UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONIA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN SIMULTANEA DE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LA SEMILLA DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*)

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTADO POR:

RAMÓN ISAAC, CORIAT RENGIFO

ASESOR:

ING. MSc. MANUEL RICARDO GUERRERO OCHOA

YARINACOCHA - UCAYALI

PERU- 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL0020

ANEXO 16
ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la sala virtual del Google Meet: https://meet.google.com/drk-jtmv-sne?pli reunidos para la sustentación de la tesis en el campus virtual de la Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía a las 11:30 horas del día 11 de enero del 2022, se reunió el jurado de tesis presidido por el Dr. Filadelfo Flores Buitrón, e integrado por la Ing. Ingrid Yossy Robles Castañeda y el Lic. Edilberto Valencia Salazar en calidad de miembros, con la exclusiva finalidad de evaluar la sustentación de tesis titulada ***«Optimización de la extracción simultánea de proteínas y compuestos bioactivos presentes en la semilla de camu camu (Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh)»***, cuya responsabilidad corresponde al Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **Ramón Isaac Coriat Rengifo**, a fin de optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial asesorado por el Ing. MSc. Manuel Ricardo Guerrero Ochoa.

Terminada la sustentación, el autor de la tesis respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado, cuya evaluación se consolida según la tabla y parámetros cuantitativos que siguen:

Presidente	Dr. Filadelfo Flores Buitrón	22
Miembro	Ing. Ingrid Yossy Robles Castañeda	23
Miembro	Lic. Edilberto Valencia Salazar	24
PROMEDIO		**23**

El Jurado después de deliberar y calibrar los aportes de la tesis y la fundamentación del sustentante, compatibilizó el resultado cuantitativo con la tabla cualitativa equivalente sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **APROBADO** asignándole un calificativo de **VEINTITRÉS** puntos, según el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía.

Siendo las 13:18 horas del mismo día se dio por terminado el acta de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.

..... **Dr. Filadelfo Flores Buitrón** **PRESIDENTE**	..... **Ing. Ingrid Yossy Robles Castañeda** **MIEMBRO**
..... **Lic. Edilberto Valencia Salazar** **MIEMBRO**	

CONSTANCIA

N°008-2022

ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION SISTEMA ANTIPLAGIO TURNITIN

La Biblioteca Central, hace constar por la presente, que le informe Final (Tesis) titulado:

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN SIMULTANEA DE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LA SEMILLA DE CAMU-CAMU (MYRCIARIA DUBIA (HBK) MC. VAUGH).

Cuyo autor es : **CORIAT RENGIFO, RAMÓN ISAAC.**

Facultad : FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Profesional : INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL.

Después de realizado el análisis correspondiente en el Sistema Antiplagio, dicho documento presenta un porcentaje de similitud de 10%.

En tal sentido, de acuerdo a los criterios de porcentaje establecido en el **artículo 9 de la DIRECTIVA DE USO DEL SISTEMA ANTIPLAGIO**, aprobada con **RESOLUCIÓN N°164-2021-UNIA-CO**, el cual indica que no se debe superar el 24%. Se declara, que el trabajo de investigación: **SI contiene un porcentaje aceptable de similitud y/o plagio, por lo que SI se aprueba su originalidad.**

En señal de conformidad y verificación se FIRMA Y SELLA la presente constancia.

Fecha: 28/02/2022

UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONÍA - UCAYALI

Dr. Jesús Taylor Dávila Francia
Jefe de la Oficina de Biblioteca Central

Dedicatoria

Dedicado a mis padres y demás familiares!

AGRADECIMIENTOS

Con gran esfuerzo y dedicación se culminó con éxito este proyecto, agradezco a mi familia, quienes son los primeros en apoyarme en mi desarrollo personal y alentarme a seguir con lo que me proponga.

Agradecer también a mi asesor, Ing. MSc. Manuel Ricardo Guerrero Ochoa, por sus conocimientos brindados en todo este tiempo, su orientación y su manera de trabajar fueron fundamentales para sentirme a gusto en el transcurso de la ejecución de este proyecto; así mismo inculcando la responsabilidad y exigencia académica.

A la vicepresidencia de investigación por ser parte activa de la ejecución de este proyecto, que gracias a su apoyo en la subvención de este pude realizarla.

A mi Universidad y a cada uno de mis docentes que fueron parte de mi desarrollo académico profesional.

