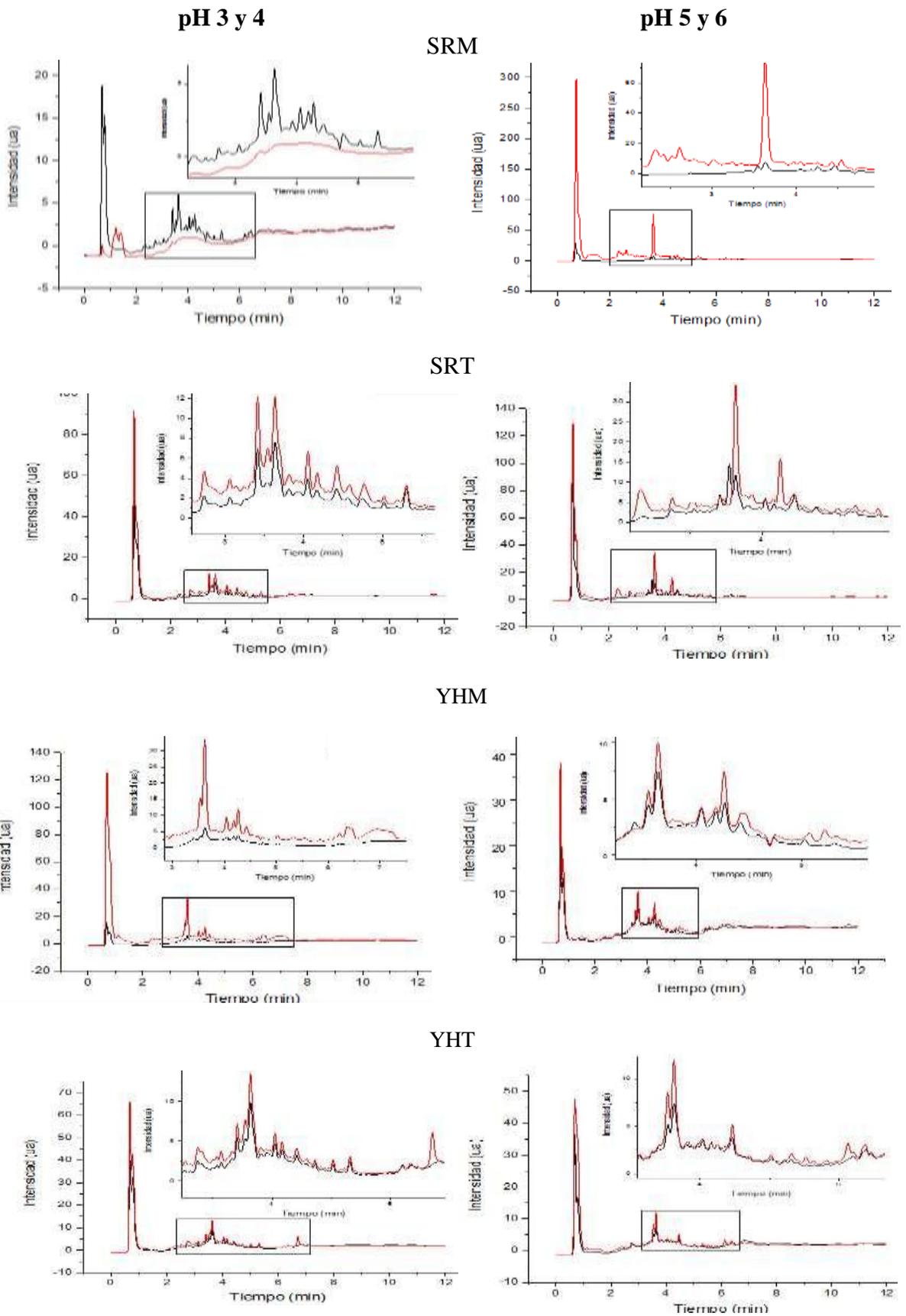
**Ilustración 12.** Gel SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.



**Ilustración 13.** Gel SDS-PAGE sin 2- $\beta$ -mercaptoetanol SRM pH de solubilización 8 y diferentes pH de precipitación.

#### 4.1.2.2 Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa (RP-UHPLC)

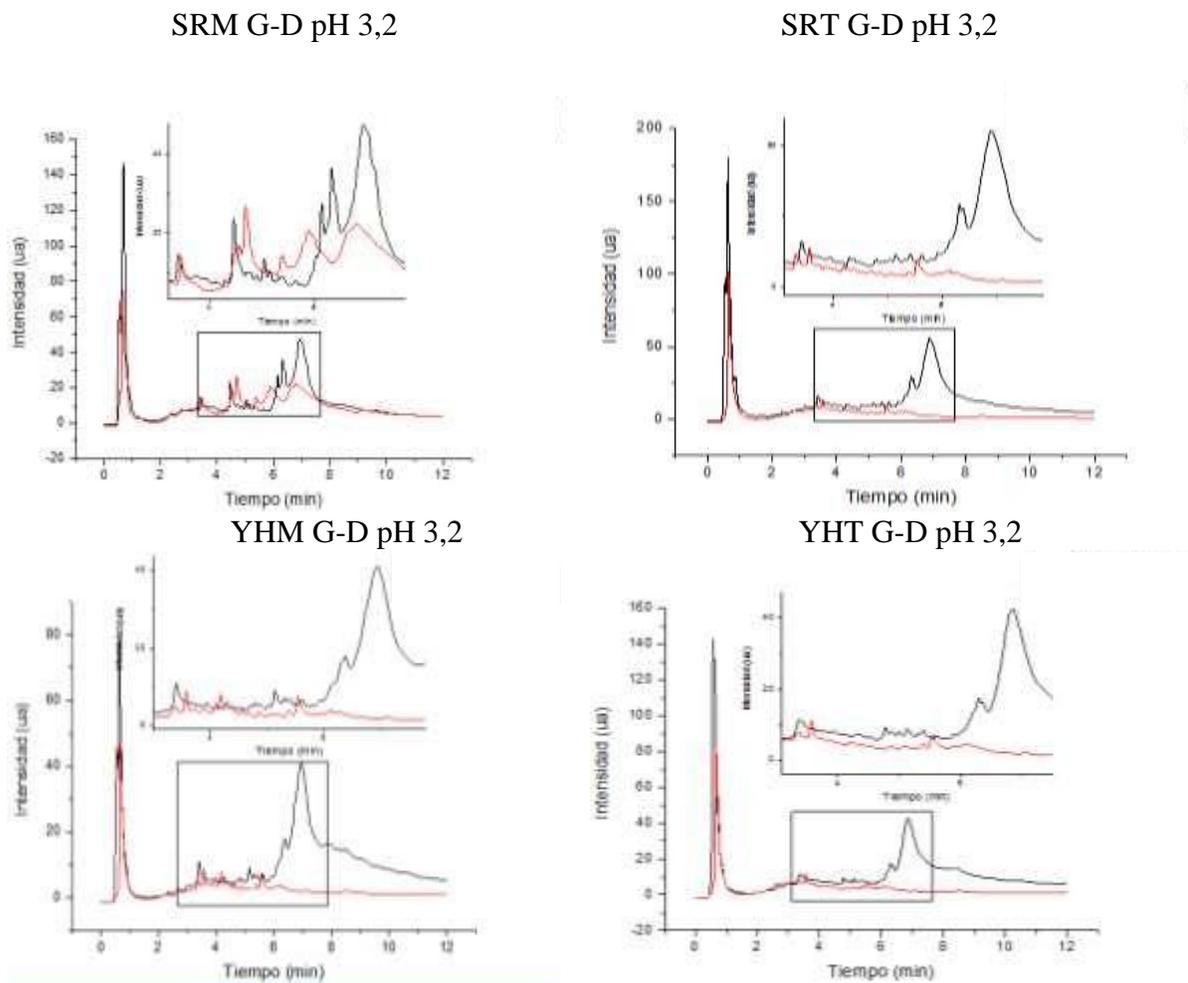
La Ilustración 14 muestra los cromatogramas para todas las muestras evaluadas. Para la muestra SRM, SRT, YHM y YHT a los pH de precipitación trabajados de 3, 4, 5 y 6 se pueden visualizar la variación de las intensidades (menores de 50 Ua) y la formación de picos altos y bajos a partir de tiempos mayores de 2 minutos ya que el primer pico que aparece en todos los perfiles cromatográficos antes del minuto 2 se omite porque es el tiempo muerto (elución de la fase móvil), estos picos empiezan a formarse a partir de los 2 hasta los 12 min aproximadamente. En todos los concentrados proteicos a todos los pH analizados, se observa un pico similar con un tiempo de retención de 3,6 min aproximadamente. Los aminoácidos se clasifican: hidrófilos (polares) e hidrófobos (apolares) (Voet & Voet, 2006), mediante esta clasificación se podría mencionar que los primero picos que se fueron formando pertenecen a péptidos polares seguidamente de los péptidos apolares. Campos et al. (2003), en su investigación utilizando la técnica HPLC aplicado en las semillas de la moringa identificaron 17 aminoácidos (Asparagina, glutamina, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cistina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina), los primeros en aparecer son polares seguidamente de los apolares.



