



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LA TORTA DE GUACHANZO
(*Caryodendron orinocense* Karst) Y SU CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS Y POLIFENOLES”**

**Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR: JORGE LIBERATO GREFA ANDI
TUTOR: DR. CARLOS PILAMUNGA CAPUS

RIOBAMBA-ECUADOR

2017

©2017, JORGE LIBERATO GREFA ANDI

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines netamente académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LA TORTA DE GUACHANZO (*Caryodendron orinocense* Karst) Y SU CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS Y POLIFENOLES” de responsabilidad del joven egresado Jorge Liberato Grefa Andi, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|---|--------------|--------------|
| Dr. Carlos Pilamunga Capus, Ph.D DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | _____ | _____ |
| BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |
| Ing. Sonia Vallejo MIEMBRO DEL TRIBUNAL | _____ | _____ |

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jorge Liberato Grefa Andi, expreso que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados expuestos en él son legítimos y únicos. Los contextos en el documento provienen de otras fuentes que están debidamente citados y refrendados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Jorge Liberato Grefa Andi

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación va dedicado a Dios, por llenarme de salud, por bendecirme cada segundo de mi vida y así poder cumplir una meta más en mi vida.

A mis hijas Alexia y Daniela que son la razón principal de mi felicidad y mis ganas de salir adelante, por llenarme de razones para levantarme cada día.

A mis padres Liberato e Irma por enseñarme a luchar y salir adelante frente a todas las circunstancias, y sobre todo a mi mami Irmita que desde el cielo me sigue guiando.

A mi Esposa Gaby, por apoyarme y darme fuerzas para salir de las peores dificultades, por ser mi apoyo incondicional y dibujarme una sonrisa todos los días.

A mis hermanos que gracias a sus consejos y más de una buena experiencia juntos han sido y serán los mejores y que han hecho de mí un hombre de bien.

A mis amigos y maestros, quienes pasaron y formaron parte importante en mi formación profesional, y a quienes puedo decir muchas gracias por formar parte de mis experiencias, les llevaré en mi corazón por que con el tiempo y la distancia que se formara entre nosotros no borrara tan bellas y triste anécdotas.

Jorge

AGRADECIMIENTO

Templo de sabiduría y Tenacidad, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haberme las puertas y brindarme su sabiduría durante estos años de estudio.

Al Grupo BIO-PROPEPTI laboratorio de Alimentos Funcionales en la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Que a mano del Dr. Ismael Carrillo Teran, quien con su enseñanza y dedicación fue parte de este logro tan importante, por su entereza y apoyo en el asesoramiento de este trabajo de investigación.

De manera muy especial al Dr. Carlos Pilamunga y al BQF Diego Vinuesa, quienes con su guía y dedicación fueron parte de este logro tan importante.

A mi esposa e hijas quienes con su paciencia y fortaleza me enseñan a luchar mano a mano, gracias por ser mi motor incansable y mi razón de vivir.

Jorge

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. |
| UTA | Universidad Técnica de Ambato |
| g | Gramo |
| % | Porcentaje. |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| °C | Grados Celsius. |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| μL | Micro litros |
| pI | Punto Isoeléctrico |
| AOAC | Asociación Oficial de Química Analítica |
| ABTS | Ácido 2.2'-azino-bis-3-etilbenziazolina-6-sulfónico |
| p/v | Peso/Volumen |
| GAE | Equivalente de Ácido Gálico |
| SDS | Sodio dodecilsulfato |
| PAGE | Electroforesis en geles de Poliacrilamida |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| PM | Peso Molecular |
| PSA | Amonio Persulfato |
| SGF | Fluido Gástrico Simulado |
| INIAP | Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias |
| TEMED | Tetrametiletilenediamina |
| FT | Fenoles Totales |
| TBARS | Ácido 2-tiobarbitúrico |
| DPPH | 2.2-difenil-1-picrilhidracilo |
| MDA | Malondialdehído |

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|------------------------|------|
| INDICE DE FIGURAS..... | xi |
| INDICE DE TABLAS..... | xii |
| INDICE DE ANEXOS..... | xiii |
| RESUMEN..... | xiv |
| SUMMARY..... | xv |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |

CAPITULO I

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.1 | Guachanzo..... | 2 |
| 1.1.1 | <i>Clasificación taxonómica.....</i> | 2 |
| 1.1.2 | <i>Especie Caryodendron orinocense Karst.....</i> | 2 |
| 1.1.3 | <i>Origen y distribución geográfica.....</i> | 2 |
| 1.1.4 | <i>Descripción.....</i> | 3 |
| 1.1.5 | <i>Composición de la semilla.....</i> | 3 |
| 1.2 | Proteínas..... | 5 |
| 1.2.1 | <i>Clasificación de las proteínas.....</i> | 6 |
| 1.2.2 | <i>Por su origen.....</i> | 6 |
| 1.2.3 | <i>Por su estructura.....</i> | 7 |
| 1.3 | Selección de la semilla..... | 7 |
| 1.4 | Extracción a nivel de laboratorio..... | 8 |
| 1.5 | Descripción del proceso de extracción del aceite y obtención de la torta..... | 8 |
| 1.5.1 | <i>Extracción mecánica.....</i> | 8 |
| 1.5.2 | <i>Extracción mecánica en frío.....</i> | 9 |
| 1.5.3 | <i>Extracción mecánica en calor.....</i> | 9 |
| 1.6 | Procedimiento de separación de proteínas basadas en diferencias de solubilidad..... | 9 |
| 1.7 | Precipitación isoeléctrica..... | 9 |
| 1.8 | Métodos para cuantificación de proteínas..... | 10 |
| 1.8.1 | <i>Método de BIURET.....</i> | 10 |
| 1.8.2 | <i>Método de BCA.....</i> | 11 |
| 1.8.3 | <i>Método de DUMAS.....</i> | 11 |
| 1.9 | Digestión <i>in vitro</i>..... | 13 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1.9.1 | <i>Digestión duodenal in vitro</i> | 13 |
| 1.10 | Electroforesis | 14 |
| 1.11 | Polifenoles | 15 |
| 1.12 | Actividad antioxidante | 16 |
| 1.13 | Técnica TBARS | 16 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2. | MARCO METODOLOGICO | 18 |
| 2.1 | Lugar de la investigación | 18 |
| 2.2 | Unidad de análisis | 18 |
| 2.3 | Factores de estudio | 18 |
| 2.4 | Tamaño de muestra | 18 |
| 2.5 | Materiales, Equipos y Reactivos | 19 |
| 2.5.1 | <i>Material vegetal</i> | 19 |
| 2.5.2 | <i>Equipos</i> | 19 |
| 2.5.3 | <i>Materiales</i> | 19 |
| 2.5.4 | <i>Reactivos</i> | 20 |
| 2.6 | Flujograma de Trabajo | 22 |
| 2.7 | Métodos y Técnicas | 23 |
| 2.7.1 | <i>Extracción mecánica</i> | 23 |
| 2.7.4 | <i>Desengrasado de la harina de guachanzo</i> | 24 |
| 2.7.5 | <i>Precipitación Isoeléctrica</i> | 24 |
| 2.7.6 | <i>Cuantificación proteica</i> | 25 |
| 2.8 | Digestión gástrica <i>in vitro</i> | 27 |
| 2.8.1 | <i>Digestión gástrica</i> | 28 |
| 2.8.2 | <i>Digestión duodenal</i> | 28 |
| 2.9 | Acción antioxidante del aislado proteico de guachanzo | 28 |
| 2.10 | Análisis estadístico | 29 |

CAPÍTULO III

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3. | MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .. | 30 |
| 3.1 | Extracción mecánica para obtención de la torta de guachanzo | 30 |

| | | |
|------------------------------|---|-----------|
| 3.2 | Desengrasado de la harina de guachanzo..... | 30 |
| 3.3 | Rendimiento de la proteína de guachanzo..... | 31 |
| 3.4 | Cuantificación proteica..... | 32 |
| 3.4.1 | Método BIURET..... | 33 |
| 3.4.2 | Método BCA..... | 34 |
| 3.4.3 | Método DUMAS..... | 35 |
| 3.5 | electroforesis SDS-PAGE..... | 36 |
| 3.6 | Análisis de proteínas de guachanzo usando RP-UHPLC..... | 38 |
| 3.7 | Digestión gástrica <i>in vitro</i>..... | 39 |
| 3.7.1 | <i>Digestión gástrica</i> | 39 |
| 3.7.2 | <i>Digestibilidad duodenal</i> | 40 |
| 3.8 | Análisis de proteínas hidrolizadas de guachanzo usando RP-UHPLC..... | 41 |
| 3.9 | Actividad antioxidante del aislado proteico..... | 42 |
| 3.10 | Determinación de fenoles totales (FT)..... | 43 |
| CONCLUSIONES..... | | 45 |
| RECOMENDACIONES..... | | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | | |
| ANEXOS | | |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 1-1: | Descripción general del proceso de extracción mecánica | 8 |
| Figura 2-1: | Componentes Equipo Dumas | 13 |
| Figura 3-1: | Componentes Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS PAGE | 14 |
| Figura 4-2: | Diagrama de flujo del esquema de trabajo | 22 |
| Figura 5-2: | Diagrama de flujo de la extracción mecánica de la torta de guachanzo..... | 23 |
| Figura 6-2: | Diagrama de flujo precipitación isoelectrica de proteína de guachanzo..... | 24 |
| Figura 7-2: | Diagrama de flujo digestión gástrica de proteínas de guachanzo | 27 |
| Figura 8-3: | Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) | 32 |
| Figura 9-3: | Técnica electroforética SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la proteína de guachanzo aislada a diferentes pHs | 36 |
| Figura 10-3: | Análisis de proteínas de guachanzo con electroforesis NATIVE-PAGE | 38 |
| Figura 11-3: | Análisis de proteínas de guachanzo usando RP-UHPLC | 39 |
| Figura 12.3. | Electroforesis SDS-PAGE de Digeridos gástricos de proteínas de guachanzo e hidrolizados con pepsina (2.000 U/mg), con 2-β-Mercaptoetanol | 40 |
| Figura 13-3: | Análisis de proteínas de guachanzo hidrolizadas con pancreatina usando electroforesis SDS-PAGE | 41 |
| Figura 14-3: | Análisis de proteínas hidrolizadas de guachanzo | 42 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabla 1-1: | Clasificación taxonómica | 2 |
| Tabla 2-1: | Valor nutritivo de la semilla y torta de <i>Caryodendron orinocense</i> Karst..... | 4 |
| Tabla 3-1: | Composición de aminoácidos esenciales y no esenciales presentes en el <i>Caryodendron orinocense</i> Karst | 4 |
| Tabla 4-1: | Composición de aceites, proteínas y ácidos grasos de <i>Caryodendron orinocense</i> Karst y otras oleaginosas | 5 |
| Tabla 5-1: | Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados de <i>Caryodendron orinocense</i> Karst y otras oleaginosas | 5 |
| Tabla 6-1: | Calidad del aceite de <i>Caryodendron orinocense</i> Karst comparado con el aceite de <i>Elaeis guineensis</i> | 5 |
| Tabla 7-1: | Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad | 10 |
| Tabla 8-3: | Rendimiento de proteína de guachanzo con extracción en frío | 31 |
| Tabla 9-3: | Rendimiento de proteína de guachanzo con extracción en calor | 32 |
| Tabla 10-3: | Porcentaje de proteína de guachanzo | 33 |
| Tabla 11-3: | Porcentaje de concentración de proteína de guachanzo | 34 |
| Tabla 12-3: | Porcentaje de proteínas método DUMAS | 35 |
| Tabla 13-3: | Determinación de los fenoles totales de la proteína de guachanzo | 43 |

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Pesaje y molienda de las nueces de guachanzo
- Anexo B.** Desengrasado y evaporación del cloroformo de la torta de guachanzo
- Anexo C.** Precipitación isoeléctrica
- Anexo D.** Método BCA
- Anexo E.** Método DUMAS
- Anexo F.** Electroforesis
- Anexo G.** Electroforesis NATIVE-PAGE
- Anexo H.** Electroforesis SDS-PAGE de Digeridos gástricos de proteínas de guachanzo e hidrolizados con pepsina (2.000 U/mg)
- Anexo I.** Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de guachanzo hidrolizadas con pancreatina
- Anexo J.** Análisis de varianza Método Biuret
- Anexo K.** Análisis de varianza Método BCA
- Anexo L.** Análisis de varianza determinación de polifenoles

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la extracción mecánica y caracterización de proteínas y polifenoles, así como la digestibilidad de la proteína obtenida de la torta de guachanzo (*Caryodendron orinocense Karst*). En BIO-PROPEPTI laboratorio de Alimentos Funcionales en la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Las nueces se recolectadas en la parroquia Unión Milagreña, provincia de Orellana. Se aplicaron dos tipos de extracción mecánica en frío y calor a partir de 800 g de nueces secas, obteniéndose 486.78 g de torta, la torta se desengrasó con cloroformo relación 1:10 (p/v)(Torta:CHCL₃), con agitación constante por 12 horas, la harina se mezcló con agua en porción 1:10 y se llevó a pH 8.0; se realizó precipitación isoelectrica al pH 3.0; pH 4.0; pH 5.0; pH 6.0; luego refrigeración por 24 horas, se separa las dos fases y se congela a -84 °C para liofilización. A las muestras se analizó el rendimiento en relación al método de extracción, perfil proteico mediante electroforesis SDS-PAGE, actividad antioxidante de las proteínas y polifenoles, sobre todo la digestibilidad gástrica in vitro de las proteínas. Los resultados de la extracción varían de acuerdo al método de extracción. En el análisis electroforético tenemos presencias de 7S globulinas con un peso molecular de 97 kDa aproximadamente, 11S globulinas ácidas con un peso molecular de 47 kDa y 2S albúminas con un peso molecular aproximado de 14 kDa. La proteína presento actividad antioxidante que corresponde a resultados en los diferentes métodos de extracción en frío y calor a pH 6.0 obteniéndose 56.18 uMTrolox/g y a pH 5.0; 52.06 uMTrolox/g respectivamente. Pero no se determinó la actividad antioxidante de los polifenoles del sobrenadante, debido a que no se contó con el reactivo apropiado para el análisis, se recomienda realizar la actividad antioxidante del sobrenadante el cual posee una importante actividad antioxidante que corresponde a los polifenoles. En la digestibilidad gástrica las proteínas son digeribles en su totalidad, es decir las proteínas son susceptibles al proceso hidrolítico y a las condiciones fisiológicas simuladas.

PALABRAS CLAVE: <BIOQUÍMICA>, <EXTRACCIÓN MECÁNICA>, <PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA>, <GUACHANZO (*Caryodendron orinocense Karst*)>, <ELECTROFORESIS SDS-PAGE>, < PROTEÍNAS VEGETALES>, <DIGESTIÓN GÁSTRICA>

SUMMARY

The present investigation was about the mechanical extraction, the protein and polyphenol characterization and the protein digestion from the *guachanzo* (*Caryodendron orinocense* Karst) cake. In the BIO-PROPEPTI functional food laboratory of the Food Engineering and Science Faculty of Universidad Técnica de Ambato. The nuts were collected in the parish of Union Milagreira, Orellana province. Two types of mechanical extractions were applied: cold and hot using 800 g of dried nuts; 486.78 g of cake were gotten. The cake was degreased using chloroform (1: 10 w/v) (cake/CHCl₃) shaking constantly for 12 hours. The flour was mixed with water (1:10) and pH 6.0. Then it went to the freezer for 24 hours. The two phases were separated and frozen at -84 °C for lyophilisation. The dried sample yield against the extraction method, protein profile using SDS-PAGE electrophoresis, protein and polyphenol antioxidant activity in particular protein gastric digestion in vitro, was analyzed. The extraction results change depending on the extraction method. The electrophoresis analysis showed 7S globulins (molecular weight of 97 kDa), 11S acids globulin (molecular weight of 47 kDa) and 2S albumins (molecular weight of 14 kDa). The protein showed an important antioxidant activity corresponding to the cold and hot extraction method results at pH6.0 obtaining 56.18 uMTrolox/g and at pH 5.0, 52.06 uMTrolox/g respectively. However, the supernatant polyphenol antioxidant activity was not determined due to the appropriate reactive for the analysis was not available. We recommend to carry out the supernatant antioxidant activity, since it has an important antioxidant activity corresponding to the polyphenols. In the gastric digestion the proteins are digestible, that is, the protein are subjected to the hydrolytic process and the simulated physiological conditions.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY >, <MECHANICAL EXTRACTION>, <ISOELECTRIC PRECIPITATION>, <GUACHANZO (*Caryodendron orinocense* Karst)>, <SDS-PAGE ELECTROPHORESIS>, <VEGETABLE PROTEIN>, <GASTRIC DIGESTION>.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador debido a su ubicación geográfica existen gran variedad de alimentos, sobre todo en el sector frutícola. El oriente amazónico, específicamente en la provincia de Orellana; ha sido definido como una de las regiones de gran importancia por su gran biodiversidad, encontrándose varias especies de frutas y semillas con pocos estudios, ricas en cuanto a su contenido nutricional.

Dentro de estos grupos se encuentran las nueces comestibles, fuente de alimentación y de gran potencial en la industria alimentaria, son frutos ricos en aceite y almidón. Una especie relacionada es *Caryodendron orinocense* Karst. Comúnmente llamada guachanzo en amerindio. (FAO, 1987, p 67-265) la cual es comestible y rico en ácidos grasos, siendo esta nuez nuestro objetivo de trabajo de Titulación.