En general agradecer a todos los que estuvieron detrás, gracias a sus aportes hoy se ve reflejado en la culminación de este proyecto.

ÍNDICE

Pagina

RESUMEN viii
ABSTRACT ix
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REVISIÓN DE LITERATURA 2
2.1. Antecedentes 2
2.2. Bases teóricas 7
2.2.1. Camu – camu 7
2.2.2. Compuestos bioactivos 10
2.2.3. Proteínas 10
2.2.4. Polifenoles 27
2.2.5. Actividad antioxidante 28
2.2.6. Diseño Media Fracción 38
2.2.7. Diseño Factor Categórico Único 38
2.3. Definición de términos 38
2.3.1. Actividad antioxidante 38
2.3.2. Compuestos fenólicos 39
2.3.3. Compuestas bioactivos 39
2.3.4. Extracción simultanea 39
2.3.5. Semilla 39
2.3.6. Precipitación isoeléctrica 39
2.3.7. Punto isoeléctrico 40
III. METODOS 41
3.1. Ubicación y descripción del área de estudio 41
3.2. Identificación y descripción del material experimental 41
3.2.1. Identificación y descripción de la unidad experimental 41
3.3. Procedimientos 43
3.3.1. Caracterización fisicoquímica de la semilla de camu-camu 43
3.3.2. Procedimiento para la determinación de proteínas solubles 46
3.3.3. Procedimiento para la determinación de polifenoles totales 47
3.3.4. Procedimiento para determinar la actividad antioxidante: IC 50 47
3.4. Variables 48
3.5. Población y muestra 48
3.5.1. Población 48
3.5.2. Muestra 48
3.6. Tratamientos 50

3.6.1. Diseños experimentales 50
3.7. Recolección de datos 51
3.7.1. Descripción de las fuentes de información primaria y secundaria 51
3.8. Procesamiento de los datos 52
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 53
4.1. Caracterización fisicoquímica de la semilla de camu-camu 53
4.2. Cribado de factores significativos (Diseño de media fracción 2^{5-1}) 55
4.3. Optimización (Diseño de factor categórico individual) 60
4.3.1. Optimización para proteínas solubles 62
4.3.2. Optimización para polifenoles totales 63
4.3.3. Optimización para actividad antioxidante 64
4.4. Verificación de resultados obtenidos 66
V. CONCLUSIONES 67
VI. RECOMENDACIONES 68
VII. BIBLIOGRAFÍA 69
VIII. ANEXOS 77
8.1. Curvas estándar utilizadas en la investigación 77
8.2. Resultados obtenidos en la etapa de cribado 77
8.3. Resultados obtenidos en la etapa de optimización 79
8.4. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 1 de la etapa de cribado 81

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO Pagina

Cuadro 1. Clasificación taxonómica 8

Cuadro 2. Composición química de 100 g de pulpa de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*). 11

Cuadro 3. Variables, indicadores y niveles propuestos para extracción simultanea de proteínas y compuestos bioactivos 49

Cuadro 4. Diseño Media Fracción 2^{5-1} 50

Cuadro 5. Diseño de Factor Categórico Único 51

Cuadro 6. Resultados del análisis químico proximal 53

Cuadro 7. Diseño Media Fracción 2^{5-1} 56

Cuadro 8. Diseño Factor Categórico Individual 61

Cuadro 9. Resultados de la verificación 66

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO Pagina

Figura 1. Camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*)……9

Figura 2. Enlace peptídico: a) Formación de un péptido b) Dimensiones de un dipéptido……12

Figura 3. Niveles de organización de las proteínas……14

Figura 4. Secuencia de la hidratación de una proteína……..17

Figura 5. Interacción entre radicales libres y antioxidantes……..30

Figura 6. Imágenes del Google Maps, sobre el distrito de Manantay-Pucallpillo……...41

Figura 7. Datos obtenidos del GPS……..42

Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizada para proteínas solubles……57

Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizada para polifenoles totales……58

Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizada para actividad antioxidante……..….59

Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizada para actividad antioxidante con datos transformados……..60