**Ilustración 14.** Pefiles cromatográficos (líneas negras pH 3-5) (líneas rojas pH 4-6)

En la Ilustración 15 se muestra cromatogramas de la simulación gástrica y duodenal de SRM, SRT y YHM, YHT a pH 3,2, los picos en la digestión gástrica tienen mayor intensidad a diferencia de la digestión duodenal que posee menor intensidad, los picos aparecen a partir del minuto 2,6 hasta el minuto 7,5 aproximadamente. Lo cual, se pudo apreciar la diferencia entre las dos digestiones por los picos altos y bajos que se fueron formando a través de un cierto tiempo.

La pepsina logra romper cadenas de polipéptidos en unidades más pequeñas que viene hacer aminoácidos libres. Mientras que la hidrolisis con pancreatina con lleva a oligopéptidos y aminoácidos libres que estos a su vez son digeridos en el intestino delgado (Bojórquez et al., 2013). Debido a la acción de la pepsina en la simulación gástrica se pueden observar picos con mayores intensidades a diferencia de la digestión duodenal debido a la acción de la pancreatina que la intensidad de los picos es mínima.



**Ilustración 15.** Perfiles cromatográficos simulación gástrica (línea negra) y duodenal (línea roja)

### 4.1.3 Cuantificación proteica por el método DUMAS

Por lo cual para la cuantificación proteica de los concentrados de las papillas se determinó por dicho método como se muestra en la Tabla 2 obteniendo así un mayor porcentaje de proteínas a pH 4, para YHT un 28,595 %; YHM 33,6%; SRT 36,561 % y SRM 36,913% a diferencia del pH 3 y pH 5 que obtuvieron porcentajes de proteína menores.

**Sallato (2017)**, recopila información mencionando que ambos métodos (Kjeldahl – Dumas) entregan resultados de N total comparables y presentan una diferencia insignificante, por tanto Dumas tiene menos riesgo de error y su automatización implica mayor rapidez y menor costo del análisis. Teniendo en cuenta todo esto se realizó una sola corrida en las muestras analizadas.

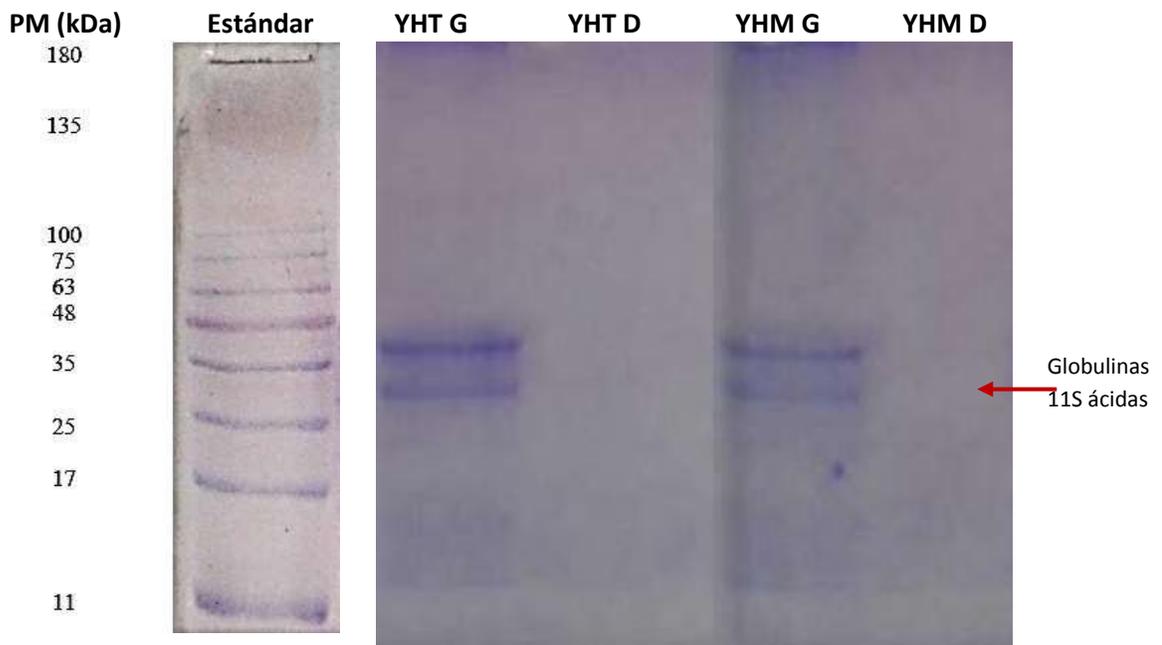
**Tabla 3.** Cuantificación proteica (%) por método DUMAS

	YHT	YHM	SRT	SRM
pH 3	26,92	32,99	35,19	34,60
pH 4	28,60	33,60	36,56	36,91
pH 5	24,84	26,67	36,37	29,93

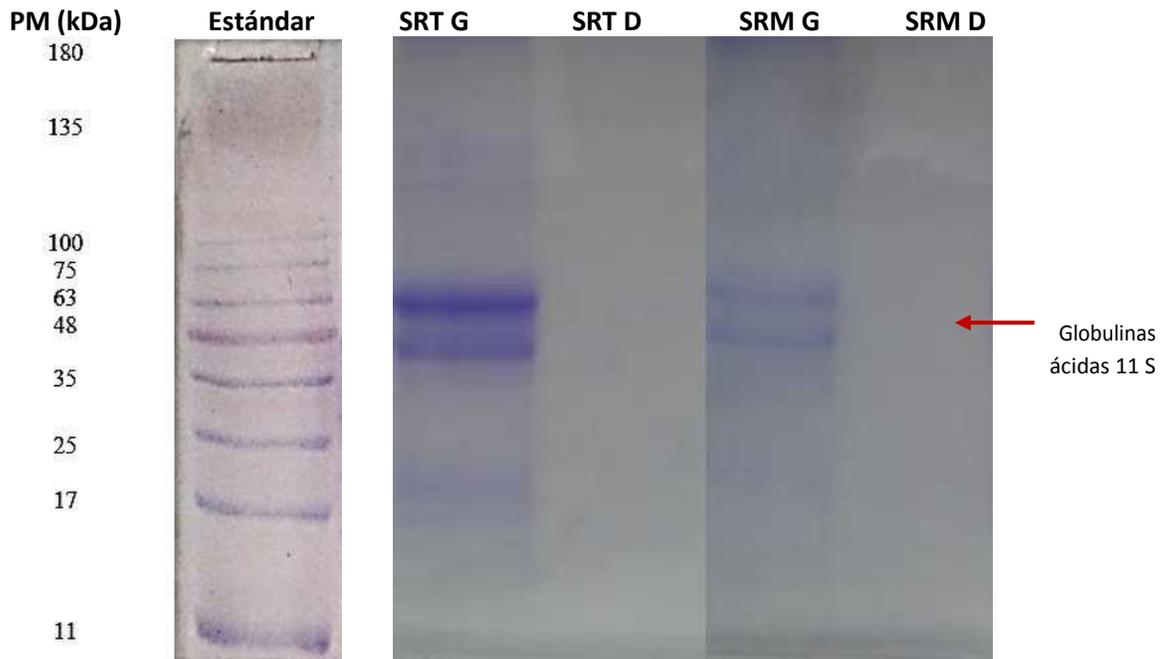
### 4.1.4 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro

#### 4.1.4.1 Digestión gástrica-duodenal

En la Ilustración 16 y 17, se muestran las digestiones gástricas y duodenales de los concentrados proteicos de SRT, SRM y YHM, YHT a pH 3,2. Se puede visualizar las bandas en la digestión gástrica en los concentrados proteicos evacuados a diferencia de la digestión duodenal que no presenta ninguna banda, los pesos moleculares para las digestiones gástricas son de 28,7; 40,6 y 21,8; 28,7 kDa respectivamente que corresponden a globulinas 11 S ácidas. La digestibilidad gastrointestinal in vitro de las proteínas de papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas simuladas a condiciones fisiológicas humanas se trabajó a pH de 3,2 porque las condiciones son menos agresivas. Los perfiles cromatográficos (Ilustración 15) en las digestiones gástricas se pudo evidenciar la formación de picos con altas intensidades a diferencia la digestión duodenal que presento picos con bajas intensidades, en comparación con los perfiles electroforéticos que presentan bandas en las digestiones gástricas a diferencia de las digestiones duodenales, como se mencionó anteriormente en los perfiles cromatográficos esto se debe a la acción de las enzimas utilizadas en las digestiones.