Las semillas son utilizadas con propósitos nutricionales e industriales; en gran parte no han sido explotadas eficientemente, en países como Ecuador, donde se encuentran en gran variedad, estos son consumidos como alimentos. El guachanzo (*Caryodendron orinocense* Karst.) crece en la base de los Andes de Venezuela, Ecuador y Colombia. (FAO, 1987, p. 67-265) Sus semillas o nueces son consideradas un producto alimenticio no convencional, consumidas por los lugareños de las diferentes regiones.

El conocimiento del perfil proteico es importante en la formulación de mezclas de alimentos por ser indicadores de interés de la calidad nutricional de los mismos, Sin embargo, el desarrollo de muchos países y de su cultura alimentaria dependerá en gran parte de la evaluación y de las nuevas tecnologías de alimentos que sean capaces de aprovechar aquellas fuentes no convencionales pero disponibles en el país, que permitan modificar hábitos, complementar las dietas y mejorar el estado nutricional de la población; y de esta manera se busca satisfacer las necesidades y atenuar los problemas nutricionales que afectan principalmente a las poblaciones de menores recursos. (Padilla, Alfaro y Alvarez, 2016, p. 1-12)

Esta búsqueda se encuentra enmarcada en el objetivo tres del Plan Nacional del buen vivir donde se plasma el artículo 66 de la Constitución de la República. “El derecho a una vida digna, que asegure la salud, alimentación y nutrición, agua potable, vivienda, saneamiento ambiental, educación, trabajo, empleo, descanso y ocio, cultura física, vestido, seguridad social y otros servicios sociales necesarios”. Por ello, mejorar la calidad de vida de la población es un proceso multidimensional y complejo. (SENPLADES, 2013, p. 135-152)

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Guachanzo

Es un árbol vistoso que puede medir 18 metros de copa frondosa, su hábitat es la selva húmeda” (Garnica, Sindy y Ramirez, 2009, p. 3-4) Este majestuoso árbol captura grandes cantidades de CO₂, mejora del suelo, y ayuda en la renovación de las cuencas hidrográficas. Es una de las especies más prometedoras de la Amazonía, por lo que ha sido estudiado por más de 60 años. (Alfaro, Padilla, 1998, p. 2)

1.1.1 Clasificación taxonómica

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica

| | |
|----------------------|---|
| División: | Embriofitas sifonógamas |
| Subdivisión: | Angiospermas |
| Clase: | Dicotiledónea |
| Subclase: | Arquideamideas |
| Orden: | Euphorbiales |
| Familia: | Euphorbiacea |
| Género: | Caryodendron |
| Sinónimo: | Dioicia Tetrandia Linneo; |
| Especie: | Caryodendron orinocense karst |
| Nombre común: | Inchi, Kahai (Colombia); palo de nuez (Venezuela); tocay taque, taqui, caycay, kasepache, cumura, nambi, almendro del Peru (Peru), ninacuru inchi, nuez de barinhas, guachanzo (Ecuador) (español y amerindio). |

Fuente: (FAO. 1987. p. 67-265)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.1.2 Especie *Caryodendron orinocense Karst*

1.1.3 Origen y distribución geográfica

Es una especie autóctona de la Orinoquia y la Amazonia Suramericana, se encuentra distribuida en el Brasil, Colombia, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela, constituido por cuatro especies que

tienen como hábitat natural el bosque húmedo y muy húmedo tropical; con temperaturas que oscilan entre los 24 °C o más con promedios anuales de lluvia entre los 2000 mm y 4000 mm, donde se presentan temporadas secas que pueden alcanzar más de 4 meses, distribuidos altitudinalmente entre 0 a 2300 m.s.n.m. Las especies de *Caryodendron* presentan propiedades notorias como plantas oleaginosas y medicinales.

1.1.4 Descripción

Árbol de 35 m² con una copa aplanada pequeña pero densa de 12 m de diámetro, raramente de más de 15 m de alto, la corteza va de parda a roja parduzca, de 2 mm de espesor con mudas periódicas a color verde claro, con exudación de un látex anaranjado, sistema radical amplio y superficial, con grandes raíces que se ven en la superficie.

Las hojas alternas y simple; las estipulas caen pronto; el peciolo de 3-5.5 cm de largo; la lámina elíptica de 22-30.5 cm de largo y 6.5-10.5 cm de ancho, el ápice agudo, la base subcuneada, los márgenes enteros con una hilera de pequeñas lúnulas no lejos de los bordes, glabra, de color verde oscuro brillante en el haz y más pálido en el envés, y la venación clara. La inflorescencia es una panícula terminal, las flores verdosas, de 2.5-3.5 mm de diámetro, con brácteas grandes y persistentes; 5-6 sépalos pequeños, caducos y ovados; no tiene pétalos; el ovario globular y trilobular. La semilla es una cápsula leñosa, de color gris de 3.7-6.5 cm de largo y 3.2-4.5 cm de diámetro; 3 semillas, cerúleas, de color pardo-gris, con 3 caras y ligeramente convexas, con tés de color pardo oscuro y endospermo blanco cremoso. Florece entre junio y septiembre; fructifica entre septiembre y diciembre. (FAO, 1987, p. 67-265)

1.1.5 Composición de la semilla

El fruto del árbol de guachanzo está conformado por tres partes fundamentales; la cáscara, el cuesco y la semilla o nuez. El fruto es el componente con mayor importancia industrial que posee el árbol, debido a que a partir de él se obtiene el aceite. El fruto se puede clasificar por forma, tamaño, peso de nueces y contenido de aceite. (Garnica, Sindy y Ramirez, 2009, p. 3-4) El endospermo carnoso, es comestible y muy semejante a la nuez europea, la cual tiene de 70 a 80% de finísimo aceite que reemplaza al de oliva y otros.

El árbol adulto produce en promedio 150 a 200 kg, es decir más o menos 3 toneladas promedio al año; la semilla contiene 55% de aceite (superando al de soya), 15% de proteínas, 30% de carbohidratos y es uno de los alimentos vegetales mejor balanceados de la selva húmeda, con un buen contenido de minerales y alto valor nutricional como se presenta en las **Tabla 2-1**. (Cisneros y Diaz, 2006, p. 22-23) Teniendo en cuenta su alto contenido de aceite, podría constituir una de las industrias de aceite de mayor economía y porvenir.

Tabla 2-1: Valor nutritivo de la semilla y torta de *Caryodendron orinocense* Karst

| COMPONENTE | SEMILLA | | TORTA | |
|---------------------|---------|----------|-------|----------|
| | % | CALORIAS | % | CALORIAS |
| ACEITE | 54.3 | 488.70 | --- | --- |
| PROTEÍNAS | 19.7 | 78.80 | 43-46 | 172.00 |
| AZUCARES REDUCTORES | 9.77 | 3.08 | 1.68 | 6.72 |
| ALMIDÓN | 17.70 | 7.80 | 38.60 | 154.40 |
| FIBRA | 2.80 | --- | 6.10 | --- |
| CENIZAS | 3.05 | --- | 6.68 | --- |
| OTROS | 1.70 | --- | 3.70 | --- |

Fuente: (Cisneros y Diaz 2006, p. 22-23)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Tabla 3-1: Composición de aminoácidos esenciales y no esenciales presentes en el *Caryodendron orinocense* Karst.

| AMINOACIDOS ESENCIALES | GUACHANZO % | REQUERIMIENTO g/día | AMINOACIDOS NO ESENCIALES | GUACHANZO % |
|------------------------|-------------|---------------------|---------------------------|-------------|
| Arginina | 4.19 | --- | A. aspártico | 3.92 |
| Histidina | 0.83 | --- | Serina | 1.95 |
| Isoleucina | 1.25 | 0.70 | A. glutámico | 6.25 |
| Fenilalanina | 1.46 | 1.10 | Prolina | 2.10 |
| Leucina | 2.29 | 1.10 | Glicina | 1.60 |
| Lisina | 1.05 | 0.80 | Alanina | 1.65 |
| Valina | 1.49 | 0.80 | Tirosina | 1.21 |
| Treonina | 1.38 | 0.50 | Cistina | 0.74 |
| Metionina + cistina | 0.64 | 1.10 | | |

Fuente: (Cisneros y Diaz 2006, 24-28)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Tabla 4-1: Composición de aceites, proteínas y ácidos grasos de *Caryodendron orinocense* Karst y otras oleaginosas

| COMPOSICION | GUACHANZO % | P. AFRICANA % |
|--------------------|-------------|---------------|
| Aceite (semilla) | 41-59 | 37-48 |
| Proteína (semilla) | 19.7 | --- |
| Proteína (torta) | 43-46 | 17.0 |
| Ácido oleico | 14.2 | 40-53 |
| Ácido Linoleico | 72.7 | 2-11 |
| Ácido linolenico | 2.5 | --- |
| Ácido esteárico | 4.0 | 1.0 |
| Ácido mirístico | --- | 2.5 |
| Ácido Palmítico | 7-8 | 32-47 |
| Ácido Araquidónico | --- | --- |

Fuente: (Cisneros y Diaz, 2006, p 22-23)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Tabla 5-1: Porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados de *Caryodendron orinocense* Karst y otras oleaginosas.

| ACEITE | SATURADOS | MONOINSATURADO | POLIINSATURADO |
|----------------|-----------|----------------|----------------|
| Guachanzo | 11.6 | 14.0 | 75.0 |
| Palma africana | 48.0 | 44.0 | 8.0 |
| Oliva | 15.5 | 75.0 | 9.5 |

Fuente: (Cisneros y Diaz, 2006, p. 22-23)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Tabla 6-1: Calidad del aceite de *Caryodendron orinocense* Karst comparado con el aceite de *Elaeis guineensis*

| CALIDAD | <i>C. orinocense</i> | <i>E. guineensis</i> |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Índice de acidez | 29.8-63.0 | --- |
| Índice de refracción | 1.4700-1.4744 | 1.4531-1.4580 |
| Índice de saponificación | 155.5-194.1 | 195-205 |
| Índice de Yodo | 125.9-141 | 44-58 |
| Peso específico | 0.921-0.922 | --- |
| Densidad 20°C | 0.9140-0.921 | 0.900 a 40°C |

Fuente: (Cisneros y Diaz, 2006, p. 22-23)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.2 Proteínas

La palabra proteína del griego “proteos” que quiere decir primero, por forma parte básica de la estructura corporal. Término sugerido por Mulder, químico Holandés, en el siglo XIX para designar al universal de todos los tejidos vegetales y animales. “Sin proteínas no hay vida posible en nuestro planeta”. A través de ellas se producen los principales fenómenos de la vida.

Las proteínas son sustancias orgánicas complejas nitrogenadas y tienen la función fundamental en células animales y vegetales. Cada especie tiene proteínas características, lo que le confiere su carácter específico, tanto genético como inmunológico. (Brandan et al. 2008, p. 1-5). Los aminoácidos son la unidad estructural y funcional de una proteína, que presentan un sólo elemento en común dentro de una gran variabilidad en cuanto a estructura, el alfa-amino-carboxilo, formado por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno, éste último, determinante de la estructura y función de los aminoácidos.

En su composición se encuentran enlaces peptídicos que son un enlace amida entre un carboxilo y un grupo amino (-CO-NH-), si la unión es menor a diez aminoácidos se denomina oligopéptido, si es mayor es un polipéptido, denominación específica dada a una proteína de alto peso molecular. (Torres, 2014, p. 2137-2138)

1.2.1 Clasificación de las proteínas

1.2.2 Por su origen:

- **Proteínas de origen animal:**
 - a) **Escleroproteínas o proteínas fibrosas:** como la elastina del músculo y colágeno del tejido conjuntivo. Estas proteínas son insolubles debido a su estructura molecular, y desempeñan funciones de protección y soporte de tejidos.
 - b) **Esferoproteínas o proteínas globulares:** son constituyentes de líquidos orgánicos, como la caseína de la leche, la albúmina de la clara del huevo y las globulinas del plasma sanguíneo. Este tipo de proteínas en general, son solubles en agua, se digieren fácilmente y contienen una buena proporción de aminoácidos esenciales.
 - c) **Protaminas e Histonas:** son polipéptidos de pesos moleculares no muy elevados. Se encuentran en los huevos de pescados.

- **Proteínas de origen vegetal:**

- a) **Glutelinas y Prolaminas:** las contienen los vegetales, especialmente los cereales, por ej. Glutenina en el trigo, ordeina en la cebada, gliadina en el trigo y centeno, etc. El compuesto denominado gluten es una mezcla de gliadina más Glutenina.

1.2.3 *Por su estructura:*

- a) **Simple u holoproteínas:** son las compuestas solo por aminoácidos. Por ejemplo albúmina.
- b) **Complejas o heteroproteínas:** son las que se encuentran unidas a un grupo no proteico llamado grupo prostético. Por ej. lipoproteínas y nucleoproteínas. (Brandan et al. 2008, p. 1-5)

1.3 **Selección de la semilla**

En este proceso, lo que se hace es adecuar las semillas, para facilitar los tratamientos posteriores, y mejorar el rendimiento del proceso. (Cisneros y Diaz, 2006, p. 22-23) Las etapas de recepción de la semilla y acondicionamiento de la almendra son procesos continuos que no requieren equipos a gran escala industrial para procesar la materia prima, se procede a secar durante 3 meses al ambiente. Las etapas restantes del proceso de extracción mecánica al igual que las primeras trabajan en proceso discontinuo pero con equipos de menor capacidad para procesar la almendra, para disminuir costo de equipos.(Garnica, Sindy y Ramirez, 2009, p. 3-4)

Para el sistema de prensado, donde se extrae el aceite. El procedimiento involucra modificaciones físicas para reducir la superficie de contacto de la almendra debido a que es sometido a una molienda por extrusión en frio y en calor, el cual se encarga de obtener la torta contenida en la almendra.

1.4 Extracción a nivel de laboratorio

Se ejecutaron ensayos con porciones de 100g de almendra de guachanzo, con el fin de determinar el mejor método de extracción en frío y en calor, en cuanto a rendimientos y costos para una mejor extracción de la torta de guachanzo. Los ensayos fueron ejecutados en el Laboratorio de Alimentos funcionales BIO-PROPEPTI de la Universidad Técnica de Ambato.

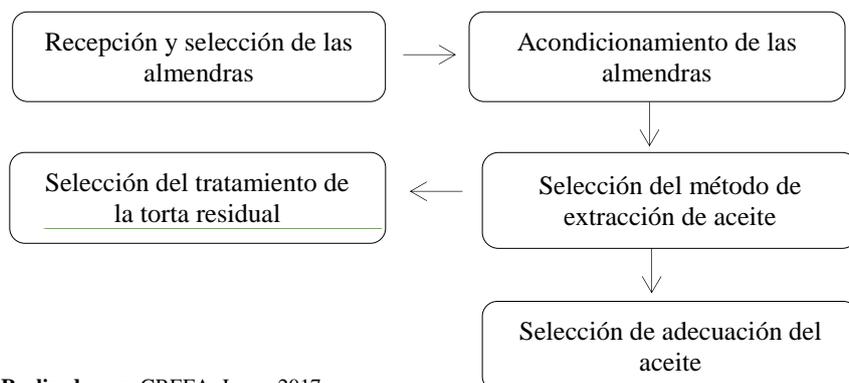
1.5 Descripción del proceso de extracción del aceite y obtención de la torta

1.5.1 Extracción mecánica

La extracción mecánica que tiene como operación principal el prensado, donde se aprovecha la fuerza ejercida por el tornillo de la prensa; esta pieza muele la almendra y por acción de la gravedad y la fuerza centrífuga produce la salida del aceite. Esta forma de extracción acompañada de una limpieza, reducción de tamaño y un acondicionamiento de la almendra antes de entrar al sistema de prensado, un posterior tamizado y filtrado del aceite. (Cisneros y Diaz, 2006, p. 36-37)

La producción de aceite de guachanzo, cuenta con tratamientos definidos por industrias que comparten los mismos procedimientos, así como para otras semillas oleaginosas como la soya y el palmiste. El proceso está comprendido en cinco secciones principales como se muestra en la siguiente figura.

Figura 1-1: Descripción general del proceso de extracción mecánica



Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.5.2 Extracción mecánica en frío

La extracción mecánica en frío tiene como operación principal el prensado en frío, donde se beneficia de la presión ejercida por el tornillo de la prensa; este tornillo sin fin, muele la almendra y por acción de la fuerza centrífuga produce la salida del aceite.

1.5.3 Extracción mecánica en calor

La extracción mecánica en calor tiene como función principal el prensado más la acción del calor, donde se aprovecha la presión ejercida por el tornillo sin fin de la prensa y el calor producida por un mechero; El tornillo muele la almendra y por acción del calor el aceite se desprende de la fibra de la almendra y por acción de la gravedad centrífuga que se produce en el mecanismo del prensado el aceite procede a salir.

Esta forma de extracción es acompañada de una limpieza, reducción de tamaño de partícula y un acondicionamiento de la semilla antes de entrar al sistema de prensado, un posterior tamizado y filtrado del aceite.(Cisneros y Diaz, 2006, p. 36-37)

1.6 Procedimiento de separación de proteínas basadas en diferencias de solubilidad

La purificación de proteína es primordial para el análisis de sus propiedades físicas y funcionales, las células contienen miles de proteínas distintas, cada una en cantidades variables. De este modo, el aislamiento de proteína en cantidades suficientes para diferentes análisis será un inmenso reto que requiere el uso sucesivo de múltiples técnicas de purificación.(Murray et al. 2010, p. 699)

Existen métodos clásicos que se aprovechan las diferencias de solubilidad relativa de proteínas individuales en función del pH (precipitación isoelectrica). Polaridad (precipitación con etanol o acetona) o concentración de sal (separación por adición de amonio sulfato).