Figura 12. Grafica de dispersión de proteínas vs temperatura……..63

Figura 13. Grafica de dispersión de polifenoles vs temperatura……64

Figura 14. Grafica de dispersión de actividad antioxidante vs temperatura……65

RESUMEN

La semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*) es un subproducto agroindustrial residual, con bajo aprovechamiento, cuyas propiedades funcionales deben ser puestas en valor. Así, el presente estudio tuvo como objetivo determinar los parámetros óptimos de extracción simultanea de proteínas y compuestos bioactivos (polifenoles totales y actividad antioxidante) presentes en la semilla de camu-camu. Los parámetros de extracción: relación solvente/muestra (30 – 60 mL/g), pH (7 – 9), concentración de NaCl (0 – 1 M), temperatura (30 – 50 °C) y tiempo (45 – 90 min) fueron evaluados bajo un diseño de cribado 2^{5-1}, para estimar los efectos significativos sobre las variables respuesta (proteínas solubles, polifenoles totales y actividad antioxidante). La temperatura fue el único factor significativo con efecto positivo sobre la extracción, que fue elegido para la etapa de optimización, en la que se empleó un diseño de Factor Categórico Individual, con 5 niveles (30, 40, 50, 60 y 70 °C). Los otros parámetros permanecieron constantes: relación solvente/muestra (30 mL/g), pH (9), concentración de NaCl (0 M) y tiempo (90 min). La temperatura óptima para la extracción fue 60 °C obteniéndose para proteínas solubles 56.002 ± 1.99 %, polifenoles totales 523.330 ± 1.95 mg GAE / 100 g, y actividad antioxidante un valor de IC50 de 6.180 ± 0.219 mg / mL. Estos resultados demostraron ser favorables para el aprovechamiento de este residuo agroindustrial, por su potencial nutracéutico en el desarrollo de nuevos productos.

Palabras clave: camu-camu, semilla, proteína, polifenoles totales, actividad antioxidante, IC50, optimización.

ABSTRACT

The seed of camu-camu (Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh) is a residual agro-industrial by-product, with low utilization, whose functional properties must be valued. Thus, this study aimed to determine the optimal parameters of simultaneous extraction of proteins and bioactive compounds (total polyphenols and antioxidant activity) present in the seed of camu-camu. Extraction parameters: solvent/sample ratio (30 - 60 mL/g), pH (7 - 9), NaCl concentration (0 - 1 M), temperature (30 - 50 °C) and time (45 - 90 min) were evaluated under a screening design 2^{5-1}, to estimate significant effects on response variables (soluble proteins, total polyphenols and antioxidant activity). Temperature was the only significant factor with positive effect on the extraction, which was chosen for the optimization stage, in which an Individual Categorical Factor design was used, with 5 levels (30, 40, 50, 60 and 70 °C). The other parameters remained constant: solvent/sample ratio (30 mL/g), pH (9), NaCl concentration (0 M) and time (90 min). The optimum temperature for extraction was 60 °C obtained for soluble proteins 56.002 1.99 %, total polyphenols 523.330 1.95 mg GAE / 100 g, and antioxidant activity a value of IC50 of 6.180 0.219 mg / mL. These results proved to be favorable for the use of this agro-industrial waste, due to its nutraceutical potential in the development of new products.

Keywords: camu-camu, seed, protein, total polyphenols, antioxidant activity, IC50, optimization.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el estudio de las proteínas y compuestos bioactivos en materias primas de origen vegetal va en aumento debido a las condiciones que presentan, y los beneficios que puedan aportar para el organismo. Por ello al realizar diferentes investigaciones en este campo se estaría aportando mucho a que otros investigadores se centren en este tema, dándole vital importancia, debido a que en la actualidad el uso de estos contribuye a diferentes campos, como por ejemplo al alimentario y farmacéutico (Akter *et al*. 2011, Vasconcelos-Costa *et al.* 2013, Fracassetti *et al.* 2013).

En la Amazonia existen productos que no están siendo investigados en este tema y es escaso el aprovechamiento del potencial uso que posee en la industria como producto alternativo de origen natural. Las investigaciones en camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*) se han centrado en el estudio de las propiedades de la pulpa y la cáscara (Sotero-Solis *et al.* 2009 y Vasconcelos-Costa *et al.* 2013), sin embargo, existe escasa información sobre las propiedades que posee la semilla (las pocas investigaciones que existen se han enfocado solamente en el estudio de sus compuestos fenólicos y su actividad antioxidante (Sotero-Solis *et al.* 2009, Fracassetti *et al.* 2013, Kaneshima *et al.* 2016), Silva de Azevêdo *et al.* (2014), identificó flavonoides importantes en la pulpa de camu-camu como: quercetina, miricetina y catequina; además de altas cantidades de ácido elágico, y por primera vez identificándose ácido siringico, que es un subproducto del aprovechamiento de la pulpa, y considerado muchas veces como desecho agroindustrial, convirtiéndose en un contaminante ambiental, pues no se le da un manejo adecuado.