**Ilustración 16.** Gel SDS-PAGE con 2- $\beta$ -mercaptoetanol digestión gástrica (G) y duodenal (D) de los concentrados proteicos a pH 3,2.

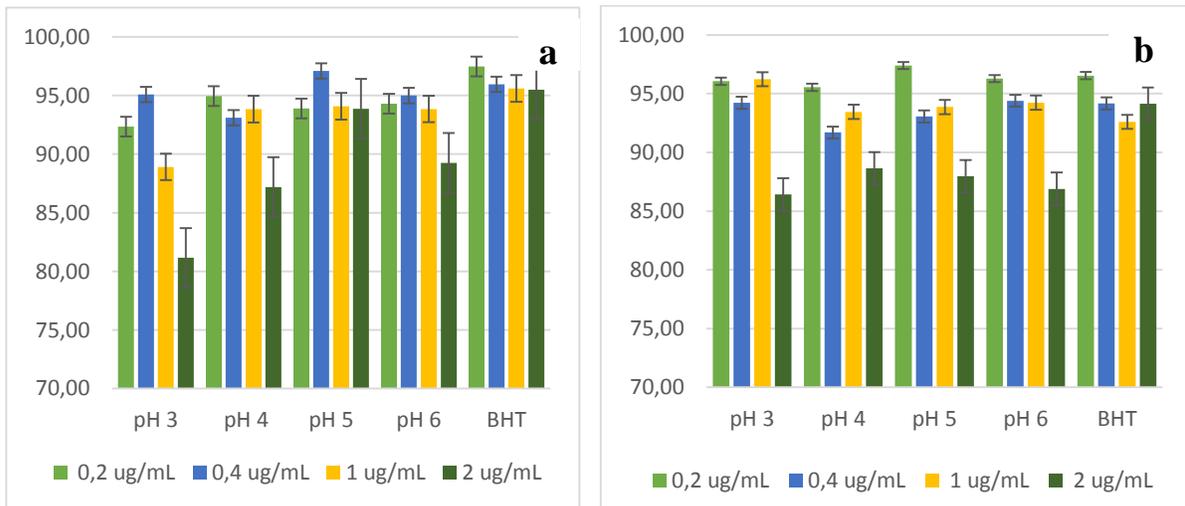


**Ilustración 17.** Gel SDS-PAGE con 2- $\beta$ -mercaptoetanol digestión gástrica (G) y duodenal (D) de los concentrados proteicos a pH 3,2

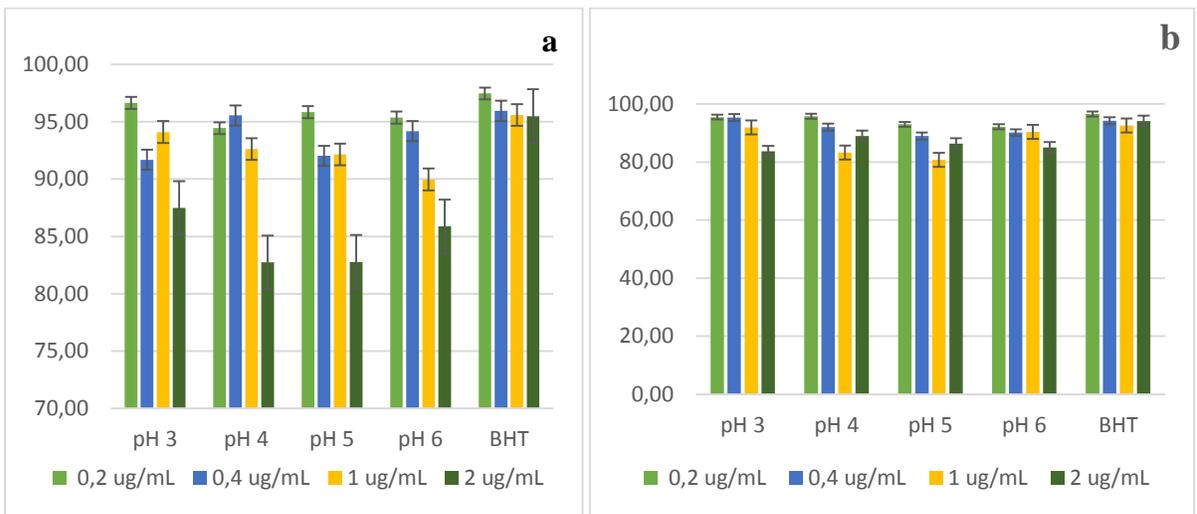
#### 4.1.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos por el método TBARS

Los concentrado proteicos de YHM y YHT a pH de precipitación 3 y 4 a las concentración de 0,2 y 0,4 mg/mL tienen mayor actividad antioxidante a las 24 y 48 h al igual que presentó el antioxidante comercial a diferencia de los pH 5 y pH 6 con concentraciones de 1 y 2 mg/mL que tienden a su disminución (Ilustración 18 y 19). Para los concentrados proteicos de SRM y SRT, a pH de precipitación 3, 4 y 5 a concentración de 0,2; 0,4 y 1 mg/mL tienden al aumento de los valores de actividad antioxidante a las 24 y 48 h a diferencia del pH 6 a la concentración de 2 mg/mL que disminuye, el antioxidante comercial a las 24 h es mayor en las cuatro concentraciones frente a los pH de precipitación y a las 48 h este disminuye frente a los demás pH (Ilustración 20 y 21).

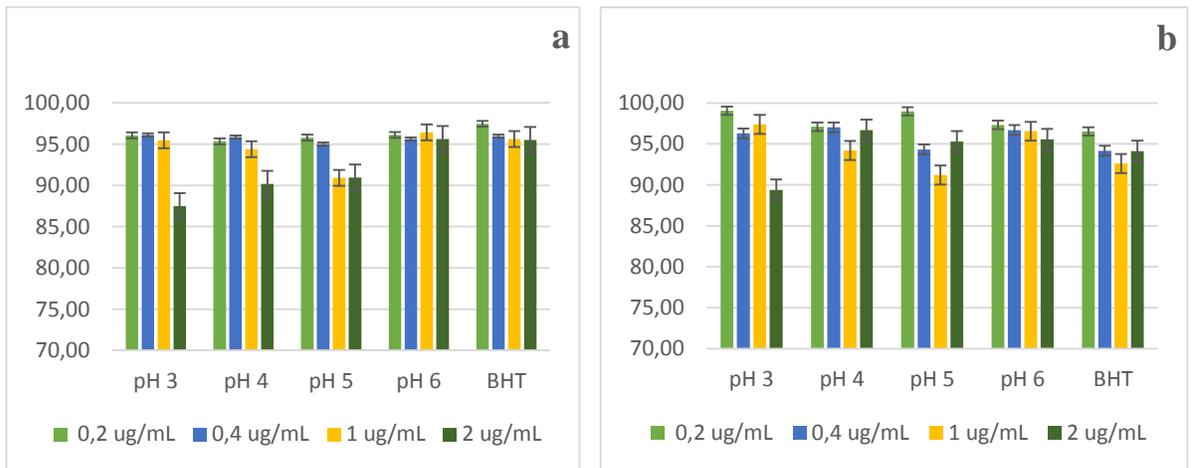
En las Ilustraciones 18, 19, 20 y 21 para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó diferentes concentraciones, pH y tiempo, estos son factores que influyen directamente sobre la actividad antioxidante en todos los concentrados proteicos. **Zuleta & Frigola (2009)**, mencionan que en el ensayo que se utiliza el radical ABTS, el grado de inhibición de dicho radical estará en función de la concentración y el tiempo. Con lo mencionado se podría deducir que a mayor concentración el efecto antioxidante tiende a disminuir, como es el caso de la concentración de 2 ug/mL la actividad antioxidante es menor frente a las demás concentraciones.