1.7 Precipitación isoelectrica

Todas las proteínas presentan un mínimo de solubilidad de acuerdo a su pH isoelectrico, que es el valor de pH en el cual la proteína no posee carga eléctrica. En estas condiciones, no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteínas vecinas y tienden a coalescer y precipitar. Toda proteína tiene un pI (punto Isoeléctrico) y este va desde 1.5 hasta 11.0 (Grajales, 2005, p. 39-41)

1.8 Métodos para cuantificación de proteínas

Constan diferentes formas para la cuantificación de proteínas. Muchos de estas formas se basan en:

- La capacidad para absorber luz en el Ultravioleta Visible
- La formación de químicos derivados
- La propiedad de unirse a ciertos colorantes (Fernandes y Galvan, 2006, p. 1-2)

Tabla 7-1: Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad

| Método | Rango de sensibilidad (μg) | Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración |
|---|---|---|
| Métodos de Absorción | | $\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$ $\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$ |
| A_{280} | 100-3000 | Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$ |
| A_{205} | 3-100 | Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$ |
| $A_{280} - A_{260}$ | 100-3000 | Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0.6$ |
| $A_{235} - A_{280}$ | 25-700 | Proteína ($\mu\text{g/mL}$) = $144(A_{215} - A_{225})$ |
| $A_{224} - A_{236}$ | 5-180 | |
| $A_{215} - A_{225}$ | 2-45 | |
| Métodos Derivados Colorimétricos | | |
| Biuret | 1000-10000 | $\epsilon_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$ |
| Lowry | 25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm | Usar curva estándar |
| Bradford | 1-15 | $\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$ |
| BCA | 0.5 - 10 | Usar curva estándar |
| Métodos Derivados Fluorimétricos | | |
| o-ftalaldehido | 1-5 $\lambda_{\text{excitación}}$ a 340 nm $\lambda_{\text{emisión}}$ a 475 nm | Usar curva estándar |

Fuente: (Fernandes y Galvan, 2006, p. 2)

Realizado por: Grefa, Jorge, 2017

1.8.1 Método de BIURET

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos amino (NH) de los enlaces peptídicos en medio básico. El 1Cu^{2+} se acompleja con 4NH . (Fernandes y Galvan, 2006, p. 3)

El intenso color es directamente proporcional a la presencia de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. El método Biuret se usa solo para preparados muy concentrados debido a que la sensibilidad del método es muy sensible para este tipo de concentrados.

1.8.2 Método de BCA

El ácido bicinconínico, es una sal sódica, formula capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. (Fernandes y Galvan, 2006, p. 3) Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo generan un método para la cuantificación de proteínas que es muy sensible, rápido y sobre todo sencillo.



Fuente: (Fernandes y Galvan, 2006, p. 3)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.8.3 Método de DUMAS

El método de Dumas en química analítica es un método para la determinación cuantitativa del nitrógeno en sustancias químicas basado en un método descrito por Jean-Baptiste Dumas hace más de un siglo y medio (1831).

Se ha desarrollado una técnica instrumental automatizada que es capaz de medir rápidamente la concentración total de nitrógeno de las muestras de alimentos y comienza a competir con el método Kjeldahl como método estándar de análisis del contenido de nitrógeno de algunos alimentos y más. (Scientifica, 2013, p. 1-2)

- **El método tiene tres pasos:**

Combustión: una vez que la muestra se pesa y purga de cualquier gas atmosférico, se calienta en un horno de alta temperatura y se quema rápidamente en presencia de oxígeno puro a aproximadamente 1.000 °C. Esto conduce a la liberación de sustancias tales como dióxido de carbono, agua, dióxido de nitrógeno y, sobre todo, nitrógeno como varios óxidos (N_yO_x).

CF - Horno de Combustión Pasamos de una muestra sólida / líquida a un gas que contiene NO_x , H_2O , CO_2 y O_2 residual con He como portador

Reducción y separación: los productos de la combustión se recogen y se permiten equilibrar. La mezcla de gas se hace pasar sobre cobre caliente para eliminar cualquier oxígeno y convertir los óxidos de nitrógeno en nitrógeno molecular. La muestra se pasa a través de trampas que eliminan el agua y el dióxido de carbono.

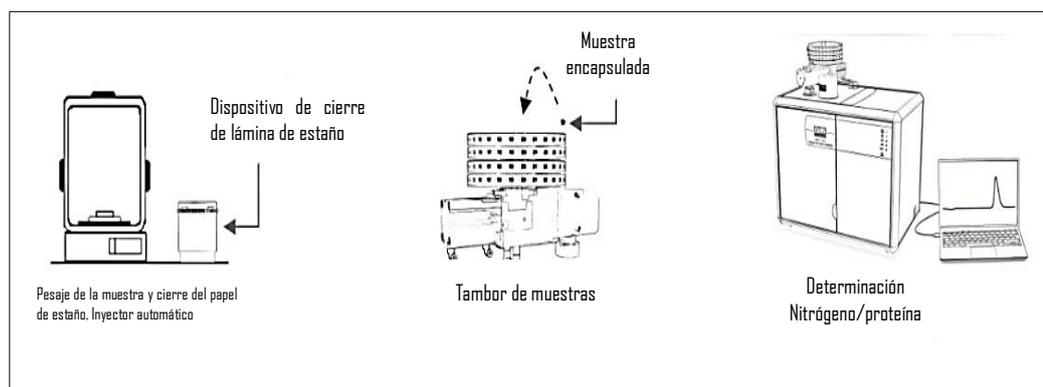
Detección: la señal medida desde el detector de conductividad térmica para la muestra puede entonces convertirse en contenido de nitrógeno.

TCD - Detector de Conductividad Térmica determina el contenido de nitrógeno sin necesidad de un gas de referencia

Beneficios de Dumas El método Dumas tiene las ventajas de ser fácil de usar y automatizar. También es considerablemente más rápido que el método Kjeldahl, tomando unos minutos por análisis, en comparación con la hora o más para Kjeldahl. También no hace uso de productos químicos tóxicos o catalizadores ecológicos. Además, al igual que con Kjeldahl, no da una medida de proteína verdadera, ya que registra nitrógeno no-proteína además. (Scientifica, 2013, p. 2)

Además, al igual que con Kjeldahl, se necesitan diferentes factores de corrección para diferentes proteínas porque tienen diferentes secuencias de aminoácidos con contenido de nitrógeno variado. Sin efecto de memoria.

Figura 2-1: Componentes Equipo Dumas



Fuente: (Scientifica, 2013, p. 2)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.9 Digestión *in vitro*

La prueba de digestibilidad *in vitro*, es utilizada para simular la digestibilidad de una proteína. (Nielsen, 2013, p. 274) El cambio de pH ayuda en el ensayo *in vitro* de la digestibilidad, el cual estima la digestibilidad de una proteína, midiendo el grado de hidrólisis de la proteína después de la reacción bajo condiciones estandarizadas con enzimas digestivas comerciales. (Melorose, Perroy y Careas, 2015, p. 5) El método está diseñado para simular la digestión humana mediante el uso de las enzimas tripsina, quimotripsina, peptidasa, y una proteasa bacteriana.

El pH de la solución de proteína y cuando las proteasas rompen los enlaces peptídicos, se liberan grupos carboxilo e iones de hidrógeno. El pH resultante al final del período de la digestión es utilizado para calcular la digestibilidad de proteínas.

1.9.1 Digestión duodenal *in vitro*

La digestión duodenal *in vitro* fue descrito por primera vez por (Jimenez et al. 2011, p. 5-6). Que mediante un proceso de hidrólisis duodenal en la que se simula las condiciones fisiológicas del duodeno humano. Para entonces se tomaba unas muestras de la digestión gástrica y se homogeneizaba con un caldo de enzimas proteolíticas (tripsina, lipasa, quimotripsina, colipasa), cloruro de calcio y sales biliares.

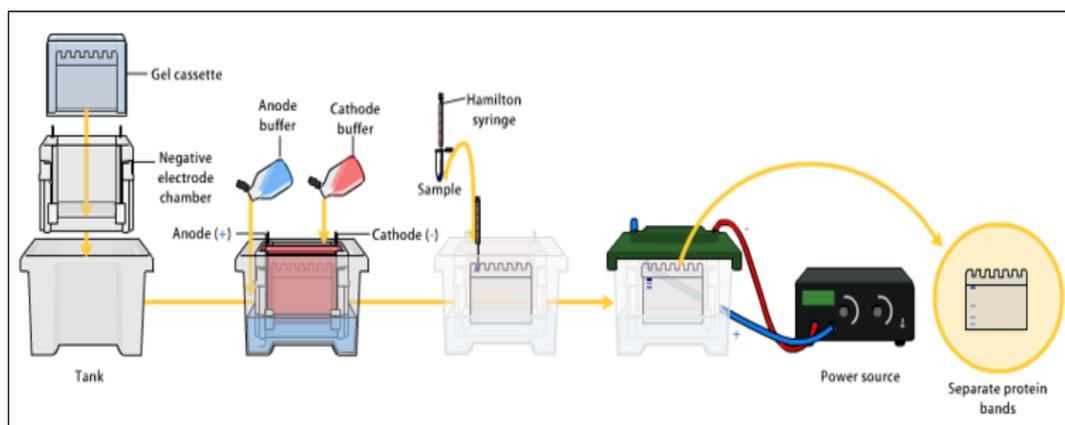
1.10 Electroforesis

Es una técnica analítica semipreparativa, se aíslan biomoléculas, he independientemente de su campo eléctrico y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein.

El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se usaba compuestos reductores y Sodiodecilsulfato (SDS) en las pruebas del peso molecular de proteínas, en lo que se designó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. (SDS-PAGE). (Pérez, 2000, p. 31)

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE) ha sido el método tradicional de análisis de composición de proteínas pero el procedimiento es lento, laborioso y no cuantitativa. Otras ventajas sobre electroforesis en gel tradicional son más bajos requerimientos de la muestra y el volumen de reactivo y una reducción de la exposición a sustancias químicas peligrosas. (Bradová y Matějová, 2008, p. 84)

Figura 3-1: Componentes Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS PAGE



Fuente: (Díaz, 2013, p. 2)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

1.11 Polifenoles

Los polifenoles en los alimentos poseen propiedades antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlcéricas, antialérgicas, antivirales, vasodilatadoras, antihepatotóxicas, molusquicidas y antihelmínticas y; también existen evidencias que verifican la inhibición de la replicación del Virus VSH (Virus Simplex Humano) y el virus VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). También ejerce acción sobre las caries dentales debido al *Streptococcus mutans*, efectos citotóxicos, el crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. Los compuestos fenólicos poseen acción antioxidante en funciones biológicas como retardar el envejecimiento, antimutagénica y anticancerígena. (Sandoval, 2016a, p. 23-24)

Los fenoles son los antioxidantes con más presencia en la dieta humana. Es un gran grupo de metabolitos, son producidos como consecuencia del metabolismo secundario de las plantas, donde su actividad sería de protección a la agresión de agentes extraños. Muchas investigaciones afirman que alimentarse con verduras y frutas ayuda a evitar el cáncer y su mortalidad, así como sufrimientos del corazón.

Los compuestos fenólicos son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y de su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural. Debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones.

Los compuestos fenólicos incluyen distintas clases químicas, tales como ácidos fenólicos (ácido benzoico y hidroxicinámico), flavonoides (flavonoles y antocianinas), estilbenos. (Peña y Restrepo, 2013, p. 26-27). Además, este tipo de compuestos tienen actividades como antimicrobiana, antialérgica, anti-inflamatoria y antineoplásica. Se ha encontrado relación entre la concentración fenólica y la acción antioxidante de varias semillas (girasol, Trigo); frutos (cerezas, arándanos, papas, rábanos); cáscaras de girasol y trigo; raíces (ginseng, rábano, Echinacea,); pieles, entre otros.

Los extractos y sub-extractos de hierbas, frutas, cereales verduras y otros vegetales ricos en polifenoles, están generando interés en la industria, debido a que estos retrasan la degeneración oxidativa de lípidos, optimizando la calidad y el aporte nutricional del producto. (Sandoval, 2016b, p. 23-24)

1.12 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son moléculas conocidas por su acción de neutralizar radicales libres, combatiendo las carencias asociadas al estrés oxidativo. (Ramirez y Echeverri, 2007, p. 1-4) Un compuesto antioxidante es un agregado de los alimentos de consumo diario y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos. Las propiedades antioxidantes no sólo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos. (Colorado et al. 2015, p. 206)

Se han reformado un extenso número de ensayos espectrofotométricos en los últimos tiempos, con el fin de determinar la actividad antioxidante de los alimentos. En pruebas in vitro se utiliza un cazador de radicales libres, con pruebas fáciles de realizar. El ensayo TBARS es un método de decoloración muy utilizado. Los métodos espectrofotométricos usados mayoritariamente por los científicos para la capacidad antioxidante son DPPH y ABTS como empleo de radicales libres, estos se encuentran en extractos vegetales, bebidas y alimentos, teniendo así procedimientos sencillos, rápidos, sensibles y reproducibles. (Sandoval, 2016c, p. 24)

El DPPH y ABTS son métodos más usados por la comunidad científica como evaluaciones en el uso de radicales libres. En la determinación de acción antioxidante de extractos vegetales, alimentos y bebidas. Ya que estos análisis son rápidos, simple, sensible y sobre todo reproducible. (Sandoval, 2016d, p. 25)

1.13 Técnica TBARS

El radical ABTS⁺, es pilar fundamental de las pruebas espectrofotométricas más aplicadas en la acción antioxidante, y en muestras que pueden ser soluciones combinadas o puras. El punto es en activar la molécula metilmioglobina con una molécula de agua, generando un radical catión, en presencia de ABTS con presencia o ausencia de antioxidantes. El análisis tiene una reacción rápida de los antioxidantes, debido a la reducción del radical ferrilmioglobina.

La técnica TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) sirve para determinar el grado de peroxidación de lípidos en alimentos que contienen alto contenido de grasa, es un método de medición sensible rápido y económico, por ello es recomendable para el análisis de un gran número de muestras y para control de calidad. En esta técnica, el ácido tiobarbitúrico

(TBA)(CH₄N₂O₂S) reacciona con malondialdehído (MDA) (C₃H₄O₂), un producto secundario de la peroxidación de lípidos, para generar un color rojo, el cual se puede detectar espectroscópicamente .(Sandoval, 2016e, p. 26-27)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la investigación

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Grupo BIO-PROPEPTI. Laboratorio de alimentos funcionales en el en la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato y en el Laboratorio de toxicología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2 Unidad de análisis

- Torta de nueces de guachanzo (*Caryodendron orinocense* Karst.)

2.3 Factores de estudio

- **Población:** Nueces de guachanzo de la región oriental del Ecuador.
- **Muestra:** Nueces de guachanzo recolectados de la comunidad el descanso, ubicado en la parroquia Unión Milagreña cantón la Joya de los Sachas Provincia de Orellana.