Por lo anterior, el presente estudio se realizó con el objetivo general de optimizar la extracción simultanea de proteínas y compuestos bioactivos presentes en la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), para poder obtener mayores beneficios y un mejor aprovechamiento de este recurso; así, se planteó los siguientes objetivos específicos: (1) Caracterizar fisicoquímicamente la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), (2) Determinar los factores importantes (significativos) en el proceso de extracción de proteínas solubles y compuestos bioactivos (polifenoles totales y actividad antioxidante) de las semillas de camu-camu, usando un diseño de cribado, y (3) Optimizar la extracción simultanea de proteínas solubles y compuestos bioactivos (polifenoles totales y actividad antioxidante) de las semillas de camu-camu, usando los factores significativos de la etapa de cribado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Ochoa-Pachas (2018), en su investigación acerca de la extracción de péptidos bioactivos de un hidrolizado proteínico de cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*), logro cuantificar cantidades cercanas, de contenido de proteínas, a lo reportados por otras investigaciones en diferentes tipos de cereales andinos obteniendo un 71.95 % de proteínas; logrando corroborarse con lo contenido en quinua (73.24 %) y kiwicha (75.8 %), esto fue muy importante ya que pudo continuar con la extracción de los péptidos a partir de este contenido de proteínas. Cabe resaltar que el método utilizado, para la extracción de las proteínas, en la cañihua fue el de la AOAC (920.87.1995); que se fundamenta en la lisis de la materia orgánica con un concentrado de ácido sulfúrico, originándose sulfato de amonio, la cantidad de nitrógeno total se transformó a contenido de proteínas al operar por multiplicación, por el factor 5.85 empleado en el tema de cereales.

Mera-Oyola (2018), en su proyecto de investigación acerca de cómo optimizar la extracción de proteína de cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*) usando la metodología de superficie de respuesta obtuvo en sus resultados cifras importantes de proteínas a partir cereal - 64.05 ± 1.02 a 85.1 ± 3.56 % - comparándose con otros investigadores que hicieron tesis similares encontró que fue de 68.4 % para el caso de la quinua. Además, comparó con otros como paprika (52.5 %), maní (66.2 %) y harina de soya (65.4 %) y las semillas de leguminosas (22.75 a 37.9 %), concluyendo que la cañihua tiene mayor ratio en contenido de proteínas que los cereales y/o materias primas antes mencionados.

Molina-Paredes (2018), para su investigación utilizó dos variedades de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*); la blanca de Juli y Pasankalla y el factor a destacar fue el pH como base de la investigación, obteniendo los resultados siguientes en la variedad blanca de Juli obtuvo un 78 % de proteína por el método Kjeldahl y para variedad Pasankalla tuvo un 71.63 % de proteína usando el mismo método de extracción, por lo tanto concluye que para la extracción de aislado proteínico tuvo influencia el potencial de hidrogeno (pH) acido de la manera siguiente; para la variación blanca de Juli el pH que tuvo mejor beneficio de extracción y porcentaje de proteína es a pH 9 de solubilizacion y pH 5 de precipitación, para la variación Pasankalla el pH de solubilizacion donde se obtuvo mayor beneficio fue de 8 y para precipitación fue pH 3.

Correa Navarro *et al*. (2017), realizaron una investigación para conseguir el método ideal para la cuantificación y extracción de las proteínas totales en semillas germinadas de maíz (Zea mays L.), por lo tanto, se determinaron mediante seis metodos de extracción que se consiguieron al mezclar dos métodos físicos similares: agitación orbital o asistida con ultrasonido, y tres solventes extractores: ácido tricloroacético, Tris-Base y Tris-HCl. Anteriormente el método ideal de era por espectroscopía UV visible, usando los reactivos cromogénicos de: Bradford, Lowry y Bio-Rad. Los resultados más significativos (10.83 mg / L de proteína) se obtuvieron con la extracción ayudada con ultrasonido en conjunto con Tris-Base y utilizando el reactivo de Bradford para la creación del color y la siguiente cuantificación por espectroscopía de UV visible.