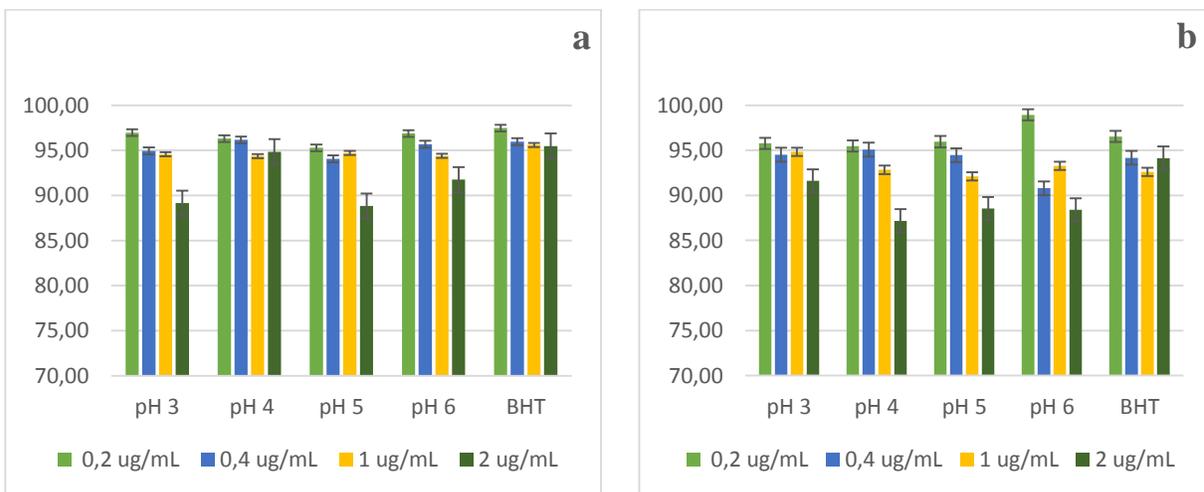
**Ilustración 18.** Actividad antioxidante YHM (a: 24 horas; b: 48 horas)



**Ilustración 19.** Actividad antioxidante YHT (a: 24 horas; b: 48 horas)



**Ilustración 20.** Actividad antioxidante SRM (a: 24 horas; b: 48 horas)



**Ilustración 21.** Actividad antioxidante SRT (a: 24 horas; b: 48 horas)

#### 4.1.6 Determinación del contenido de polifenoles totales

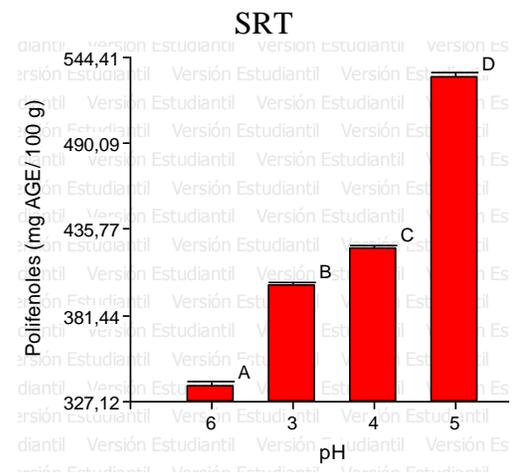
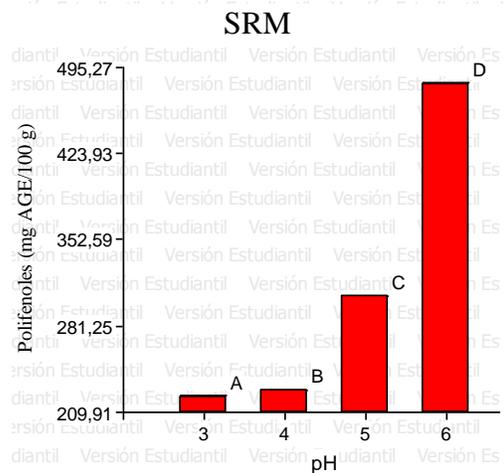
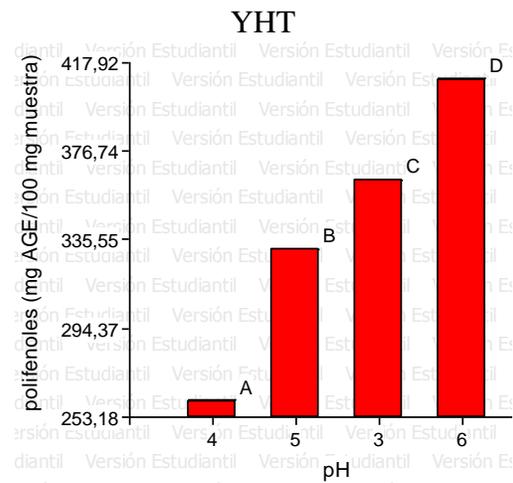
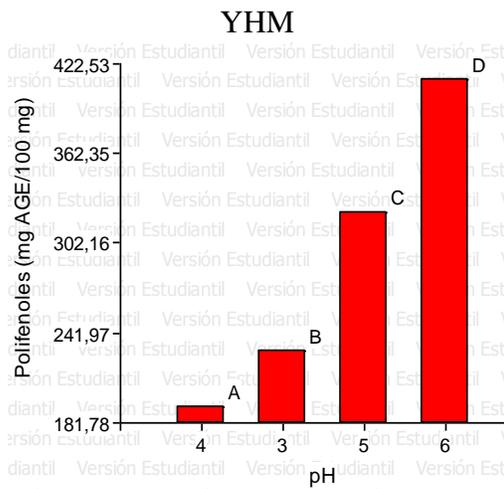
En la Ilustración 22 se muestra el contenido de polifenoles de los sobrenadantes de las muestras analizadas.

El mayor contenido de polifenoles en YHM se observa en el pH 5 y 6 con 323,03 y 411,46 mg GAE/100 g muestra respectivamente a diferencia del pH 3 y 4 que sus contenidos fenólicos son menores con 229,4 y 192,72 mg GAE/100 g muestra respectivamente. Para YHT el mayor contenido de polifenoles observa en el pH 3 y 6 con 363,24 y 410,16 mg GAE/100 g muestra respectivamente a diferencia del pH 4 y 5 que sus contenidos fenólicos son menores con 260,67 y 331,23 mg GAE/100 g muestra respectivamente.

Para SRM el mayor contenido de polifenoles observa en el pH 5 y 6 con 305,91 y 482,02 mg GAE/100 g muestra respectivamente a diferencia del pH 3 y 4 que sus contenidos fenólicos son menores con 222,88 y 227,35 mg GAE/100 g muestra respectivamente. Mientras que contenido de polifenoles para SRT se observa en el pH 4 y 5 con 423,56 y 531,90 mg GAE/100 g muestra respectivamente a diferencia del pH 3 y 6 que sus contenidos fenólicos son menores con 399,73 y 337,0 mg GAE/100 g muestra, respectivamente.

El contenido de fenoles totales en futas como el mortiño es elevada (609 mg GAE/100 g) y de la uva esta entre 151 - 246 mg GAE/100 g (**Gaviria et al., 2009**). Estas frutas presentan valores altos porque son evaluados sin ninguna mezcla a diferencia de los sobrenadantes evaluados que provienen de una mezcla de una formula infantil y están en un rango de 192,72 - 531,90 mg GAE/100 g.

El método de Folin-Ciocalteu es un método común estandarizado en el área alimenticia. La reacción de este método depende factores como la composición fenólica y su pH de cada solución (**Cicco et al., 2009**). Así en los resultados obtenidos en los concentrados proteicos en la Ilustración 22 se observan los contenidos fenólicos de los sobrenadantes a los diferentes pH de precipitación, los pH 6 de los contenidos fenólicos fueron altos en YHM, YHT y SRM, SRT (411,46; 410,16 y 482,02; 337,0 mg AGE/ 100 mg de muestra) a diferencia de los otros pH que sus valores son bajos.



**Ilustración 22.** Contenido de polifenoles (letras diferentes indican diferencia significativa al 95% de confianza).

#### 4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA a un nivel de significancia del 95% concluyendo que existe diferencia significativa por lo cual se procede a la aceptación de la hipótesis alternativa, esta menciona que los pH de precipitación aplicados influyen sobre el rendimiento de proteínas, la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles de las papillas para niños a base de harina de papas nativas ecuatorianas (*Solanum tuberosum ssp.*)

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

Después del proceso de digestibilidad in vitro, se determinó la presencia de globulinas 11S ácidas (pesos moleculares de 21,8 y 40,6 kDa) para todas las muestras evaluadas. La determinación en condiciones duodenales no reflejó bandas debido a la hidrólisis causada por las enzimas utilizadas.

En la determinación de actividad antioxidante se observó mejor comportamiento a concentraciones de 0,2; 0,4 y 1 ug/mL y pH's de precipitación de 3, 4, 5.

La determinación de polifenoles totales mostró mejor resultado a pH 6. La papilla elaborada con la variedad Yema de huevo y edulcorada con mora presentó 441,46 mg AGE/100 mg y la edulcorada con taxo 410,16 mg AGE/100 mg. Mientras que la papilla elaborada con la variedad Santa rosa edulcorada con mora presentó 482,02 mg AGE/100 mg y la edulcorada con taxo 337,0 mg AGE/100 mg.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. J. & Sosulski, F. W. (1997). Structural and Compositional Characteristics of Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(8), 3049-3055.