2.4 Tamaño de muestra

- Para la investigación se utilizaron 800 gramos de Torta de guachanzo

2.5 Materiales, Equipos y Reactivos

2.5.1 *Material vegetal*

- Nueces de guachanzo
- Aceite de guachanzo

2.5.2 *Equipos*

- Estufa
- Balanza analítica
- Refrigerador
- Congelador Mab
- pHmetros
- Agitador VW
- Agitador eléctrico vortex Mixer
- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30
- Balanza granataria Modelo VWR-224AC
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freeze
- Centrifuga, eppendorf Modelo 5702
- Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics modelo BTP-3ES0VW
- Equipo de Electroforesis Bio-Rad
- Equipo Velp Scientifica NDA 701
- Espectrofotómetro marca HACH
- Equipo UHPLC Agilent Technologies

2.5.3 *Materiales*

- Probetas

- Espátula
- Magneto
- Goteros
- Rotuladores
- Tubos eppendorf
- Tiras de pH
- Guantes Látex
- Balones de aforo
- Kit Micropipetas
- Envases herméticos
- Varillas de agitación
- Puntas para micropipetas
- Vasos de precipitación
- Tubos para centrifugar

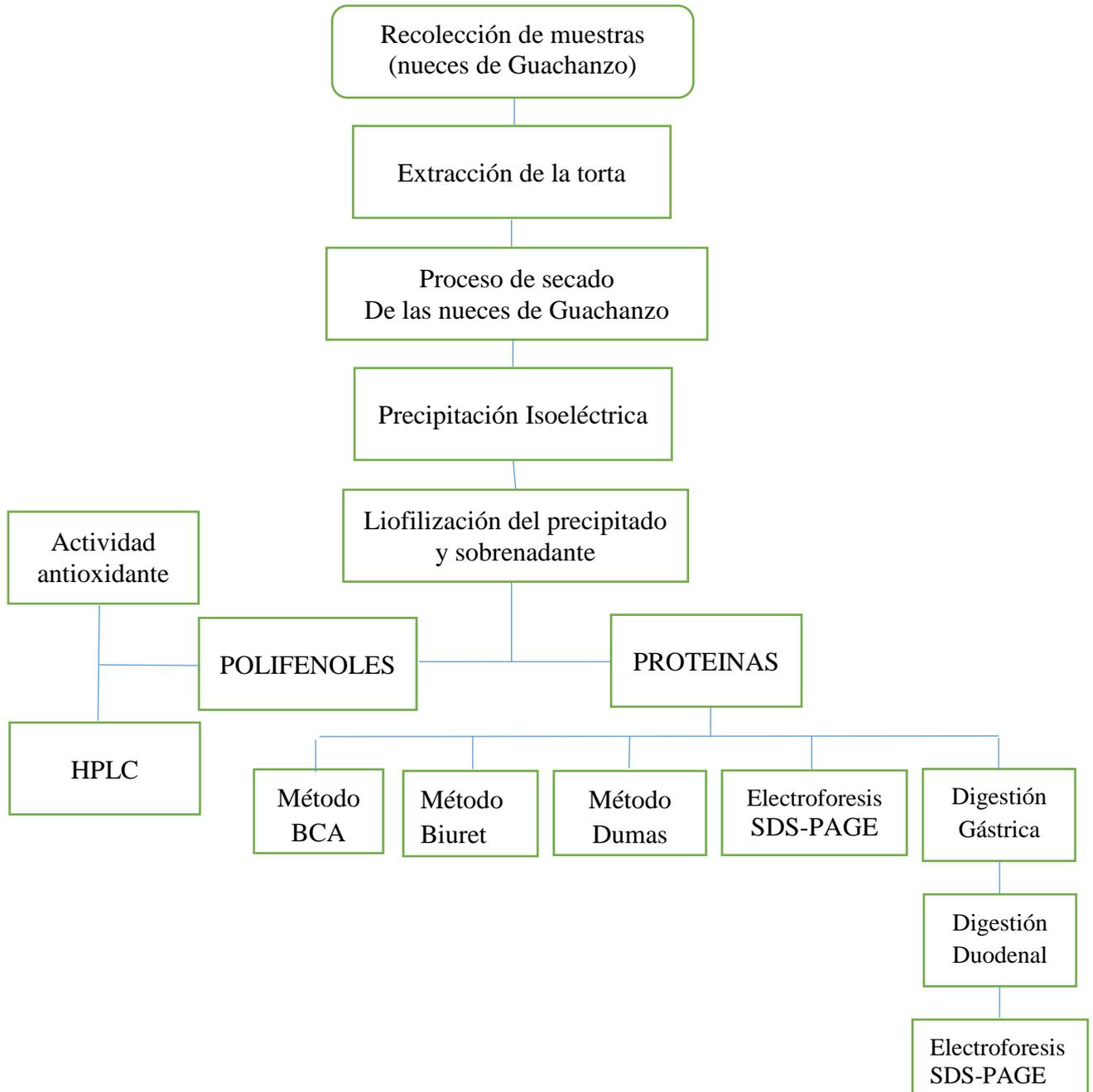
2.5.4 *Reactivos*

- Pancreatina
- Etanol
- Folin
- Cloroformo
- Yoduro de potasio
- Agua desionizada
- Cloruro de sodio
- Hidróxido de sodio
- Ácido acético glacial
- Hidróxido de potasio
- Bicarbonato de sodio
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- Glicerol, Invitrogen # 15514-011
- Bis-acrilamida, # 161-0158, BIO-RAD
- 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- Tris (C₄H₁₁NO₃) # 161-0716, BIO-RAD

- Azul de bromofenol, # 161-0404, BIO-RAD
- Pepsina from porcine gastric mucosa # P6887-106
- Persulfato de amonio (PSA), # 161-0700, BIO-RAD
- Coomassie blue R, Blue R-250, # 161-011, BIO-RAD
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) # 161-0302, BIO-RA
- Estándar de proteínas SDS-PAGE, # 161-0318, BIO-R
- TEMED (N, N, N, N'-Tetramethyletilendiamina), BIO-RAD
- TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0.02 M en ácido acético glacial al 90%)
- Reactivos BCA (Kit comercial marca Thermo Scientific)

2.6 Flujograma de Trabajo

Figura 4-2: Diagrama de flujo del esquema de trabajo.



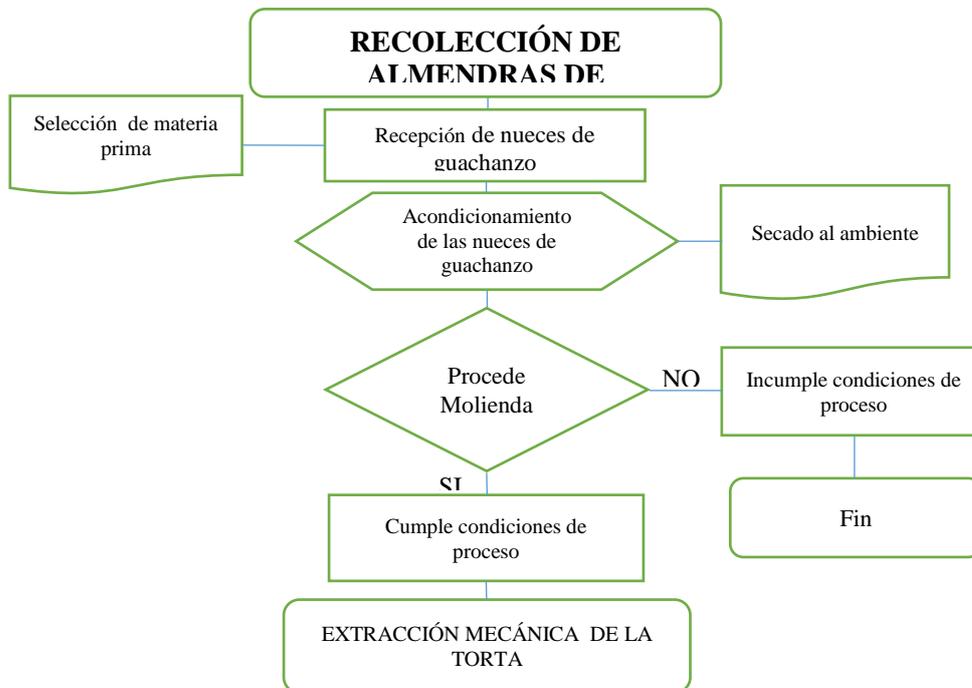
Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIOPROPEPTI (Ambato-2016).

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

2.7 Métodos y Técnicas

2.7.1 Extracción mecánica

Figura 5-2: Diagrama de flujo de la extracción mecánica de la torta de guachanzo



Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIOPROPEPTI (Ambato-2016).

Elaborado por: GREFA, Jorge, 2017

2.7.2 Extracción en frío de la Torta

La extracción en frío se realizó con un molino convencional marca VICTORIA, donde el tornillo sin fin del molino ejerce presión sobre la almendra, forzando a salir el aceite y obteniendo la torta y aceite en forma de una sola masa para un posterior desengrasado.

2.7.3 Extracción mecánica en calor

La extracción en calor se realizó con un molido marca PITEBA donde el prensado del tornillo sin fin, más la acción del calor, el aceite se libera de la fibra separando ambos productos y por

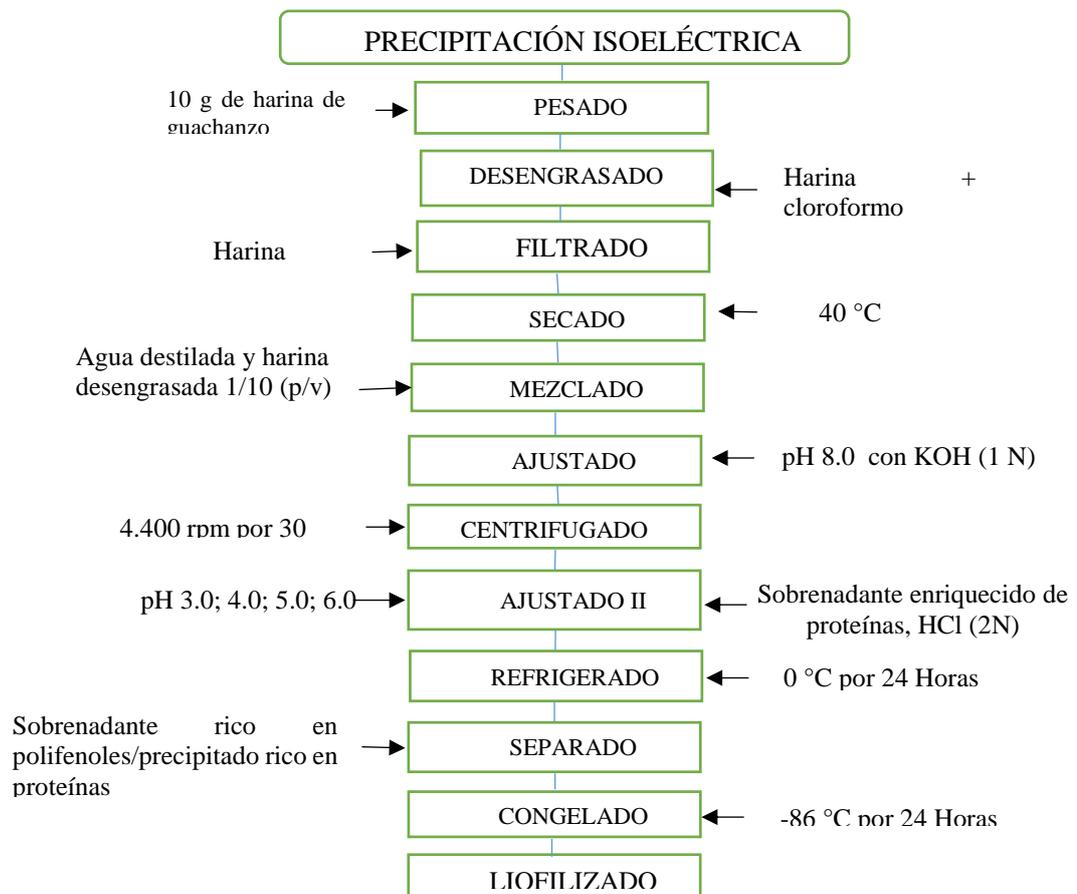
acción de la gravedad centrifuga que se produce en el mecanismo de separación por dos compartimentos independientes del molido.

2.7.4 Desengrasado de la harina de guachanzo

La harina de guachanzo se desengrasó con cloroformo en relación de proporción 1:10 (p/v), con movimiento constante y promedio 12 horas, y posterior se coló en papel de filtro y se escurrió en una estufa de convección lan incubator Modelo In-010 a 42°C.

2.7.5 Precipitación Isoeléctrica

Figura 6-2: Diagrama de flujo la precipitación isoelectrica de la proteína de guachanzo.



Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIOPROPEPTI (Ambato-2016)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

2.7.6 *Cuantificación proteica*

El análisis empleado para la cuantificación de la proteína aislada de guachanzo fue el método de Biuret definido por y método BCA (ácido bicinconínico) establecido por (Nielsen, 2013, p. 275).

2.7.7 *Método BIURET*

Reactivo Biuret: Para la mezcla se necesitó tartrato sódico-potásico (9 g), cobre sulfato pentahidratado (3 g) y yoduro de potasio (5 g). Estos reactivos se diluyeron en el orden mencionado en 400 mL de NaOH 0.2 M y se añadió 600 mL de agua destilada.

Preparación del Blanco: 1 mL de agua destilada + 75 μ l NaOH 0.2 M.

Muestra: en un tubo eppendorf se pesó un promedio de 7.8 a 8 mg de proteína aislada, se añadió 1 mL de agua destilada luego se procede a la adición 0.75 μ l NaOH 0.2 M y en agitación por 15 minutos.

Se preparó una muestra dos en una proporción 1:5 (1.25 ml de reactivo de Biuret + 250 μ l de muestra), posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 13.000 rpm, en este tiempo la base de los tubos eppendorf se dejó en congelación, luego se procedió a la lectura en un espectrofotómetro modelo DR 5000 a 540nm frente a un blanco sin muestra de proteína.

2.7.8 *Método BCA*

Preparación de la muestra.- Se pesaron 5 mg de muestra aislada de guachanzo en un tubo eppendorf y se añadió 1 mL de agua destilada y 75 μ L de NaOH. Se colocó el tubo eppendorf con un magneto en su interior sobre una plancha de agitación durante 15 minutos, posteriormente se retiraron los magnetos para que la muestra sea centrifugada por 15 minutos. Se tomó 0.1 mL de la dilución preparada anteriormente para combinar con 1.9 mL de agua Milli-Q, (dilución 1:20).

Preparación de los estándares.- Se preparó la solución madre con la mezcla de 0.2 mL de la ampolleta de albúmina de suero bovino (BSA) y 1.4 mL de agua Milli-Q. De la solución madre se tomaron 100, 200, 300, 400 y 500 μ L para diluirlos en 400, 300, 200 y 100 μ L de agua Milli-Q respectivamente. Esta preparación se basó en el peso obtenido de la balanza analítica VWR, con la finalidad de disminuir el grado de error en los resultados.

Preparación de la solución BCA.- Esta solución se obtuvo mediante la consideración del número de muestras finales siendo multiplicadas por 1.4 mL de solución del reactivo (azul y blanco).

Lectura de las absorbancias.- Las muestras se preparó con 70 μ L de los estándares y 1.4 mL de las muestras del reactivo (azul y blanco). Y a 562 nm se midió las absorbancias utilizando un espectrofotómetro.

Los datos obtenidos se demostraron en una gráfica patrón elaborada con concentración ya conocida de BSA (albúmina de suero bovino)

2.7.9 *Electroforesis SDS-PAGE*

Para la electroforesis se utilizó la descrita por . Se preparó una solución de guachanzo con concentración 10 mg/mL, luego para la muestra se necesitaron 200 μ l de la solución y se homogenizo con 200 μ l 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), calentando la muestra en un microincubador por 10 minutos, 400 rpm a 80°C.

Para el análisis de la muestra se utilizó un equipo de electroforesis Bio-Rad Mini Protean Tetra System, formando geles con 1mm de espesor, a diferentes concentraciones de poliacrilamida, el gel concentrador o superior se realizó con una concentración de 14% y el gel separador o inferior del 12%, algunos geles también se realizaron a una concentración del 16%, en ausencia y presencia de 2- β -Mercaptoethanol (β -ME) para la reducción de los puentes disulfuro S-S.

En el gel separador se utilizó agua destilada, Tris HCl 1M pH 8.8; acrilamida (30%), SDS (10%), tetrametiletilenediamina (TEMED), persulfato amónico, PSA, (10%) y para el gel separador Tris-HCl 1,5 M pH 6.8; acrilamida (30%), SDS (10%), TEMED, PSA (10%). Para determinar los pesos moleculares de las proteínas del guachanzo se utilizó un estándar pesos

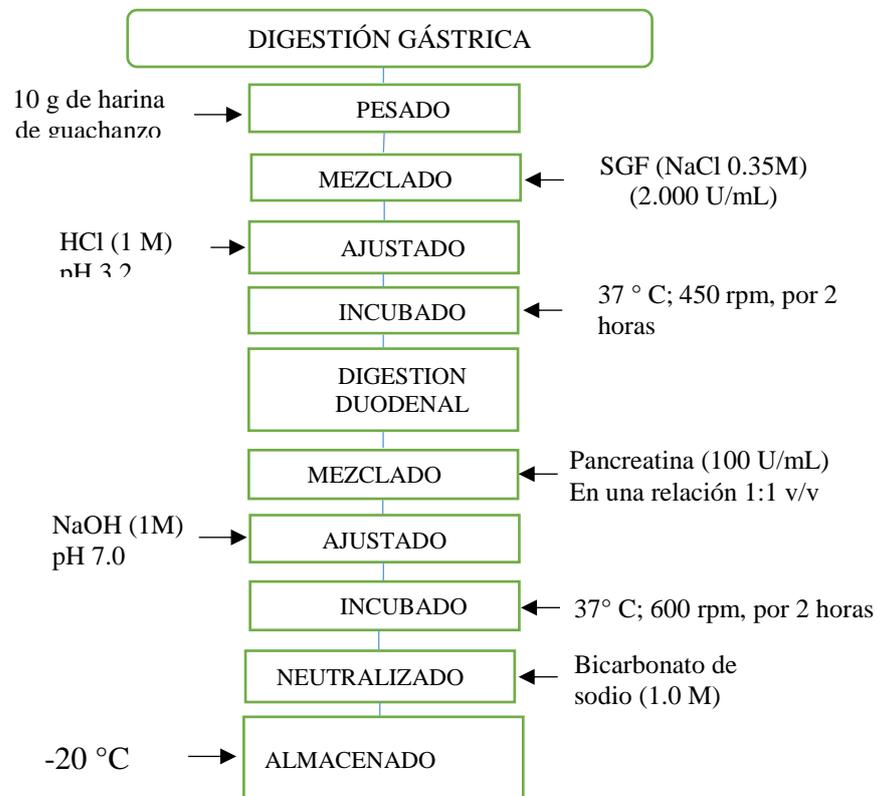
moleculares de la marca Bio Rad # 161-0317 el cual abarca la franja de pesos moleculares de 6 a 198 kDa, también se utilizó para algunos ensayos un estándar con franjas de colores.

La separación de las proteínas de guachanzo se realizó en una cámara de electroforesis vertical utilizando el equipo BIO-RAD Mini-protean Tetra System, con una solución de tampón de corrida (Tris-HCL, Glicina, SDS).