García-Gutiérrez y Miranda-Rodriguez (2017), investigaron sobre las propiedades funcionales, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de la semilla de chía (*Salvia hispanica L.*), encontrando que para el contenido de fenoles totales para chía blanca de cultivo orgánico fue de 2.21 ± 0.05 mg GAE / g, mientras que para la variedad negra de cultivo convencional fue de 2.18 ± 0.02 mg GAE / g; y para la capacidad antioxidante, la semilla negra de cultivo convencional, presentó la mayor cantidad con respecto a capacidad antioxidante, presentando un valor de 528.95 ± 6.78 μmol TE / g y en el caso de cultivo orgánico, la semilla negra también presento un valor elevado de 459.28 ± 7.56 μmol TE / g.

Grefa-Andi (2017), en su tesis dio a conocer la caracterización de proteínas en las semillas del fruto que da el árbol de guachanzo (*Caryodendron orinocense Karst*) obteniendo los siguientes datos: el aislado con extracción a baja temperatura y pH 6.0 mostró un elevado porcentaje de rendimiento de 21.91 %, continuando 16.60 % con un pH de 5.0 y en menor cantidad 8.49 y 14.08 % con pH 3.0 y 4.0 respectivamente, se concluyó que en los rendimientos obtenidos a diferentes pH presentan diferencia significativa. Estos rendimientos de proteína aislada obtenida permiten dar un mejor uso a la torta de guachanzo como una alternativa proteínica.

Valencia *et al.* (2017), en este proyecto, estudiaron los fenólicos totales en 24 accesiones de semilla de quinua (*Chenopodium quinoa W.*), encontrando valores de entre 0.783 ± 0.052 y 3.437 ± 0.267 mg GAE / g; para la capacidad antioxidante de las 24 accesiones de semilla de quinua, estos fueron extraídos en medios metanólico y etanólicos, para los cuales presentaron los siguientes resultados, para medio etanólico los valores estuvieron comprendidos de entre 486.080 ± 3.572 y 1195.746 ± 18.086 μmol Trolox / 100 g y para medio metanólico los valores de entre 474.215 ± 17.545 – 972.875 ± 53.896 μmol Trolox / 100 g.

Belmán-Ramírez *et al.* (2016), muestran los resultados obtenidos para la evaluación de compuestos bioactivos en semillas de mijo perla (*Pennisetum glaucum*), en cuanto a compuestos fenólicos totales, presenta 60 mg EAG.g^{-1} de peso fresco; y para el contenido de flavonoides totales 200 mg EQ.g^{-1} de peso seco.

Bonino *et al.* (2016), obtuvieron aislados proteicos de chía y quinua por extracción a pH básico, posterior de precipitación en medio ligeramente acidulado; y se maximizaron las circunstancias de producción de los aislados: la relación solvente/ materia prima, el potencial de hidrogeno (pH) de producción y el potencial de hidrogeno (pH) de precipitación, para la cuantificación los investigadores usaron el método de extracción Bradford.

Corona-Jiménez *et al.* (2016), estudiaron el efecto de extracción de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante asistida por ultrasonido a diferentes amplitudes con dos diferentes disolventes (metanol y hexano) para la semilla de chía (*Salvia hispanica L.*), obteniendo, a una amplitud del 100 % de energía ultrasónica y en medio metanólico, 194.06 ± 11.1 mg GAE.100 g^{-1}; para la capacidad antioxidante (método ABTS) no hubo diferencias significativas en lo que concierne al ultrasonido, pero si para el disolvente, siendo el metanol quien obtuvo la mayor capacidad antioxidante, presentando un 9.98 ± 0.19 mg Trolox.100 g^{-1}.