Alvarado, S. (2004). *Formulación, elaboración y prueba de aceptabilidad de papillas para niños de 6 a 36 meses en base a trigo, arroz, quinua y kiwicha*. (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/987/1/Alvarado\\_bm.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/987/1/Alvarado_bm.pdf)

AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis*, 19th Edition. Association of official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

Arizaga Rivera, M. J. & Valencia Bennett, D. X. (2015). *Influencia del procesamiento tecnológico en las pérdidas de valor nutricional en alimentos infantiles como compotas y papillas* (Tesis de grado, Universidad de Guayaquil). Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12699>

Avella, D. M. G., García, C. A. O. & Cisneros, A. M. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *In Memorias del Simposio de Metrología*. Universidad Autónoma de Querétaro.

Bellomonte, G.; Costantini, A. & 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*, 70(2), 227 - 229.

Beltrán, G. O. (2013). Estudio para la obtención de almidón de maíz por molienda seca y extracción de las proteínas. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, México.

Berruezo, G. F. R., Conesa, D. P., Frontela, C., Vicente, J. H., Echarri, P. P. & Gastón, M. J. P. (2009). Beikost: alimentos infantiles complementarios para la transición y maduración digestiva (parte II). *ANS. Alimentación, nutrición y salud*, 16(2), 33-46.

Bonierbale, M., Amoros, W., Espinoza, J.; Mihovilovich, E., Roca, W. & Gómez, R. (2004). Recursos genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. *Suplemento revista Latinoamericana de la papa*, 1, 3-13.

Borjórquez-Balam, E., Ruiz Ruiz, J. C., Segura-Campos, M., Betancur Ancona, D. & Chel Guerrero, L. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *OmniaScience Monographs*.

Callisaya, A., Carlos, J., Alvarado, K., & Antonio, J. (2009). Aislados proteínicos de granos altoandinos Chenopodiaceas; quinua “*Chenopodium Quinoa*” - Cañahua “*Chenopodium Pallidicaule*” por Precipitación Isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26(1), 12-20.

Campos, J., Colina, G., Fernández, N., Torres, G., Sulbarán, B. & Ojeda, G. (2003). Caracterización del agente coagulante activo de las semillas de Moringa oleifera mediante HPLC. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 37(1).

Carrillo, G., Candia, C., Lugo, E., Espinoza, E., & Noriega, A. (2013). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 8(1), 19-26.

Castro, T. P. (2015). *Desarrollo y caracterización de un Suplemento Infantil enriquecido con Zinc tipo papilla para niños que habitan en la Zona Rural*. (Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral). Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/88435/D-88002.pdf>

Cerón, A. (2006). *Determinación de la digestibilidad “in vitro” de la proteína, contenido de fitatos y lisina disponible en variedades criollas de maíz del estado de Hidalgo*. (Tesis de grado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/632/Determinacion%20de%20la%20digestibilidad%20in-vitro.pdf;jsessionid=35B2FE077D62875143C6E21A6BF284FF?sequence=1>

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micromethod in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107-110.

Coloma, D. (2012). *Evaluación de la calidad nutricional y sensorial de tortillas precocidas elaboradas con papas (Solanum) nativas (Yema de huevo, Chaucha roja y Leona negra)*

*enriquecidas con pasta de amaranto blanco (Amaranthus albus)*. (Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3090>

Domínguez, G. C. (2006). Obtención de la fracción proteica 7S proveniente de soya germinada y sin germinar y su efecto en las propiedades reológicas de harina para panificación. *Instituto Politécnico Nacional*.

Echavarría, B., Franco, A. & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*, 16(1), 126-131.

Galvis Murillo, B. S. (2003). Estudio de durabilidad de la pulpa de mora de Castilla y mora San Antonio (*rubus glaucus*) (Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1056/1/beatrizsirleygalvismurillo.2003.pdf>

García Martínez, E., Fernández Segovia, I. & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *ETSIAMN - UPV*. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>

García, J. R., De la Rosa, L. A., Herrera-Duenez, G., González-Barrios, A. G., López-Díaz, J. A., González-Aguilar, G. A. & Álvarez-Parrilla, E. (2011). Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en la ciudad de Juárez, México. *Tecnociencia*, 5(2), 67-75.

Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P. & Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6).

Gil, H. A., Uauy, D. R. & Dalmau, S. J. (2006). Bases for adequate complementary feeding in infants and young children. *Anales de pediatría*, 65(5), 481-495.

Gómez, M. (2008). *La papa, su comercialización y el caso especial frente a la comunidad de Pasquilla*. (Tesis de grado, Escuela Superior de Administración Pública). Recuperado de [http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos PDF/a6890 - la papa, su comercialización y el caso especial frente a la comunidad de pasquilla \(pag 48 - 1.427 kb\).pdf](http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos PDF/a6890 - la papa, su comercialización y el caso especial frente a la comunidad de pasquilla (pag 48 - 1.427 kb).pdf)

Gregorio, J., Lanza, P., Churión, C., & Gómez, N. (2016). Comparación entre el método Kjeldahl tradicional y el método Dumas automatizado (N cube) para la determinación de

proteínas en distintas clases de alimentos. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28(2), 245-249.

Guzmán-Chozas, M., Vicario, I. M. & Guillén-Sans, R. (1997). Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2452-2457.

Horton, D. (1992). La Papa: producción, comercialización y programas. International Potato Center. Lima – Perú.

Horton, D. (2016). Las papas en los países en desarrollo. *Revista Latinoamericana de la papa*, 1(1), 9-17.

Jiménez Saiz, R. (2012). *Digestibilidad alergenicidad in vitro y efecto inmunomodulador de proteínas de huevo procesado*. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10261/48753>

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 217, 680-685.

López, G., Dyer, C. & Devaux, A. (1998). Las papas nativas y los mercados urbanos del Perú. *Compendio de Papa Andina, Logros y Experiencias de la Primera Fase*. (2002), 74-77.

Manríquez, J. A. (1994). La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos, su aplicación en peces y en la conservación del medio ambiente. *Depósito de documentos de la FAO*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ab482s/AB482S08.htm>

Martínez Valverde, I., Periago, M. J. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 5-18.

Martínez, A. L., Ventura, E., Maldonado, U., Sánchez, M., Bazaldúa, C., & Del Villar, A. (2005). Caracterización de las proteínas de reserva y cultivo de anteras para el desarrollo de genotipos de arroz de alta calidad nutricional. *Bioteología aplicada*, 22(1), 37-40.

Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530.

Maureen, A & Prieto, G. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana Investigación Biomédica*, 18(1), 12-4.

- Monteros, C. & Reinoso, I. (2010). Biodiversidad y oportunidades de mercado para las papas nativas ecuatorianas. *Papanat*. 2010, 15.
- Monteros, C., Cuesta, X., Jiménez, J. & López, G. (2005). Las papas nativas en el Ecuador. *INIAP Archivo Histórico*.
- Montoya, C. G., Ospina, C. O., Mesa, N. S., Cano, C. M., Lobo, M., Arias, P. G. & Pérez, B. R. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519-528.
- Morán, E. L. & Silva, M. A. (2012). *Desarrollo y evaluación físico-química y sensorial de batidos a base de leche y fruta: taxo (passiflora mollissima) ó mango (mangifera indica)*. (Tesis de grado, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano). Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5439/1/AGI-2012-T033.pdf>
- Munive Ledesma, P. A. (2009). *Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soya y almidón de maíz*. (Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional). Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/278003925\\_Elaboracion\\_de\\_un\\_suplemento\\_alimenticio\\_en\\_polvo\\_para\\_consumo\\_humano\\_a\\_partir\\_de\\_una\\_mezcla\\_de\\_hidrolizado\\_de\\_soya\\_y\\_almidon\\_de\\_maiz](https://www.researchgate.net/publication/278003925_Elaboracion_de_un_suplemento_alimenticio_en_polvo_para_consumo_humano_a_partir_de_una_mezcla_de_hidrolizado_de_soya_y_almidon_de_maiz)
- Pazuña, M. (2011). *Estudio del efecto de mejoradores de harina en el desarrollo de masas para la elaboración de pastas con sustitución parcial de harinas de quinua (*Chenopodium quinua*) y papa (*Solanum tuberosum*)*. (Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/839>
- Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-4.
- Porras-Loaiza, A. & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Ramírez, M. E., Marín, B. E. L., Henao, M. V. & García, S. I. (2014). Papilla de arroz instantánea para niños de 12 a 36 meses fortificada con micronutrientes: Una alternativa para la alimentación infantil. *Journal of Engineering and Technology*, 1(2).

Re R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Reddivari, L., Hale, A. & Miller, J. (2007). Determination of phenolic content, composition and their contribution to antioxidant activity in specialty potato selections. *American Journal of Potato Research*, 84, 275-282.

Robalino, D., Acurio, L. & Proaño, J. (2014). Caracterización reológica de papillas infantiles, formuladas a base de harina de papas nativas (*Solanum tuberosum* L.) de variedades nativas ecuatorianas, edulcoradas con pulpa de mora (*Rubus glaucus*) y taxo (*Passiflora tarminiana*). *Investigación y Desarrollo*, 6 (1).