El volumen de la muestra que se adicionó en los pocillos para el análisis fue de 20 μ l, las corridas se llevaron a 200V continuos durante 30 minutos. Finalizada la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie brilliant blue R-250 durante toda la noche. Al día siguiente los geles fueron desteñidos con una solución formada por (50 % Metanol, 5% Ácido acético y 45% Agua). Una vez desteñidos se realiza un lavado con agua destilada y se procedió a realizar las fotografías de los geles con una cámara digital de 13 megapíxeles.

2.8 Digestión gástrica *in vitro*

Figura 7-2: Diagrama de flujo para la digestión gástrica de las proteínas de guachanzo



Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIOPROPEPTI (Ambato-2017).

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

2.8.1 *Digestión gástrica*

Para la digestión se pesó 10 mg/ml de la proteína de guachanzo aislada en tubos eppendorf de 2 mL, luego las muestras fueron sometidas a digestión gástrica simulada (SFG), formada por NaCl 0.35 M a los pHs de 1.2; 2.0; 3.2. La mezcla en relación 1:1 (2.000 U pepsina/mL de SGF). La digestión se realizó en un microincubador Esco, Provolcell Shaking a 37°C por 2 horas y 450 rpm, una vez completa la digestión se agregó 200 µl de bicarbonato de sodio 1 M para la inactivación de la enzima o parar la reacción.

Posteriormente se eleva la temperatura a 80°C a 450 rpm por un tiempo de 10 minutos para asegurarnos que la enzima se inactive completamente. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su respectivo análisis en electroforesis SDS-PAGE.

2.8.2 *Digestión duodenal*

Para el período de análisis duodenal se realizó la mezcla en una relación 1:1 v/v, 1 mL de hidrolizado de guachanzo de la fase gástrica con 1 mL de una solución formada por (100 U de pancreatina, 10 nM de sales biliares, 1.5 mM CaCl₂) y se ajustó a pH 7.0. La digestión se llevó a cabo en el microincubador Esco, Provolcell Shaking en las mismas condiciones de la digestión gástrica. De igual manera se almacenaron las muestras a -20°C hasta su análisis en electroforesis SDS-PAGE.

2.9 *Acción antioxidante del aislado proteico de guachanzo*

Se estudió la actividad antioxidante de la proteína aislada, mediante el método de ABTS⁺. Según la metodología desarrollada por Re et al. (1999). El radical ABTS⁺ se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final), y se llevó a temperatura ambiente 25°C y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS⁺ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 a 754 nm.

Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de la proteína liofilizada a pH 5.0 de guachanzo, se preparó mezclas de 1 mL de la solución diluida de ABTS⁺ con 7-8 mg de proteína de guachanzo se diluyo con etanol hasta que se producir una inhibición del 20%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 µL de la muestra, a 980 µL de la dilución del radical ABTS⁺ así generado se determinó la absorbancia 754 nm, y se procedió a añadir 20 µL de

la muestra y nuevamente se repitió la absorbancia 754 nm pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos.

2.10 Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron el rendimiento de la proteína extraída a diferentes tratamientos de extracción y a diferentes pHs 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; y además la cuantificación de la proteína mediante el método de BCA, Biuret, Dumas y ABTS. A los resultados se les empleo un análisis de varianza, utilizando INFOSTAT con el objetivo de determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para cada variable respuesta.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Extracción mecánica para obtención de la torta de guachanzo.

La torta se obtuvo mediante extracción mecánica, para lo cual las nueces de guachanzo fueron sometidas a secado y a un proceso de molienda. El rendimiento de la harina de guachanzo (torta) tuvo un porcentaje de 60,89%. Este rendimiento puede ser influenciado por diversos factores como variedad de la planta, condiciones del equipo de extracción, tipos de prensado, entre otros.

Según Hurtado, 2013, mediante la aplicación de prensado en frío para la obtención de la torta de sachá inchi obtuvo un rendimiento de la torta de 62,1%, resultado que mostró una alta obtención de subproducto. Por lo tanto, se puede hacer comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio y a la vez determinar que el método de extracción empleado fue el correcto para obtener la torta de guachanzo.

Este tipo de extracción permite conservar las características nutricionales y sensoriales de la torta, lo cual conduce a la necesidad de analizar su composición proximal y de esta manera proponer alternativas de aprovechamiento, evitando la acumulación de residuos sólidos.

3.2 Desengrasado de la harina de guachanzo

Se realizó el desengrasado de la harina de guachanzo a través de la extracción de la fracción lipídica con cloroformo, cuyo contenido de grasa encontrado en el material desengrasado fue de 3%. La harina presentó un color blanco con una granulometría de 0.1 – 0.25 mm. La harina de guachanzo fue desengrasada con la finalidad de eliminar el extracto de grasa y de esta manera prevenir que el residuo afecte a los análisis realizados como cuantificación y caracterización de la proteína, determinación del contenido de polifenoles, entre otros.

3.3 Rendimiento de la proteína de guachanzo

El aislado con extracción en frío a pH 6.0 presentó el alto porcentaje de rendimiento de 21.91%, seguido del pH 5.0 con 16.60 % y en bajo porcentaje los pH 3.0 y 4.0 con 8.49 y 14.08 % respectivamente. Según y es fundamental conocer su punto isoeléctrico, en el cual la proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto tiende a coalescer, lo que significa que el aislado a pH 6.0 podría encontrarse cerca del punto isoeléctrico, por su alto rendimiento de proteína de guachanzo (*Caryodendron orinosence karst*). Por otro lado, se puede establecer que existe si existe diferencia significativa en los rendimientos obtenidos a los diferentes pHs

Tabla 8-3: Rendimiento de proteína de guachanzo con extracción en frío

| PARÁMETRO | RENDIMIENTOS (%) | CV |
|-----------|------------------|------|
| pH 3.0 | 8.49± 0.27a | 0.03 |
| pH 4.0 | 14.08 ± 0.13b | 0.01 |
| pH 5.0 | 16.60± 0.35c | 0.02 |
| pH 6.0 | 21.91 ± 1.25d | 0.06 |

Realizado por: Grefa, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios ± desviación estándar(n=3)). Se ejecutó una ANOVA y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

Para el rendimiento de la extracción en calor la obtención de aislados y concentrados proteicos de la torta de guachanzo por precipitación isoeléctrica determinaron valores por debajo de la extracción en frío debido a que por la presencia de calor que es sometida la semilla existe una desnaturalización proteica y que además el calor solubiliza al aceite propiamente de la almendra el cual se absorbe en la fibra presente en la semilla. El rendimiento con extracción en calor a pH 5.0 fue la que mayor rendimiento con un 11.07 % y los pHs 4.0 y 6.0 un valor aproximado a 9.0 %, no existe diferencia significativa. Al igual que los pHs 5.0 y 6.0 no presentan diferencia significativa,

Estos resultados permiten ser comparados con los obtenidos por (Quinteros, 2013, p. 8). Este rendimiento de proteína aislada obtenida permite calificar a la torta de guachanzo como una fuente rica en proteína.

Tabla 9-3: Rendimiento de proteína de guachanzo con extracción en calor

| PARÁMETRO | RENDIMIENTOS (%) | CV |
|-----------|------------------|------|
| pH 3.0 | 6.98± 0.51a | 0.07 |
| pH 4.0 | 9.33 ± 0.40b | 0.04 |
| pH 5.0 | 11.07± 0.45c | 0.04 |
| pH 6.0 | 9.76± 0.63 b,c | 0.06 |

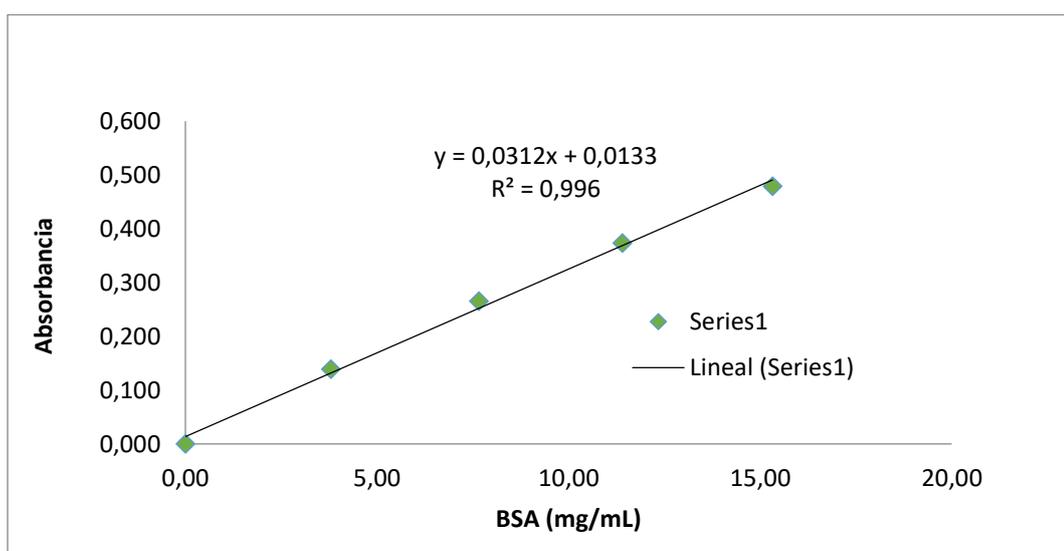
Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios ± desviación estándar(n=3). Se ejecutó una ANOVA y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

3.4 Cuantificación proteica

Una vez aislada la proteína se cuantifico el contenido de proteína presente a los pHs 3.0; 4.0; 5.0; 6.0 mediante el método colorimétrico de Biuret y el método ácido bicinconínico (BCA), en la **Figura 8-3**, se visualiza la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA), La que es utilizada para el cálculo de la concentración de proteína de guachanzo para ambos métodos.

Figura 8-3: Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)



Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales BIOPROPEPTI (Ambato-2017)

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

En la figura 8-3, se observa una correlación (R^2) de 0.996 que denota una correlación superior al 99%, mostrando una dependencia directamente proporcional entre el color y las concentraciones seleccionadas de pepsina dando como resultado la ecuación de la recta $y=0.031x + 0.013$. El ensayo de cuantificación proteica de guachanzo se realizó por triplicado.

3.4.1 Método Biuret

Tabla 10-3: Porcentaje de proteína de guachanzo

| PARÁMETRO | CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (%) | C.V |
|-----------|-------------------------------|--------|
| pH 3.0 | 31.26 ± 10.36a | 0.3317 |
| pH 4.0 | 39.82 ± 25.72a | 0.6460 |
| pH 5.0 | 42.03 ± 26.70a | 0.6353 |
| pH 6.0 | 55.39 ± 13.35a | 0.2411 |

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios ± desviación estándar (n=3)). Se ejecutó una ANOVA y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteína de los aislados y concentrados proteicos de guachanzo mediante el ensayo de Biuret se muestran en la **Tabla 10-3**, donde a pH 6.0 se obtuvo el mayor porcentaje de proteína de 55.39%. Sin embargo, a pH 5.0 se obtuvo un porcentaje alto de 42.03%, mientras que a pH 4.0 se determinó 39.82% y a pH 3.0 31.26% de contenido proteico. Mediante la comparación de medias por prueba de test de Tukey al 95% de confianza, se observa que entre las muestras analizadas no existe diferencia significativa en la concentración de proteína.

Según (Cambell, y otros, 2006) la presencia de compuestos formados por moléculas de dos o más enlaces peptídicos como los tripéptidos en adelante, están determinados por la alta concentración de proteína. La reacción se define como específica en la deducción de la inexistencia de azúcares. En este caso al ser positiva permite deducir que en los aislado y concentrados proteico de guachanzo no posee este tipo de componentes.

3.4.2 Método BCA

Tabla 11-3: Porcentaje de concentración de proteína de guachanzo

| PARÁMETRO | CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (%) | C.V |
|-----------|-------------------------------|--------|
| pH 3.0 | 37.54 ± 4.52b | 0.1203 |
| pH 4.0 | 36.33 ± 1.26b | 0.0346 |
| pH 5.0 | 50.65 ± 2.82a | 0.0557 |
| pH 6.0 | 49.65 ± 4.00a | 0.0806 |

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios ± desviación estándar (n=3). Se ejecutó una ANOVA y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en una misma columna indican diferencias significativas

En la **Tabla 11-3**, se puede observar la concentración de proteína determinada en cada uno de los aislados de guachanzo a diferentes pHs. A pH 5.0 se obtuvo un mayor porcentaje de contenido de proteína 50.65%, seguido del pH 6.0 con 49.65% sin mostrar diferencia significativa en los resultados. En las muestras de proteína aisladas a pH 3.0 y pH 4.0 el porcentaje de proteína varía de 36 a 38% aproximadamente. Estudios realizados por *acerca de la cuantificación de proteína en la torta de Chía por el método BCA* determinaron que el porcentaje proteico varía de 30 – 60%, lo cual permite comparar con otra matriz biológica.

García y Vázquez (1998) determinaron que la formación del color púrpura en las muestras analizadas por el método BCA se debe a la reacción específica para el ion Cu^+ , además reportaron que el reactivo BCA trabaja sobre cuatro aminoácidos específicos (cistina, triptófano, cisteína, y tirosina) siendo los responsables de la formación del compuesto púrpura en las muestras proteicas ensayadas con BCA. Los resultados obtenidos acerca de la concentración proteica permiten deducir que la proteína de guachanzo no posee un contenido alto de los aminoácidos ya mencionados.

Por otro lado, los métodos empleados para cuantificar la proteína de guachanzo ayudaron a definir si las muestras son concentrados o aislados proteicos, en este caso todas las muestras analizadas corresponden a ser concentrados proteicos. Según el Codex Alimentarios, 2007, determinó a un aislado proteico es aquel que posee un contenido de proteína mayor a 90% y a un concentrado aquel que tiene entre el 65 a 90% de contenido proteico. Por otro lado Urraca, 2010, en su estudio

menciona que un concentrado proteínico es determinado si posee un contenido de proteína de 35 a 80%.

Estos resultados alcanzados en la cuantificación de la proteína de guachanzo tanto por el método Biuret y BCA podría deberse a la interferencia de moléculas de grasa o ácidos nucleicos que se encuentran interfiriendo en la muestra al momento de medir su absorbancia. Según los ácidos nucleicos que se encuentran asociadas a la proteína de guachanzo son la guanina que producen 50% más de color. Además, afirman que los frutos secos y semillas de oleaginosas contienen altos niveles de ácidos nucleicos permitiendo determinar cómo excelentes fuentes de energía.

Sin embargo, siendo métodos distintos cuya diferencia radica en la reacción de cada reactivo frente a la molécula de proteína se puede definir similitud en los valores de concentración obtenidos por cada método.

3.4.3 Método DUMAS

En este método se calcina 3 g de muestra a una temperatura entre 850 – 1400 °C en presencia de oxígeno; los productos de la combustión son adsorbidos selectivamente en columnas, y los óxidos de nitrógeno se reducen catalíticamente en presencia de cobre a gas nitrógeno, cuantificándolo en un detector de conductividad térmica. El equipo se calibra con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los resultados de proteína bruta, se encuentran expresados en la **Tabla 12-3**, El cual se calcula a partir de los datos obtenidos de nitrógeno. Dando como mayor rendimiento de proteína en el pH 5.0 con un 48.32% seguido de pH 6.0 con 47.79% y con menor porcentaje de rendimiento los pHs 3.0 y 4.0 con 35.05%, 37.42% respectivamente.

Tabla 12-3: Porcentaje de proteínas método DUMAS

| MÉTODO | pH 3.0 | pH 4.0 | pH 5.0 | pH 6.0 |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| DUMAS | 35.05 ± 0.21 ^a | 37.41 ± 0.11 ^a | 48.32 ± 0.22 ^a | 47.79 ± 0.01 ^a |

Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios ± desviación estándar (n=3)). Se ejecutó una ANOVA y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

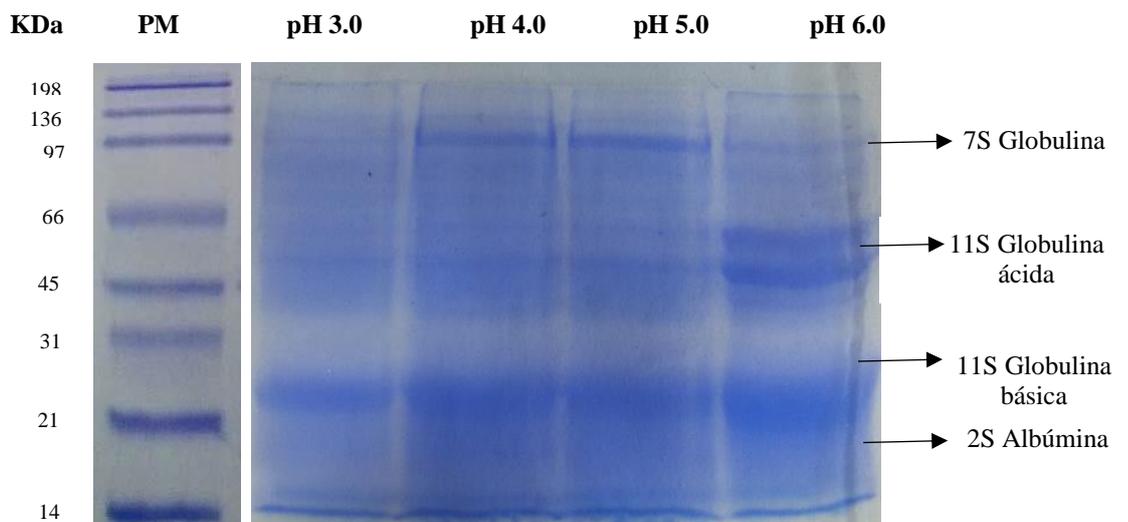
Según Sandoval 2016 dice que el método Dumas al ser en un equipo automatizado, permite realizar las fases del ciclo analítico: purga, combustión y análisis. Mediante el método Dumas se puede determinar los nitritos presentes en la muestra analizada, el contenido de nitrógeno que se obtiene es considerado como proteína bruta, posee mejor precisión y sin manipulación de ácidos y bases concentrados, especialmente catalizadores a base de mercurio.