Kaneshima *et al.* (2016), en su investigación acerca de la actividad antioxidante de las elagitaninos C-Glicosidico (grandinina, vescalagina, castalagina, metilvescalagina, estachiurina y casuarinina), de la semilla y cascara de camu-camu (*Myrciaria dubia*) realizaron tres ensayos conocidos para determinar actividad antioxidante (DPPH, ABTS y ORAC). Para la extracción obtuvieron muestras de semillas secas (400 g) que fueron desgrasadas con n-hexano y luego extraídas tres veces con acetona acuosa al 50 % (v/v) en un cuarto a temperatura ambiente por 24 horas. Los extractos combinados fueron concentrados hasta secado bajo presion reducida a 40 °C para obtener el extracto crudo (43.9 g). El extracto crudo fue disuelto en metanol al 50 % (MeOH, 500 mL) y se aplicó una columna *Sephadex* LH-20 (50 mm i.d. x 300 mm). La columna se eluyó con un sistema disolvente de H_2O-MeOH-acetona, y 8 fracciones fueron obtenidas: 50 % MeOH Fr. (1.60 g), 60 % MeOH Fr. (727 mg), 70 % MeOH Fr. (403 mg), 80 % MeOH Fr. (268 mg), 90 % MeOH Fr. (113 mg), 100 % MeOH Fr. (127 mg), 50 % acetona Fr. (1.30 g) y 100 % acetona Fr. (232 mg). Las fracciones de MeOH del 60-90 % fueron disueltas en acetonitrilo del 8-15 % y la porción soluble se sometió a HPLC preparativo. A partir de 1.0 g de extracto crudo, los compuestos 1 (2.3 mg), 2 (19.7 mg), 3 (41.9 mg), 4 (2.9 mg), 5 (2.9 mg), y 6 (5.2 mg) fueron obtenidos.

La pureza de los componentes aislados fue confirmada por HPLC, HNMR, CNMR y el coeficiente de extinción molecular de sus espectros UV.

Ramírez-Pimentel *et al.* (2016), con el propósito de extender los saberes sobre este producto vegetal, extrajeron las proteínas solubles de la semilla de melón. La cantidad de proteínas totales fue de 27.34 % para el *Cucumis melo* (chino) y de 24.9 % para el *Cucumis melo* (Verde). Las proteínas decantadas con HCl o a baja temperatura presentaron una característica electroforética parecido en las dos variaciones. La extracción de proteína tuvo mejor rendimiento a valores de pH entre 5 y 12, todo lo contrario, a valores de 2 a 4. El contenido total de proteína, dio 27.34 % para *Cucumis melo* (chino) (Hu y Ao, citado por Ramírez-Pimentel *et al.*2016). Para *Cucumis melo* (Verde) se obtuvo un contenido de 29.9 %, valor símil a lo encontrado en esta investigación.

Taco-Chisaguano (2016), realizó una investigación acerca de la caracterización y aislamiento de las proteínas de la semilla de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) ecuatoriana, variación INIAP-Tunkahuán en la cual utilizo dos métodos de extracción de proteínas; la primera fue por el método Kjeldahl en el que obtuvo un 70 % de proteína total, y por el método Biuret obtuvo alrededor del 66 % de proteínas totales, resulto que la cantidad de proteínas solubles de los aislados obtenidos por los dos metodos fue alto, lo que implica que la mayor cantidad de proteínas de la quinua tendrían una digestibilidad alta, ya que presenta una proporcionalidad entre la solubilidad y la digestibilidad de las proteínas, característica fundamental nutricionalmente hablando.

Aquino-Méndez (2015), en el trabajo de investigación de la optimización de la operación de extracción de las proteínas de la torta de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*), se obtuvo que el contenido de proteína total de la harina desgrasada con humedad de 6.58 %; en base húmeda es de 57.9 %, y base seca 61.98 %.

Guerrero-Ochoa *et al.* (2015), en la investigación realizada por los autores sobre la metodología optimizada para la extracción de proteínas en granos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) utilizaron el método Kjeldahl obteniendo un 13.6 % de proteína total antes del proceso de desgrasado, así mismo el diseño experimental que aplicaron para la detección de variables significativas fue el de Plackett-Burman que se encarga de la detección de variables significativas, a partir de los resultados, aplicaron un diseño compuesto central y con las condiciones óptimas de extracción obtuvieron un 62.1 % de proteína total extraída a partir de dicha materia prima.

Silva de Azevêdo (2015), en su tesis doctoral sobre las características bioactivas, funcionales y efecto protector del residuo deshidratado (cascara y semilla con pulpa adherida) de camu-camu (*Myrciaria dubia H.B.K.* (*Mc. Vaugh*)) sobre dolencias degenerativas utilizando modelos *in vivo C. elegans*, utiliza de dos tipos de secados; uno por convección y el otro por liofilización evaluando el impacto de estos procesos sobre los compuestos bioactivos así mismo se informa que haciendo los estudios correspondientes con residuos frescos, obtuvieron mayores concentraciones de compuestos bioactivos que utilizando los métodos anteriores mencionados de secado. Con respecto a los resultados obtenidos sobre las dolencias neurodegenerativas y el envejecimiento utilizando el modelo *in vivo C. elegans*, tuvieron resultados alentadores retardando los efectos del Alzheimer y otra dolencia como el Parkinson.