Ruffino, J. & Napolitano F. (2006). Determinación de Nitrógeno Proteico en Alimentos Concentrados utilizando el método de Combustión Directa Leco®/Dumas. *Engormix*.

Sallato, B. (2017). El mito de las diferencias entre nitrógeno Kjeldahl y Dumas. *Redagricola*.

Serpa, A., Álvarez, C. & Hincapié, G. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect*, 12(1), 30 – 39. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v12n1/v12n1a04.pdf>

Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell Online*, 7(7), 945-956.

Suttle, J. (2008). Symposium introduction: enhancing the nutritional value of potato tubers. *American Journal of Potato Research*, 85(4), 266-266.

Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., de Jongh, H. H., Wijngaards, G., van Boekel, M. A., Walstra, P., & Voragen, A. G. (2001). Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4889-4897.

Vasco, C., Ruales, J. & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 817-819.

Villacrés, E., Quilca, N., Reinoso R., Monteros, J. & Muñoz, R. (2011). Valorización nutricional y funcional de las papas nativas (*Solanum andígena ssp.*). *Memorias del IV Congreso Ecuatoriano de la Papa*, 33-35.

Villavicencio Vásquez, D. Z. & Zavala Villacís, J. S. (2015). *Obtención de la harina de papa como sustituto parcial en la elaboración de pan tipo enrollado*. (Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral). Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/30758/D-79918.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

Voet, D & Voet, J.G. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado-Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Horizonte médico*, 5(2), 29-38. Recuperado de: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2005\\_2/Art4\\_Vol05\\_N2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2005_2/Art4_Vol05_N2.pdf)

Zuleta A., Esteve M. & Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

# ANEXOS

## ANEXO A:

### A.1. RENDIMIENTO EN EL AISLAMIENTO DE PROTEÍNA

Para la determinación del rendimiento de los aislados proteicos se utilizó la Ecuación 1.

$$\%R = \frac{\text{peso después del liofilizado (g)}}{\text{peso inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

**Tabla 4.** Datos promedios de los concentrados proteicos de las papillas

pH	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S
YHT					
3	5,28	6,34	4,31	5,31	1,02
4	5,30	6,44	4,92	5,55	0,79
5	4,48	5,26	4,50	4,75	0,44
6	0,28	0,39	0,16	0,28	0,11
YHM					
3	4,90	7,31	6,27	6,16	1,21
4	4,83	7,81	6,66	6,43	1,50
5	4,10	5,34	5,74	5,06	0,86
6	0,09	0,15	0,06	0,10	0,05
SRT					
3	3,48	4,16	3,80	3,81	0,34
4	2,99	4,60	5,60	4,40	1,31
5	4,12	3,20	2,54	3,29	0,79
6	0,27	0,24	0,45	0,32	0,11
SRM					
3	3,05	4,10	4,50	3,88	0,75
4	3,14	4,64	4,71	4,16	0,89
5	2,69	3,10	2,24	2,67	0,43
6	0,01	0,25	0,13	0,13	0,12

## A.2. DATOS PARA LA CARACTERIZACIÓN PROTEICA POR ELECTROFORESIS

Para el cálculo de la movilidad relativa se utilizó la siguiente Ecuación 2.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por cada banda}}{\text{distancia total recorrida}} \quad (2)$$

**Tabla 5.** Datos estándares para la curva

Peso molecular (KDa)	RF estándar
180	0,2075
135	0,2261
100	0,2718
75	0,3154
63	0,3631
48	0,4274
35	0,5124
25	0,6598
17	0,8568
11	0,9606

A partir de los datos reportados en la Tabla 5, se obtiene la Ecuación 3 que describe la tendencia ( $r^2 = 0,951$ ).

$$\text{Log (peso molecular)} = 2.3908 - 1.4484 (\text{RF estándar}) \quad (3)$$

## A.2.1. VALORES DE LA MOVILIDAD RELATIVA

**Tabla 6.** Movilidad relativa de los concentrados proteicos

YHT					YHM			
Banda	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
<i>Native</i>								
1	134,94	134,94	77,82	-	89,30	89,30	89,30	-
2	109,78	72,65	-	-	77,82	77,82	-	-
3	77,82	-	-	-	-	-	-	-
<i>Con 2-β-mercaptoetanol</i>								
1	44,88	44,88	44,88	17,132	36,51	36,51	36,51	-
2	34,09	34,09	17,13	-	27,73	27,73	-	-
3	17,13	17,13	14,93	-	-	-	-	-
4	14,93	14,93	-	-	-	-	-	-
<i>Sin 2-β-mercaptoetanol</i>								
1	117,59	117,59	117,59	-	66,05	66,05	66,05	-
2	55,17	55,17	55,17	-	35,43	35,43	35,43	-
3	39,12	39,11	39,12	-	26,87	26,87	26,87	-
4	21,06	21,06	21,06	-				-
SRT					SRM			
<i>Native</i>								
1	70,78	70,78	46,73	-	66,05	66,05	66,05	-
2	46,73	46,73	-	-	37,97	37,97	37,97	-
<i>Con 2-β-mercaptoetanol</i>								
1	81,28	81,28	81,28	-	26,87	26,87	28,79	-
2	35,43	35,43	35,43	-	21,83	21,83	-	-
3	25,07	25,07	25,07	-	11,71	11,71	-	-
4	15,45	15,45	15,45	-	-	-	-	-
<i>Sin 2-β-mercaptoetanol</i>								
1	25,07	93,35	93,35	-	25,07	30,85	30,85	-
2	21,83	25,07	25,07	-	-	25,07	-	-
3	10,93	21,83	21,83	-	-	-	-	-
4	-	10,93	10,93	-	-	-	-	-

### A.3. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE DUMAS

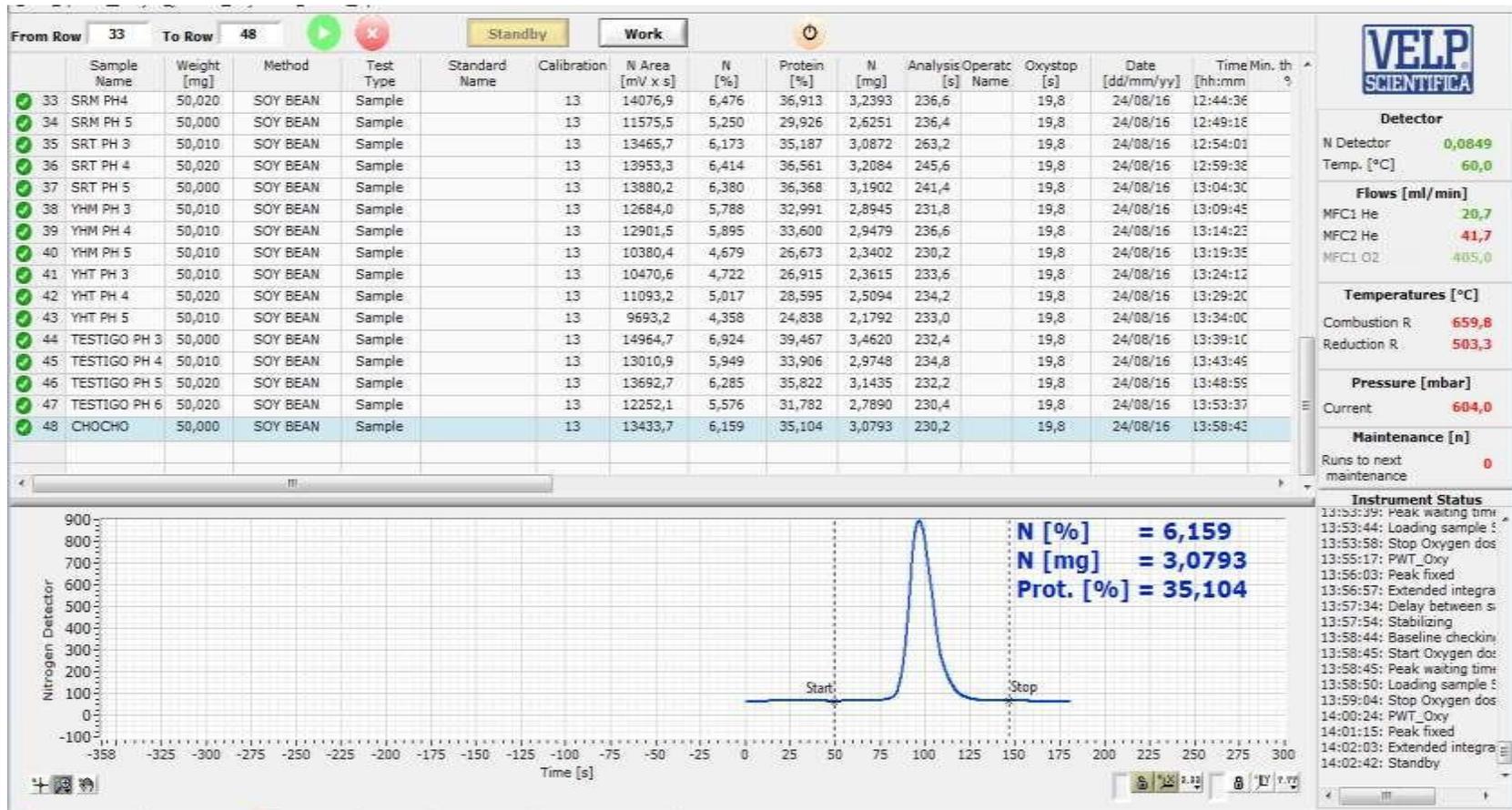


Ilustración 23. Obtención de % proteína por DUMAS

### A.3. SIMULACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y DUODENAL

**Tabla 7.** Movilidad relativa de los concentrados proteicos para digestibilidad gástrica y duodenal con 2-β-mercaptoetanol a pH 3,2