3.5 Electroforesis SDS-PAGE

Los concentrados proteicos de guachanzo obtenidos a diferentes pHs se analizaron mediante la aplicación de la técnica de electroforesis tradicional (1D) considerada también en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y 2-β-mercaptoetanol. En la **Figura 9-3** se puede visualizar la presencia de bandas proteicas diferentes en el gel.

Estas bandas ayudaron a determinar la existencia de proteínas solubles en la muestra, las mismas que se caracterizan por poseer polipéptidos de peso molecular entre 14-97 kDa aproximadamente. La banda proteica con peso molecular de 23 kDa presenta una alta expresión y se observa que está presente en todos los pHs ensayados.

Figura 9-3: Técnica electroforética SDS-PAGE con 2-β-mercaptoetanol de la proteína de guachanzo aislada a diferentes pHs.



Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

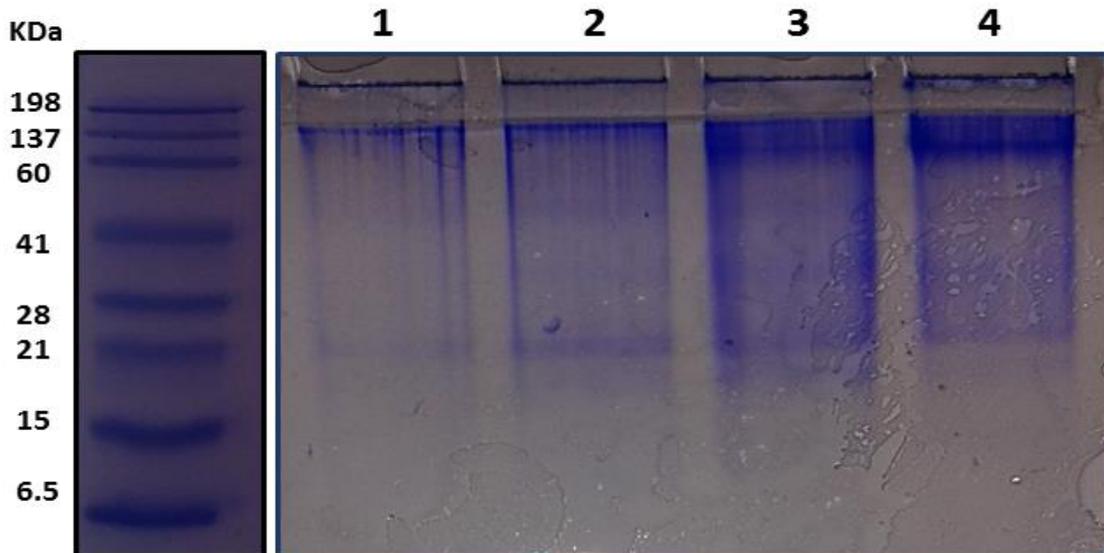
Estudios realizados sobre aislados de sachu inchi obtenidos a partir de la torta han determinado una cantidad importante de globulinas y albúminas se caracterizan por su solubilidad. Varios autores coinciden que estas cadenas polipeptídicas poseen una masa molecular entre 14 a 70 kDa. Estos resultados obtenidos bibliográficamente permiten ser comparados con los encontrados en el presente estudio.

según (Padilla, Alfaro y Alvarez, 2016, p. 4) A través de la aplicación de electroforesis SDS-PAGE encontraron que las proteínas de guachanzo (*Caryodendron orinocense* Karst.) con mayor predominancia están compuestas de polipéptidos cuyo peso molecular están en un rango de 20 a 36 kDa, lo cual permite establecer similitud con la banda proteica encontrada en el presente estudio cuyo peso molecular es de 23 kDa.

Con lo que respecta al tipo de proteínas encontradas se puede observar la presencia de 11S globulinas básicas con mayor expresión en todas las muestras analizadas las mismas que corresponde a un peso molecular de 23 kDa. Además, existe la presencia de 7S globulinas con un peso molecular de 97 kDa aproximadamente, 11S globulinas ácidas con polipéptidos comprendidos con un peso molecular de 47 kDa y 2S albúminas con un peso molecular aproximado de 14 kDa. Sin embargo, estas fracciones proteicas mencionadas no se encuentran en gran cantidad en la muestra debido a que no presentan alta expresión en el gel.

Determinaron que las proteínas vegetales no leguminosas y de leguminosas poseen dos tipos de proteínas de reserva, a las que llamaron 7S y 11S globulinas dependiendo del coeficiente de sedimentación. La fracción 11S globulina generalmente presenta una fracción ácida con un peso molecular de 29-35 kDa y una fracción básica de 18-28 kDa. Por otra parte, las 7S globulinas poseen pesos moleculares entre 150 hasta 200 kDa perteneciendo al grupo de las glicoproteínas, hay que considerar que estos pesos moleculares varían dependiendo del tipo de planta estudiada.

Figura 10-3: Análisis de proteínas de guachanzo usando electroforesis NATIVE-PAGE.

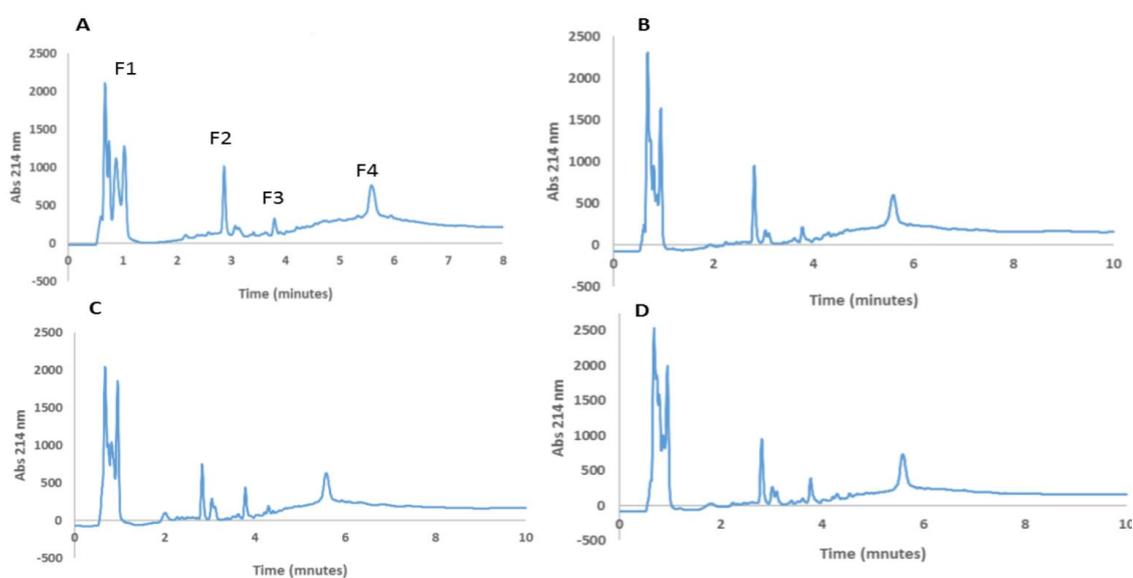


Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

En la electroforesis NATIVE-PAGE de la **Figura 10-3**, Línea 1: aislado de guachanzo a pH 3.0, línea 2: aislado de guachanzo a pH 4.0, línea 3: aislado de guachanzo a pH 5.0 y línea 4: aislado de guachanzo a pH 6.0. En ella se pueden ver la estructura nativa de las proteínas (con ausencia de 2- β -mercaptoetanol), donde se ocupó 5mg/mL de concentrado de guachanzo a sus diferentes pHs de precipitación, donde se observa unas bandas cercanas a 140 kDa, 70 kDa, 21 kDa y con menor intensidad en 19 kDa; al pH 3.0 y pH 4,0 se visualiza las bandas con mayor intensidad en relación a los diferentes pHs analizados con 2- β -mercaptoetanol.

3.6 Análisis de proteínas de guachanzo usando RP-UHPLC

Figura. 11-3: Análisis de proteínas de guachanzo usando RP-UHPLC



Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

A) Aislado de guachanzo obtenido a pH 3.0, B) Aislado de guachanzo obtenido a pH 4.0, C) Aislado de guachanzo obtenido a pH 5.0 y D) Aislado de guachanzo a pH 6.0.

Los concentrados de guachanzo fueron analizados mediante RP-UHPLC con una absorbancia de 214 nm observándose que todos los concentrados en los pHs 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, presentan 4 fracciones (picos) mayoritarios. El perfil cromatográfico fue igual para las 4 muestras, lo cual nos confirma que si se aislaron las mismas proteínas. Probablemente sean isoformas con igual peso molecular y diferente punto isoeléctrico. Cabe recalcar que todas las fracciones tienen los mismos tiempos de retención.

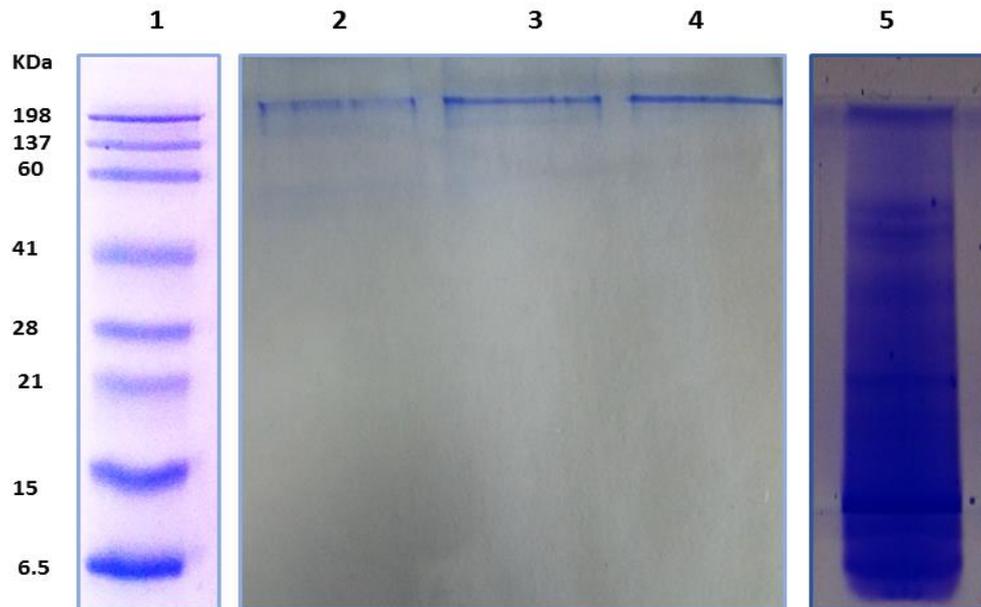
3.7 Digestión gástrica *in vitro*

3.7.1 Digestión gástrica

Las proteínas extraídas de la torta de guachanzo a pH 6.0 y con extracción en frío, fueron sometidas a digestión *in vitro* donde se simuló las condiciones fisiológicas humanas considerando la enzima, temperatura, movimientos peristálticos, sales biliares, etc. Para lo cual las muestras fueron expuestas a una fase que simuló el proceso de digestión gástrica con pepsina (2.000U/mg)

manteniéndolas en incubación y agitación durante 120 minutos a 37 °C a diferentes pHs (1.2, 2.0 y 3.2). Las muestras de la digestión gástricas demostraron que las proteínas de guachanzo fueron susceptibles al proceso de hidrólisis simulada. (Figura 12-3).

Figura 12-3: Electroforesis SDS-PAGE de Digeridos gástricos de proteínas de guachanzo e hidrolizados con pepsina (2.000 U/mg), en presencia de 2-β-Mercaptoetanol



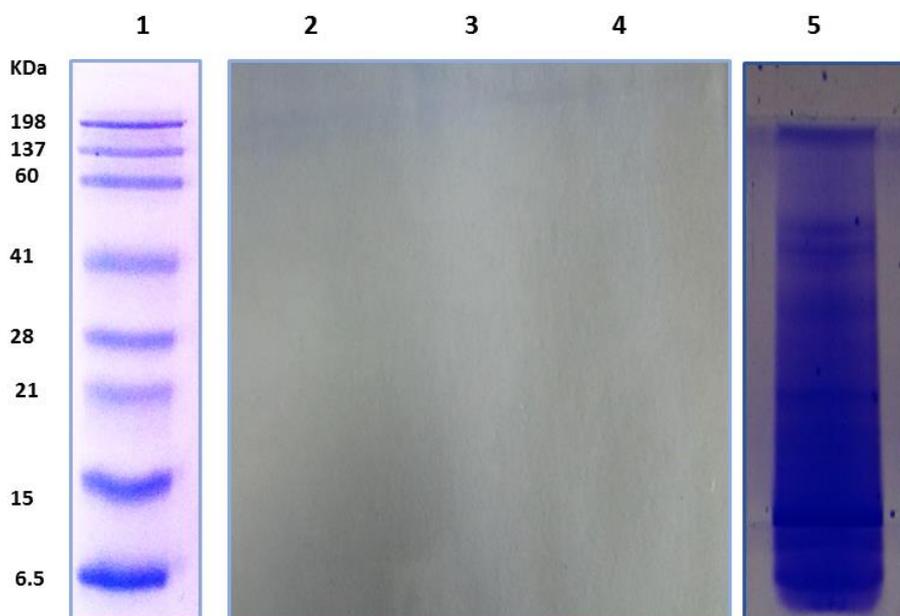
Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

Línea 1: estándar de pesos moleculares, línea 2: hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 1.2, línea 3: hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 2.0, línea 4: hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 3.2 y línea 5: aislado de guachanzo de pH 4.0 sin hidrolizar (control).

En el estudio realizado por se determinó un grado de digestibilidad mayor al 75% de la proteína de guachanzo, proporcionando una ventaja a esta harina analizada con relación a la de *Lupinus mutabilis* y *Canavalia ensiformis* que poseen un grado de digestibilidad muy bajo (<50%).

3.7.2 Digestibilidad duodenal

Figura 13-3: Análisis de proteínas de guachanzo hidrolizadas con pancreatina usando electroforesis SDS-PAGE.



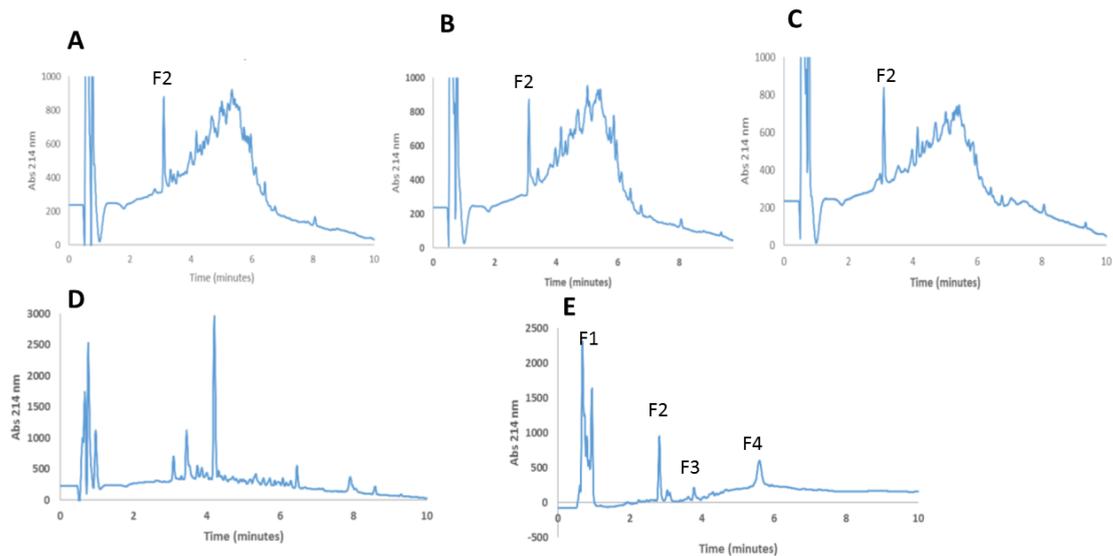
Realizado por: Grefa, Jorge, 2017

En la Línea 1: estándar de pesos moleculares, línea 2: hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 1.2, línea 3: hidrolizado gástrico de guachanzo pH 2.0, línea 4: hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 3.2 y línea 5: aislado de guachanzo de pH 4.0 sin hidrolizar (control).

Por otra parte Cárdenas 2016, la digestibilidad de esta proteína puede ser comparada con la de chíá puesto en su estudio determinó que fracciones proteicas como las 7S y 11S globulinas y albúminas presentes en sus muestras fueron digeridas completamente bajo las condiciones simuladas de digestión gástrica y duodenal *in vitro*.

3.8 Análisis de proteínas hidrolizadas de guachanzo usando RP-UHPLC

Figura 14-3: Análisis de proteínas hidrolizadas de guachanzo



Realizado por: GREFA, Jorge, 2017

A) Hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 1.2, B) Hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 2.0, C) Hidrolizado gástrico de guachanzo a pH 3.2, D) Hidrolizado duodenal de guachanzo a pH 7.0 y D) Aislado de guachanzo de pH 4.0 sin hidrolizar (Control).

3.9 Actividad antioxidante del aislado proteico

Según Cárdenas 2016 en su estudio sobre capacidad antioxidante de concentrado de chía se puede determinar que es un potente antioxidante ya que los valores obtenidos son comparables a la del patrón (BHT) empleado en la experimentación. Aunque el estudio denota que el BHT tiene una mayor capacidad para inhibir los procesos oxidativos es evidente que el concentrado de chía es una buena opción para remplazarlo ya que no existe gran diferencia entre el porcentaje de inhibición entre estos dos.

El BHT tiene su mayor porcentaje de inhibición (97.43%) a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el concentrado de chía tiene su mayor porcentaje de inhibición (95.98%) en el pH 6.0 a la concentración más baja 100 $\mu\text{g/ml}$. Este resultado sugiere que el aislado proteico de chía tiene una actividad antioxidante comparable con la actividad antioxidante de una marca comercial.

La determinación de la actividad antioxidante del aislado proteico fue realizado en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, se utilizó el método MO-LSAIA-15. Se obtuvieron los siguientes resultados en los diferentes métodos de extracción en frío y calor a pH 6.0 se obtuvo 56.18 μ MTrolox/g y a pH 5.0, 52.06 μ MTrolox/g respectivamente.

3.10 Determinación de fenoles totales (FT)

La determinación de fenoles totales (FT) se fundamenta en la oxidación del reactivo Folin y Ciocalteu, el cual está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Esta reacción es característica para compuestos que tienen un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno. El reactivo Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que en presencia de fenol se torna azul. La intensidad de color azul se mide espectrofotométricamente a 765 nm. Los resultados se expresan como equivalente de ácido gálico (AG).

En la **Tabla 13-3**, se registra los porcentajes de fenoles encontrados en cada una de las muestras de proteína aisladas a diferentes pHs. Se determinó que a pH 6.0 existe mayor contenido fenólico con 1028.58 mg GAE/100g de muestra, mientras que a pH 3.0 se observa menor contenido de compuestos fenólicos (644.34 mg GAE/100g de muestra). Mediante la comparación de medias por prueba de test de Tukey al 95% de confianza, se observa diferencia significativa entre las muestras en relación al contenido fenólico. Además, se puede observar que a mayor pH de precipitación de la proteína aumenta el contenido de fenoles totales en la muestra.

Tabla 13-3: Determinación de los fenoles totales de la proteína de guachanzo

| MUESTRAS | FENOLES (MG GAE/100G MUESTRA) | C.V |
|----------|-----------------------------------|-------------|
| pH 3.0 | 644.34 \pm 0.00 ^d | 0.000940436 |
| pH 4.0 | 856.56 \pm 0.00 ^c | 0.000335003 |
| pH 5.0 | 962.49 \pm 0.0003 ^b | 0 |
| pH 6.0 | 1028.58 \pm 0.0009 ^a | 0 |

Realizado por: Grefa, Jorge, 2017

Los datos obtenidos son los promedios \pm desviación estándar (n=3)). Se ejecutó una ANOVA

y comparación de medias por la prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas.

Establecen los compuestos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y por lo menos un sustituyente hidroxilo. La harina de guachanzo, se encuentra con un nivel alto de contenido fenólico. Según , determinaron el contenido de FT en varias frutas donde la mora y uva son las que mayor contenido fenólico poseen. Sin embargo, los resultados hallados en este estudio determinan que el sobrenadante obtenido tras la precipitación de la proteína corresponde a ser una excelente fuente de fenoles.

CONCLUSIONES

- ❖ Se aisló las proteínas de guachanzo (*Caryodendron orinocense karst*) mediante precipitación isoelectrica a los pHs 3.0; 4.0; 5.0; 6.0. Obteniéndose como resultado la precipitación de la proteína en diferentes porcentajes.
- ❖ Se pudo comprobar el rendimiento de la proteína frente a la forma de extracción, obteniendo resultados que varía de 16 a 22% aproximadamente para la extracción en frio y cerca 7 a 12 % para la extracción en calor.
- ❖ En este estudio se caracterizó las proteínas de la torta de guachanzo (*Caryodendron orinocense karst*). Mediante la aplicación de la técnica electroforética SDS-PAGE se pudo identificar el perfil de proteínas de la muestra donde se observó la presencia de 11S globulinas básicas con un peso molecular de 23 kDa, una fracción 11S globulinas ácidas con 47 kDa y 7S globulinas con un peso molecular de 97 kDa aproximadamente. La banda proteica correspondiente a las 2S albúminas no tiene mucha expresión.
- ❖ Se analizó la actividad antioxidante de las proteínas y polifenoles. En lo que respecta a la actividad antioxidante tuvo como resultado 56.18 uMTrolox/g a pH 6.0 con método de extracción en frio y 52.06 uMTrolox/g a pH 5.0 con método de extracción en calor. En el caso de los polifenoles se determinó que a pH 6.0 existe un mayor contenido dando como resultado 1028.58 mg GAE/100g de polifenoles.
- ❖ Se estudió la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de las proteínas aisladas de la torta de guachanzo, cuyos resultados determinaron la susceptibilidad de las proteínas al proceso hidrolítico y a las condiciones fisiológicas simuladas. Es decir, las proteínas de guachanzo son totalmente digeribles.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el pH de solubilización, puesto que en esta investigación la proteína de guachanzo fue solubilizada a pH 8.0 pudiendo de esta manera determinar el pH óptimo de solubilización de las proteínas.
- Se recomienda realizar el fraccionamiento de las proteínas de guachanzo para poder conocer el tipo de proteína que en mayor contenido se encuentra.
- Se recomienda realizar un previo lavado del aislado de proteína y sobrenadante así evitar interferencia de resultados.
- Llevar a cabo estudios de los digeridos gástricos para conocer las propiedades biológicas que poseen los péptidos que han sido liberados durante este proceso.
- Se recomienda ampliar el estudio con la realización de ensayos de digestibilidad y actividad antioxidante en modelos *in vivo* para de esta manera sustentar los resultados obtenidos en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ALFARO, Maria, PADILLA, Fanny. Caryodendron Orinocense Oil, tocopherol content and use in cosmetics. Venezuela. Central University of Venezuela, 1998. p. 1-12

BRADOVÁ, Jana. y MATĚJOVÁ, Eva, Comparison of the Results of SDS PAGE and Chip Electrophoresis of Wheat Storage Proteins. *Chromatographia* [en línea], vol. 67, no. S1, 2008. p. 84. ISSN 0009-5893. DOI 10.1365/s10337-008-0545-2. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-008-0545-2>.

BRANDAN, Nora, et al. Proteínas Plasmáticas, 2008. p. 1-5.

CARDENAS, Marjorie. *Obtencion de aislados proteicos de chia (Salvia hispanica L.) y evaluacion in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante.* 2016. [en línea]. S.l.: s.n. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/23819/1/AL606.pdf>.

CISNEROS, Diana. y DIAZ, Andrea,. *OBTENCIÓN DE ACEITE DE LA NUEZ Caryodendron orinocense.* 2006. S.l.: s.n. p. 22-23

CODEX ALIMENTARIUS,. *Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales.* 2007 [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 9789253058426. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1392s/a1392s00.pdf>.

COLORADO, Martha, et al.,. Antioxidantes : perspectiva actual para la salud humana Antioxidants : present perspective for the human health. *Chil Nutr Vol. Chil Nutr* [en línea], vol. 42, no. 7, 2015. p. 206-212. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>.

FAO, *Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos.* Manaus, Brazil: s.n. ISBN

9253023724. 1987. pp. 67-265

FERNANDES, Emilio, y GALVAN, Aurora. Métodos para la cuantificación de proteínas. [en línea], 2006 pp. 1-7. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27>
MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.pdf.

GARCIA, H. y VAZQUEZ, R., Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bitacora* [en línea], vol. 3, 1998. pp. 77-88. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/bitacora.pdf.

GARCÍA, J., MORATINOS, H. y PERDOMO, D., Evaluación de dos métodos de propagación asexual en inchi (*Caryodendron orinocense karsten*). *Revista Científica UDO Agrícola*, vol. 9, no. 4, 2009. pp. 782-792. ISSN 13179152.

GARNICA, Paola y RAMIREZ, Oscar., *Evaluación de la factibilidad técnica y económica de la producción de aceite de inchi* [en línea]. S.l.: UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 2009. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6480/2/130395.pdf>.

GARNICA, Sandy. y RAMIREZ, Oscar., *Evaluación de la factibilidad técnica y económica de la producción de aceite de inchi*. 2009. S.l.: UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER.

GRAJALES, Muñis, *Apuntes de Bioquímica Vegetal-bases para su aplicación.pdf*. Primera. Mexico: s.n. ISBN 970-32-2356-7. 2005. pp. 39-41

JIMENEZ, Rodrigo. et al. Susceptibility of lysozyme to in vitro digestion and immunoreactivity of the digests. *Food Chemistry*, 2011. pp. 5-6.

LEÓN, Silvia., *Caracterización de las Proteínas de Tocte (*Juglans neotropica Diels*) y su Digestibilidad Gastrointestinal in vitro*. Ambato: Journal of Chemical Information and

Modeling. 2013. pp. 2-10

MELOROSE, J., PERROY, R. y CAREAS, S. Proteína de calidad nutricional. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* [en línea]. [Consulta: 21 julio 2016]. Disponible en: https://www.academia.edu/9293564/Proteína_de_calidad_nutricional.

MURRAY, Roberto., et al. *HARPER Bioquímica ilustrada*. 28. China: Mc Graw Hill. 2010. pp. 345-349

NIELSEN, Suzanne., *Food analysis*. Fourth Edi. USA, 2013 s.n. ISBN 9788578110796.

PADILLA, Fanny., ALFARO, Maria. y ALVAREZ, Irama., Antinutritional factors and amino acid of partially defatted flour of *Caryodendron orinosense* k. nuts. *Revista Facultad de Farmacia.*, vol. 67, 2016 .pp. 1-12.

PÉREZ, Hilda. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag*, vol. 1, no. 2, 2000. pp. 31-41.

QUINTEROS, Maria. Estudio de la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la torta de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*)». *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, 2013. pp. 1689-1699. ISSN 1098-6596. DOI 10.1017/CBO9781107415324.004.

QUINTEROS, Maria., *Estudio de la digestibilidad gastrointestinal, citotoxicidad y actividad antiinflamatoria de proteínas extraídas de la trta de sachá inchi(Plukenetia volubilis L.)*. S.l.: s.n. pp 2015.

RAMIREZ, Rosalva. y ECHEVERRI, Fernando., ¿son seguros y efectivos los antioxidantes? *Scientia et Technica Año XIII*, vol. 33, no. 332007, pp. 41-44.

SANDOVAL, Estefany., Determinacion de la actividad antioxidante en Polifenoles y Digestibilidad gastrointestinal in vitro en proteinas de la cascara de unguiragua (*Oenocarpus bataua*). S.l.: Universidad Técnica de Ambato. 2016. pp. 23-24

SCIENTIFICA, V. DUMAS Method. [en línea]. ITALI2013: Disponible en: www.velp.com.

SCIENTIFICA, V. Dumas Nitrogen Analyzer. , pp. 1-2.

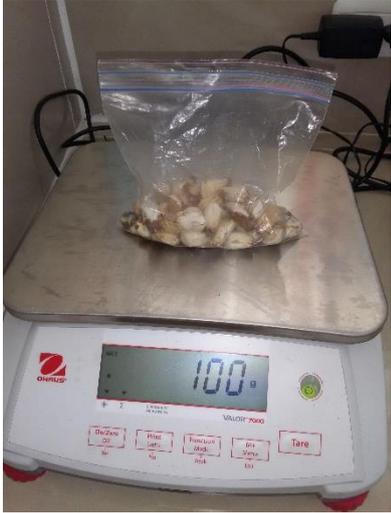
SENPLADES., *Plan Nacional Buen Vivir.pdf* [en línea]. 2013. S.l.: s.n. ISBN 978-9942-07-448-5 2013. Disponible en: www.planificacion.gob.ec/nseemplades@seemplades.gob.ec/www.buenvivir.gob.ec/www.buenvivir.gob.ec.

SERPA, Angelica., HINCAPIE, Gustavo. y ALVARES, Catalina., Determination of the isoelectric point of four leaf sources: cassava (*Manihot esculenta Crantz*) veronica and tai varieties, jatropha (*Jatropha curcas L.*) and gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect* [en línea], vol. 12, no. 1, 2014. pp. 30. ISSN 22161368. DOI 10.15665/rp.v12i1.148. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169282612014000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

TORRES, Vanesa. Revista de Actualización Clínica [en línea], vol. 41, 2014, pp. 2137-2138. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v41/v41_a03.pdf.

ANEXOS

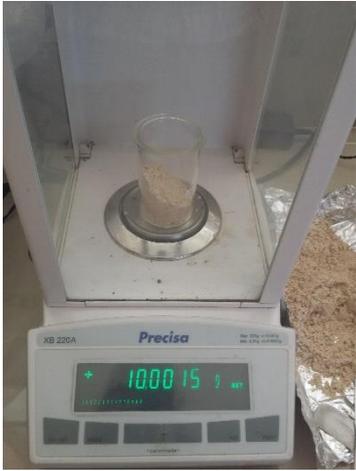
Anexo A. Pesaje y molienda de las nueces de guachanzo

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Pesaje de 100 g de Muestras de nuez de guachanzo</p> | <p>Molienda de las nueces de guachanzo y obtención de la torta.</p> |

Anexo B. Desengrasado y evaporación del cloroformo de la torta de guachanzo

| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| <p>Desengrasado con agitación constante</p> | <p>Filtrado de cloroformo Y obtención de la torta desengrasada</p> | <p>Evaporación del cloroformo y secado de la torta</p> |

Anexo C. Precipitación isoelectrica

| | | |
|---|--|---|
|  |  | |
| <p>Pesaje de 10 g de torta e hidrolisis básica a pH 8</p> | | |
|  |  |  |
| <p>Hidrolisis acida a pHs 3.0, 4.0, 5.0, 6.0</p> | <p>Separación de precipitado, sobrenadante y congelado a -84°C</p> | <p>Liofilización</p> |

Anexo D. Método BCA



Preparación de las muestras método BCA



Espectrofotómetro Marca Thermo Scientific

Anexo E. Método DUMAS

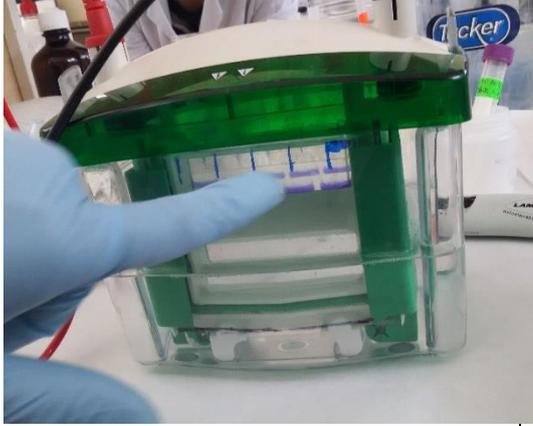
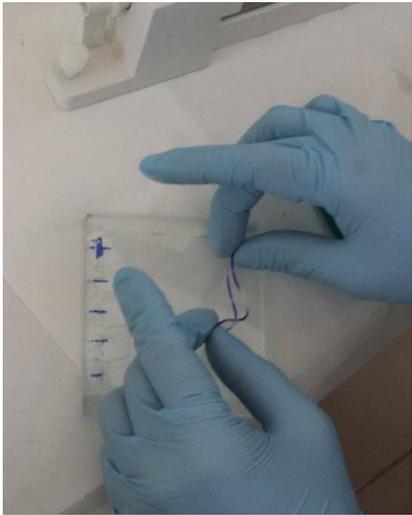