Banda	YHT	YHM	SRT	SRM
Digestibilidad gástrica				
1	28,79	28,79	40,69	40,69
2	21,83	21,83	28,79	28,79
Digestibilidad duodenal				
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-

### A.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO TBARS

**Tabla 8.** Datos para el control positivo y negativo

Repetición	Control positivo	Control negativo
	Aceite no oxidado	Aceite oxidado
R <sub>1</sub>	0,548	0,518
R <sub>2</sub>	0,534	0,516
R <sub>3</sub>	0,520	0,519
Promedio	0,534	0,518

**Tabla 9.** Valores promedios de actividad antioxidante de BHT

(μg/mL)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S.
24 horas					
200	97,44	97,4	97,54	97,47	0,06
400	95,99	95,9	95,99	95,96	0,06
1000	95,56	95,7	95,61	95,61	0,05
2000	95,46	95,6	95,46	95,49	0,06
48 horas					
200	96,57	96,5	96,52	96,54	0,03
400	94,11	94,2	94,20	94,17	0,06
1000	92,51	92,6	92,71	92,59	0,10
2000	93,67	93,8	94,93	94,14	0,69

**Tabla 10.** Valores promedios de actividad antioxidante 24 horas

(µg/mL)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S.
<b>YHT</b>										
pH 3					pH 4					
200	96,67	96,7	96,62	96,65	0,03	94,49	94,4	94,40	94,45	0,05
400	91,45	91,6	92,03	91,69	0,30	95,46	95,5	95,70	95,56	0,13
1000	94,01	94,1	94,20	94,11	0,10	92,47	92,6	92,80	92,63	0,17
2000	87,59	87,3	87,54	87,48	0,16	82,57	82,8	82,90	82,74	0,17
pH 5					pH 6					
200	95,80	95,8	95,90	95,85	0,05	95,27	95,3	95,56	95,38	0,16
400	91,98	92,0	92,08	92,03	0,05	94,20	94,2	94,16	94,19	0,03
1000	90,63	90,7	95,12	92,14	2,58	89,95	89,9	90,10	89,97	0,12
2000	82,47	82,8	83,10	82,78	0,31	85,85	85,8	85,90	85,87	0,03
<b>YHM</b>										
pH 3					pH 4					
200	92,08	92,4	92,56	92,34	0,24	94,83	95,0	95,07	94,96	0,12
400	95,07	95,1	95,12	95,09	0,03	93,09	93,1	93,14	93,11	0,03
1000	88,80	88,9	88,99	88,91	0,10	94,30	93,6	93,58	93,83	0,41
2000	81,17	81,2	81,12	81,15	0,03	87,15	87,1	87,35	87,20	0,13
pH 5					pH 6					
200	93,87	93,9	93,92	93,88	0,03	94,16	94,4	94,35	94,30	0,13
400	97,05	97,1	97,10	97,09	0,03	95,12	95,0	94,88	94,99	0,12
1000	94,20	94,0	94,01	94,08	0,11	93,82	93,9	93,82	93,85	0,06
2000	93,82	93,9	93,92	93,87	0,05	89,33	89,3	89,18	89,26	0,07
<b>SRT</b>										
pH 3					pH 4					
200	96,96	97,0	97,01	96,97	0,03	96,38	96,3	96,28	96,31	0,06
400	94,93	95,0	94,93	94,95	0,03	96,18	96,2	96,14	96,17	0,03
1000	94,20	94,3	95,27	94,58	0,60	94,40	94,0	94,74	94,37	0,39
2000	89,09	89,2	89,18	89,15	0,06	94,69	94,9	94,98	94,85	0,15
pH 5					pH 6					
200	95,32	95,3	95,27	95,28	0,03	96,86	96,9	96,91	96,88	0,03
400	93,63	94,2	94,40	94,08	0,40	95,46	95,7	95,90	95,69	0,22
1000	94,64	94,7	94,78	94,70	0,07	94,45	94,4	94,35	94,40	0,05
2000	88,60	88,2	89,67	88,83	0,75	91,74	91,9	91,65	91,76	0,12
<b>SRM</b>										
pH 3					pH 4					
200	95,80	96,1	96,28	96,06	0,24	95,22	95,4	95,41	95,33	0,10
400	95,99	96,2	96,18	96,12	0,11	95,90	95,8	95,85	95,85	0,05
1000	95,22	95,6	95,61	95,48	0,22	94,49	94,3	94,35	94,40	0,08
2000	87,35	87,4	87,64	87,48	0,15	90,10	90,2	90,29	90,20	0,10
pH 5					pH 6					
200	95,80	95,7	95,90	95,78	0,12	96,18	96,0	96,14	96,12	0,07
400	95,22	94,8	94,98	94,99	0,22	95,41	95,6	95,85	95,61	0,22
1000	90,73	90,9	91,11	90,92	0,19	96,38	96,4	96,52	96,43	0,08
2000	90,92	91,0	90,92	90,94	0,03	95,75	95,4	95,70	95,61	0,21

**Tabla 11.** Valores promedios de actividad antioxidante 48 horas

(µg/mL)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Promedio	D.S.
<b>YHT</b>										
pH 3					pH 4					
200	95,41	95,4	95,46	95,43	0,03	95,65	95,8	95,75	95,72	0,06
400	95,27	95,3	95,32	95,28	0,03	91,79	91,9	91,98	91,90	0,10
1000	91,89	91,9	91,93	91,90	0,03	82,90	83,2	83,29	83,13	0,20
2000	83,77	83,7	83,73	83,74	0,03	88,84	88,9	88,99	88,92	0,07
pH 5					pH 6					
200	92,47	92,7	92,95	92,71	0,24	92,03	92,0	92,08	92,05	0,03
400	87,44	88,8	88,94	88,41	0,84	89,09	88,9	90,10	89,38	0,63
1000	79,72	80,1	80,78	80,20	0,54	89,57	90,0	90,34	89,97	0,39
2000	84,64	85,0	86,33	85,32	0,89	84,16	83,9	84,98	84,34	0,58
<b>YHM</b>										
pH 3					pH 4					
200	96,04	96,1	96,04	96,06	0,03	95,51	95,7	95,41	95,54	0,15
400	93,58	94,5	94,59	94,22	0,56	91,60	91,8	91,65	91,69	0,13
1000	96,28	96,1	96,28	96,23	0,08	93,24	93,3	93,77	93,45	0,28
2000	86,43	86,4	86,43	86,41	0,03	88,36	88,7	88,94	88,65	0,29
pH 5					pH 6					
200	97,30	97,3	97,54	97,39	0,13	96,33	96,2	96,28	96,28	0,05
400	93,09	92,9	93,19	93,06	0,15	94,16	94,4	94,59	94,40	0,22
1000	93,72	94,2	93,67	93,87	0,29	94,35	94,2	94,16	94,24	0,10
2000	87,88	88,1	87,97	87,97	0,10	85,51	87,5	87,69	86,90	1,20
<b>SRT</b>										
pH 3					pH 4					
200	95,56	95,8	95,90	95,77	0,18	95,61	95,3	95,51	95,48	0,15
400	94,40	94,5	94,64	94,51	0,12	94,88	95,2	95,17	95,07	0,17
1000	94,83	94,8	94,88	94,83	0,05	92,51	92,7	93,34	92,84	0,44
2000	91,40	91,7	91,79	91,63	0,20	87,35	87,2	87,06	87,19	0,15
pH 5					pH 6					
200	95,94	95,9	96,04	95,96	0,07	98,55	99,1	99,18	98,94	0,34
400	93,82	94,2	95,36	94,46	0,80	90,58	90,9	90,87	90,79	0,18
1000	91,69	92,0	92,61	92,11	0,46	92,90	93,4	93,58	93,29	0,35
2000	88,51	88,5	88,65	88,55	0,08	88,51	88,5	88,17	88,39	0,20
<b>SRM</b>										
pH 3					pH 4					
200	98,94	99,1	99,13	99,05	0,10	96,52	96,8	98,02	97,10	0,80
400	96,18	96,0	96,67	96,30	0,33	96,96	97,0	97,15	97,02	0,11
1000	97,01	97,0	98,12	97,38	0,64	93,77	94,3	94,49	94,19	0,38
2000	88,80	89,6	89,71	89,38	0,50	97,88	95,9	96,28	96,70	1,03
pH 5					pH 6					
200	99,03	99,0	98,94	98,99	0,05	97,05	97,3	97,59	97,33	0,27
400	93,82	93,7	95,51	94,33	1,02	96,43	96,3	97,39	96,70	0,60
1000	91,26	91,3	91,11	91,21	0,08	95,91	95,9	97,88	96,56	1,14
2000	95,07	95,4	95,46	95,30	0,20	95,27	95,7	95,75	95,56	0,26