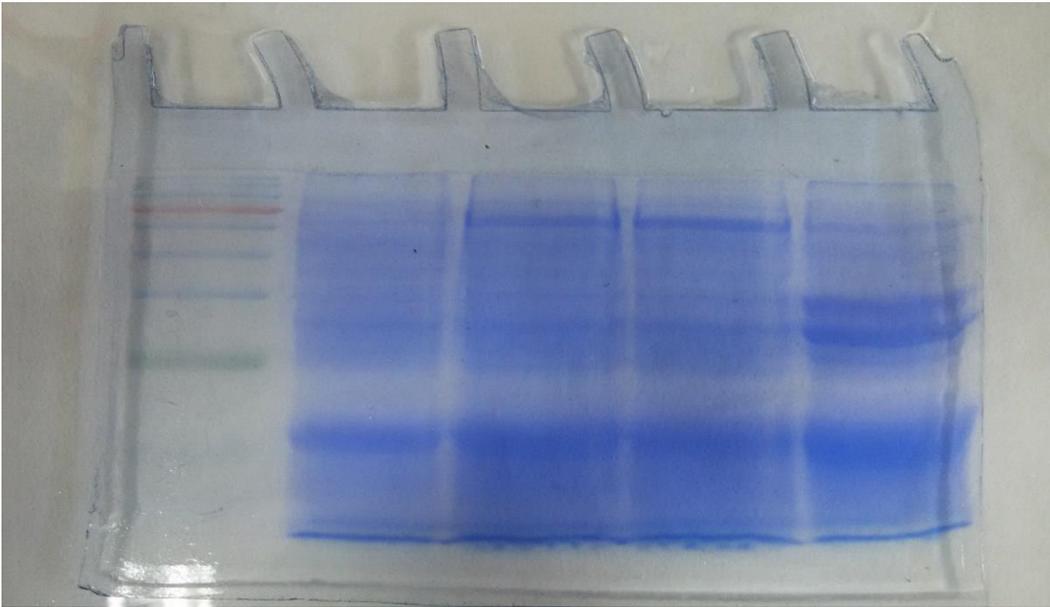
Preparación de la muestra método DUMAS



Equipo DUMAS Marca Velp
SCIENTIFICA

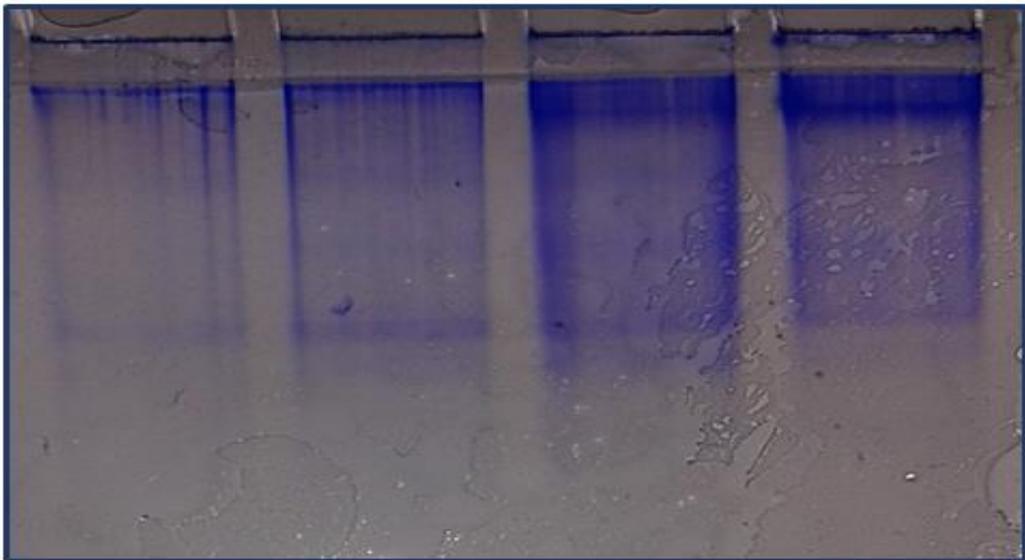
Anexo F. Electroforesis

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Colocación de las muestras en los pocillos</p> | <p>Electroforesis a 200 V, corrida de las muestras.</p> |
|  |  |
| <p>Desmontada de la gel de poliacrilamida</p> | <p>Tinción con Coomassie brilliant blue R-250</p> |



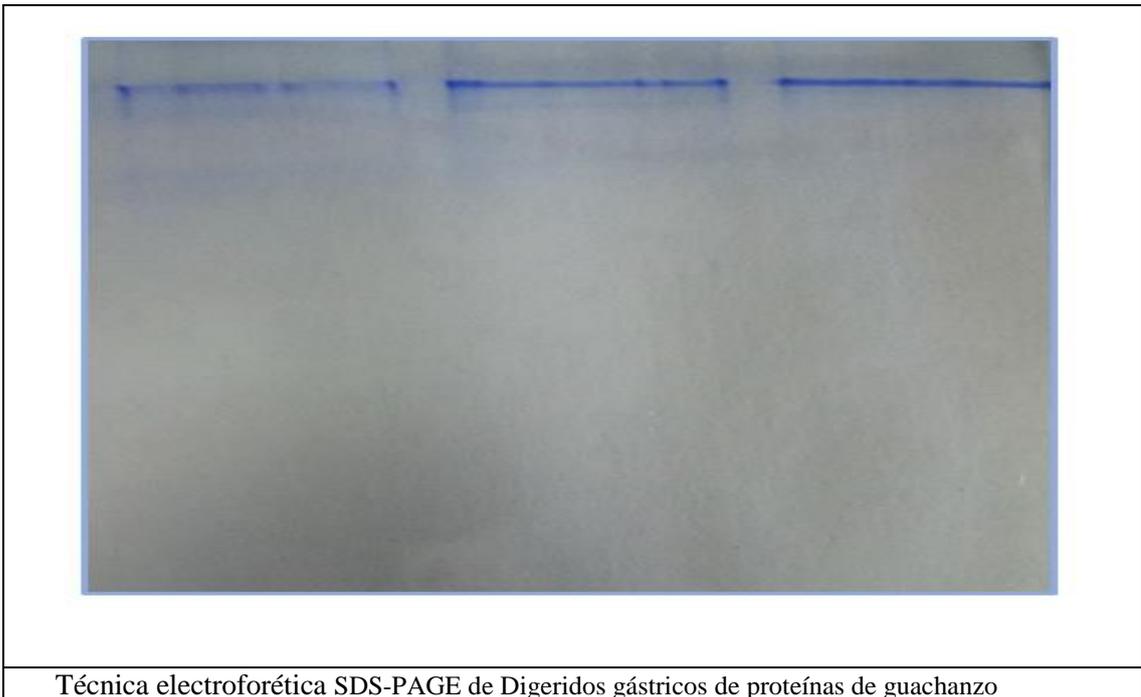
Técnica electroforética SDS-PAGE con 2- β -mercaptoetanol de la proteína de guachanzo aislada a diferentes pHs.

Anexo G. Electroforesis NATIVE-PAGE.

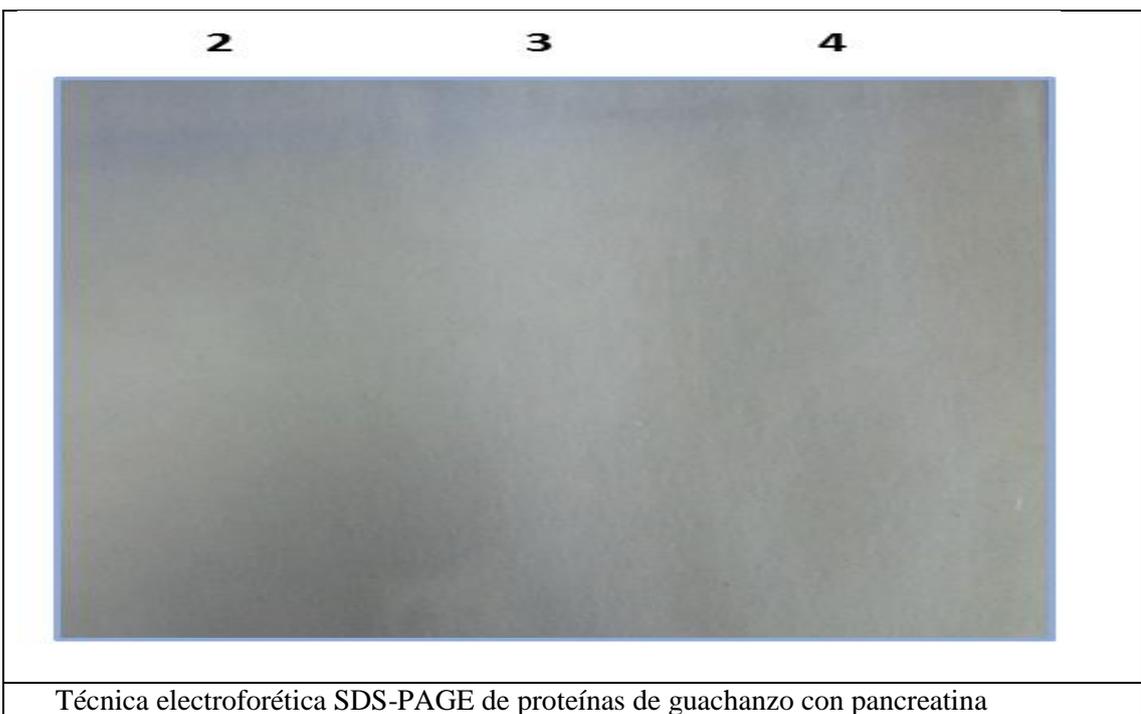


Técnica Electroforética NATIVE-PAGE sin 2- β -mercaptoetanol

Anexo H. Electroforesis SDS-PAGE de Digeridos gástricos de proteínas de guachanzo e hidrolizados con pepsina (2.000 U/mg)



Anexo I. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de guachanzo hidrolizadas con pancreatina



Anexo J. Análisis de varianza Método Biuret

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|---|----------------|-------------------|-------|
| Conc. Proteína (%) | 8 | 0,91 | 0,78 | 19,91 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------|---------|----|---------|-------|---------|
| Modelo. | 2048,03 | 4 | 512,01 | 7,28 | 0,0674 |
| Réplicas | 1449,37 | 1 | 1449,37 | 20,61 | 0,0200 |
| pH | 598,66 | 3 | 199,55 | 2,84 | 0,2072 |
| Error | 210,97 | 3 | 70,32 | | |
| Total | 2259,01 | 7 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=40,46789

Error: 70,3244 gl: 3

| pH | Medias | n | E.E. |
|-----|--------|---|--------|
| 6,0 | 55,39 | 2 | 5,93 A |
| 5,0 | 42,03 | 2 | 5,93 A |
| 4,0 | 39,82 | 2 | 5,93 A |
| 3,0 | 31,26 | 2 | 5,93 A |

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

Análisis de varianza programa INFOSTAT

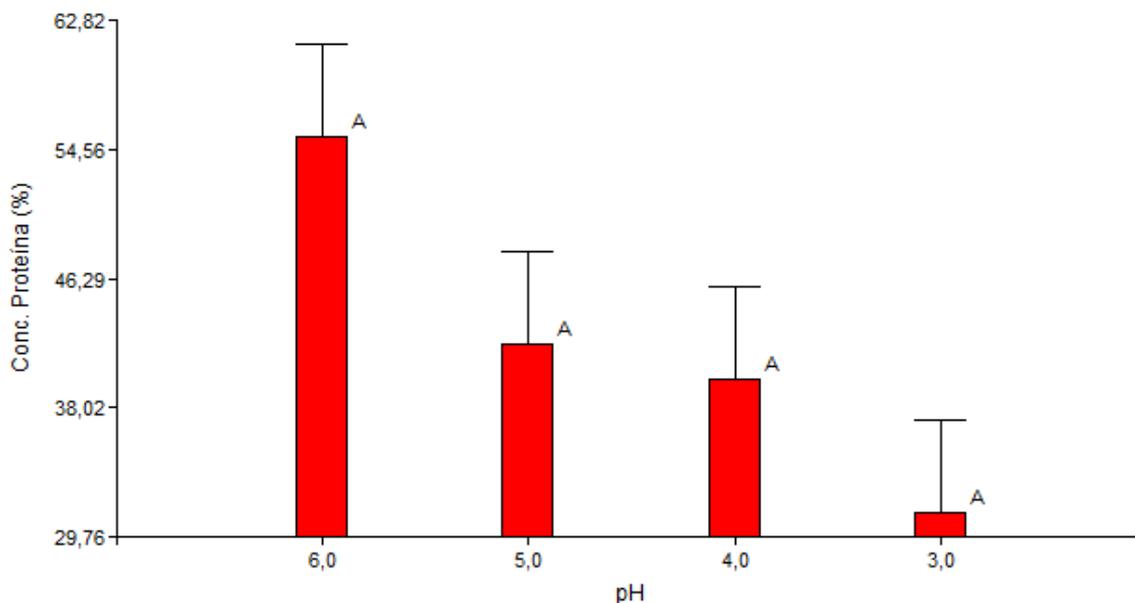


Gráfico de la concentración método Biuret

Anexo K. Análisis de varianza Método BCA

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Conc. Proteína (%) | 12 | 0,85 | 0,80 | 7,78 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 527,20 | 3 | 175,73 | 15,31 | 0,0011 |
| pH | 527,20 | 3 | 175,73 | 15,31 | 0,0011 |
| Error | 91,84 | 8 | 11,48 | | |
| Total | 619,04 | 11 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,85931

Error: 11,4803 gl: 8

| pH | Medias | n | E.E. | |
|-----|--------|---|------|---|
| 5,0 | 50,65 | 3 | 1,96 | A |
| 6,0 | 49,65 | 3 | 1,96 | A |
| 3,0 | 37,54 | 3 | 1,96 | B |
| 4,0 | 36,33 | 3 | 1,96 | B |

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

Análisis de varianza programa INFOSTAT

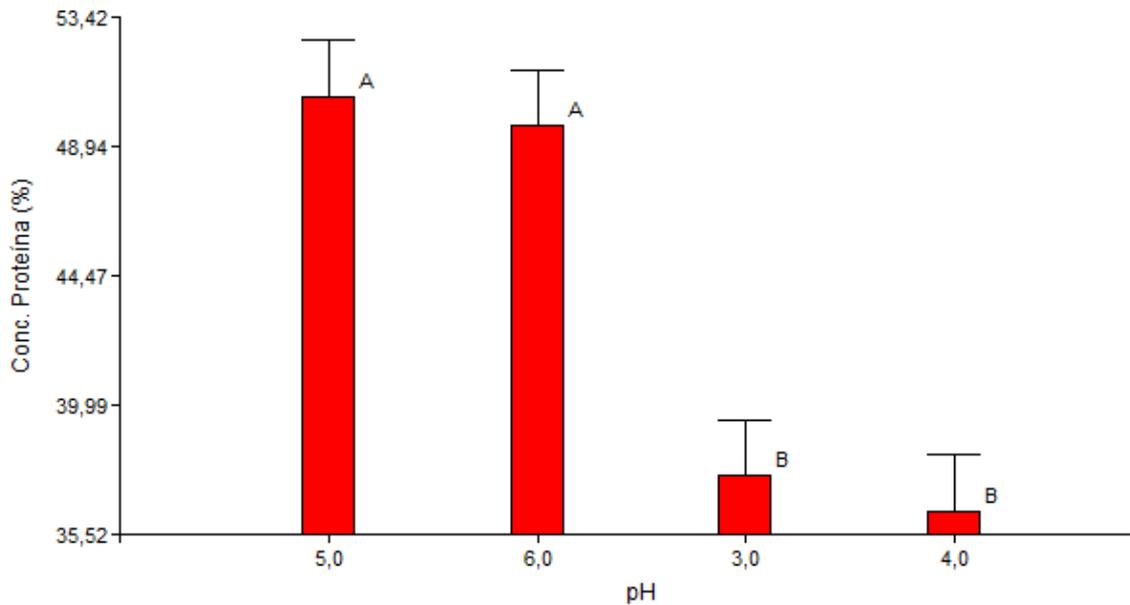


Gráfico de la concentración método Biuret

Anexo L. Análisis de varianza determinación de polifenoles

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Conc. Proteína (%) | 12 | 1,00 | 1,00 | 0,06 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|-----------|----|----------|-----------|---------|
| Modelo. | 254299,78 | 3 | 84766,59 | 329041,58 | <0,0001 |
| pH | 254299,78 | 3 | 84766,59 | 329041,58 | <0,0001 |
| Error | 2,06 | 8 | 0,26 | | |
| Total | 254301,84 | 11 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,32712

Error: 0,2576 gl: 8

| pH | Medias | n | E.E. | |
|-----|---------|---|------|---|
| 6,0 | 1028,57 | 3 | 0,29 | A |
| 5,0 | 962,49 | 3 | 0,29 | B |
| 4,0 | 856,56 | 3 | 0,29 | C |
| 3,0 | 644,34 | 3 | 0,29 | D |

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

Análisis de varianza programa INFOSTAT

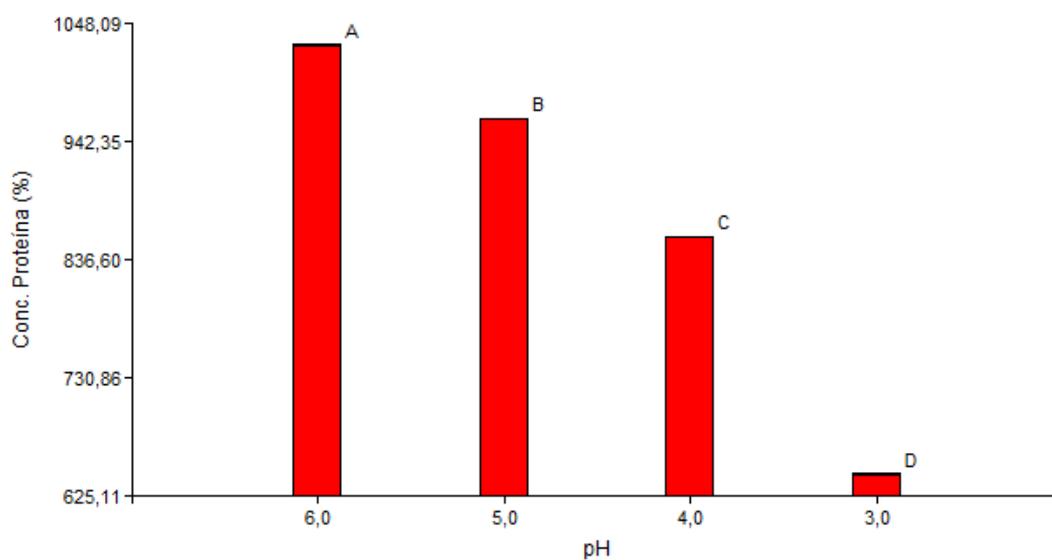


Gráfico de la concentración de polifenoles