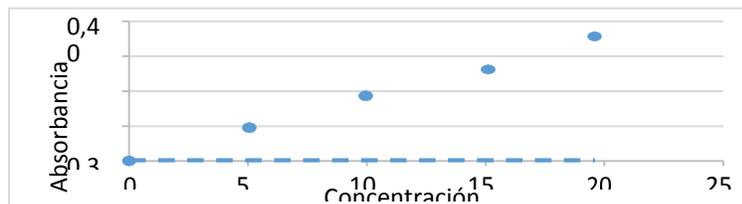
### A.5. DATOS DE POLIFENOLES POR EL METODO FOLIN

**Tabla 12.** Valores para la curva estándar GAE a 750 nm

Peso (g)	Peso total (g)	Ácido Gálico (mg/L)	Peso solución 5 mL	Peso teórico	Factor	Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,0249	0,0981	50,76	5,1843	5,1690	0,9971	50,61	0,0955
0,0491	0,0979	100,31	5,2094	5,1693	0,9923	99,53	0,1865
0,0732	0,0967	151,40	5,1763	5,1645	0,9977	151,05	0,2630
0,0975	0,0975	200,00	5,2700	5,1644	0,9800	195,99	0,3565

A partir de los datos reportados en la Tabla 11, se obtiene la Ecuación 4 que describe la tendencia ( $r^2 = 0,998$ ).

$$\text{Absorbancia} = 0,0026 + 0,0018 (\text{concentración})$$



**Ilustración 24.** Curva estándar de calibración

**Tabla 13.** Promedio de absorbancia para la determinación de polifenoles

pH	R <sub>1</sub>	Fenoles	R <sub>2</sub>	Fenoles	R <sub>3</sub>	Fenoles	Promedio	D.S.
<b>YHT</b>								
3	0,652	362,872	0,654	363,989	0,652	362,872	363,244	0,645
4	0,469	260,671	0,469	260,671	0,469	260,671	260,671	0,00
5	0,595	331,039	0,595	331,039	0,596	331,597	331,225	0,322
6	0,738	410,901	0,736	409,784	0,736	409,784	410,156	0,645
<b>YHM</b>								
3	0,413	229,396	0,413	229,396	0,413	229,396	229,396	0,00
4	0,347	192,536	0,347	192,536	0,348	193,095	192,723	0,322
5	0,580	322,661	0,581	323,220	0,581	323,220	323,034	0,322
6	0,739	411,459	0,739	411,459	0,739	411,459	411,459	0,00
<b>SRT</b>								
3	0,718	399,731	0,719	400,290	0,717	399,173	399,731	0,558
4	0,761	423,746	0,761	423,746	0,760	423,187	423,559	0,322
5	0,936	521,479	0,962	535,999	0,966	538,233	531,904	9,097
6	0,605	336,623	0,606	337,182	0,606	337,182	336,996	0,322
<b>SRM</b>								
3	0,401	222,694	0,402	223,253	0,401	222,694	222,880	0,322
4	0,409	227,162	0,409	227,162	0,410	227,720	227,348	0,322
5	0,550	305,907	0,551	306,466	0,549	305,349	305,907	0,558
6	0,865	481,827	0,866	482,386	0,866	482,386	482,199	0,322

## ANEXO B: ILUSTRACIONES

### B.1 AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

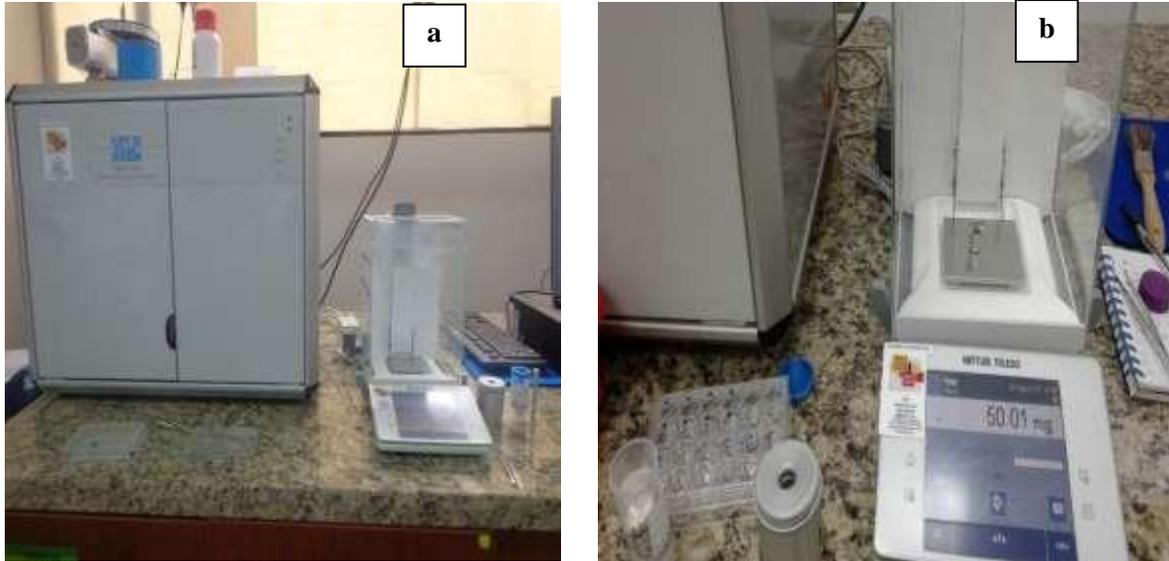


**Ilustración 25.** a) Materia prima b) Ajuste del pH



**Ilustración 26.** a) Congelación a -80 ° C b) Liofilización de muestras

## B.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DUMAS



**Ilustración 27.** a) Equipo para la calcinación de muestras – b) Pesaje para la elaboración de pastillas

## B.3 ELECTROFORESIS



**Ilustración 28.** Equipo Bio-Rad (modelo Mini Protean II)

## B.4 CROMATOGRAFÍA



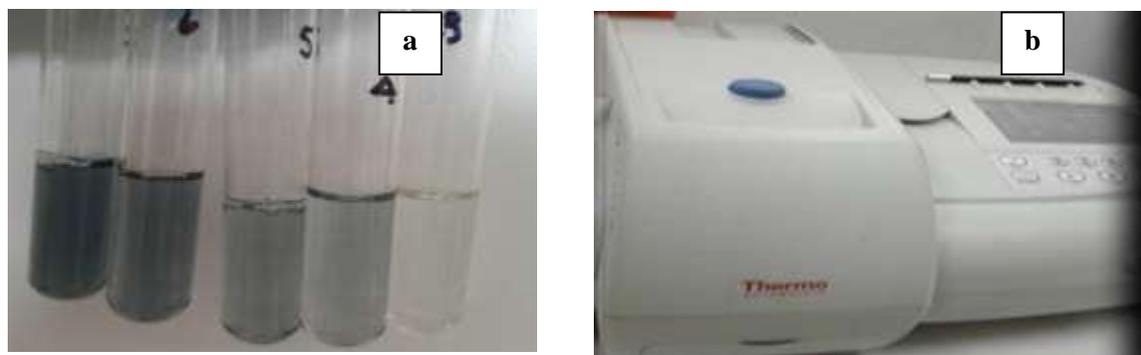
**Ilustración 29.** Equipo para el análisis por UHPLC

## B.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MÉTODO TBARS



**Ilustración 30.** a) Preparación de muestra – b) Espectrofotómetro (532nm)

## B.6 POLIFENOLES POR EL MÉTODO FOLIN



**Ilustración 31.** a) Preparación de las muestras – b) Espectrofotómetro (750nm)