Kaneshima (2015), Realizó extractos de la cáscara y semilla de camu-camu fueron preparados con acetona y n-hexano al 50 %, estos extractos fueron fraccionados por columna cromatográfica Sephadex LH-20. Los contenidos de polifenoles para semilla fueron de 404.6 mg / g y cascara de 151.0 mg / g; contenidos de taninos condensados fueron para la semilla de 73.9 mg / g y para la cascara 19.1 mg / g. La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, obteniendo 29.2 ug / mL para semilla y cáscara de 97.9 ug / mL; la actividad antimicrobiana fue ensayada contra bacterias 6 Gram-positivos, 3 Gram-negativos y dos hongos, dando como resultado para semillas de 2.5 % y cascara de 7.3 %.

Chaparro *et al.* (2014), los investigadores realizaron el análisis químico proximal de semillas de *Annona muricata* (guanábana), conseguidas como residuo agroindustrial y su caracterización funcional del pulverizado desgrasado y los aislados proteínicos de las almendras. La cantidad de proteína cruda en la semilla fue del 15 %, lo que causo fácil la extracción de los aislados proteínicos. El punto isoeléctrico (PI) de los aislados sin presencia de NaCl (A0) y con NaCl (A1) fue, para los dos casos, de 4.0. El contenido para A0 fue de 46 % y para A1, de 46.3 %. El rendimiento de proteína para A0 fue de 39.9 % y para A1, de 63.3 %, en este último a favor de la capacidad de absorción de agua (CAA), la capacidad de absorción de lípidos (CAL) y la capacidad espumante (CE). Las idóneas características emulsificantes se presentaron en el pulverizado desgrasado. Estos aislados proteínicos obtenidos de la semilla de guanábana podrían ser utilizados en la industria alimentaria, como ingredientes de valor funcional.

Vit *et al.* (2014), en esta investigación sobre la guanábana (*Annona muricata*), cuyo fin actual es por las características médicas. Se cotejo las características proximales y la

actividad antioxidante de sus semillas, las hojas secas y frescas, y la pulpa. Los mayores contenidos de proteicos (14.77 g / 100 g) y grasos (25.75 g / 100 g) se hallaron en las semillas. La pulpa mostró un contenido de humedad elevado (86.32 g / 100 g) y las hojas secas el mayor contenido de cenizas (7.17 g / 100 g). La actividad antioxidante de todas las analizadas, tuvieron mejor rendimiento en extractos con etanol, que, en extractos con metanol, así mismo con el rendimiento de polifenoles y flavonoides.

Los rendimientos de actividad antioxidante en los extractos con etanol fueron de 131.2; 280.2 y 306.0 µmol equivalentes Trolox / 100 g en semillas, hojas secas y la pulpa consiguientemente. La pulpa de *Annona muricata* obtuvo el más alto rendimiento en contenido de flavonoides (574.0 mg EQ / 100 g) y de polifenoles (941.4 mg EAG / 100 g).

Sotero-Solis *et al.* (2009), efectuó el estudio de la actividad antioxidante de la semilla, pulpa y cáscara del camu-camu. Realizó un análisis de las actividades antioxidantes, mediante la captura de radicales libres del DPPH, determinando la cantidad de fenoles y ácido ascórbico, mediante metodología espectrofotométrica y por cromatografía de HPLC. Las partes con mejor rendimiento con respecto a la actividad antioxidante la obtuvieron el epicarpio de camu-camu con un valor de 146.94 µg / mL (IC50), después estuvo la pulpa con 167.67 µg / mL y en menor cantidad la semilla con 399.77 µg / mL. Los mejores contenidos para fenoles se obtuvieron en pulpa seca (23168.0 mg / 100 g) y en cáscara seca (17905.5 mg / 100 g); así mismo en semilla (2969.2 mg / 100 g). Los mejores contenidos de ácido ascórbico en peso seco reportadas fueron en pulpa: 14337.94 mg / 100 g y en cáscara: 10506.37 mg / 100 g, teniendo la más baja en semilla: 87.08 mg / 100 g. En la pulpa y epicarpio del camu-camu se hallaron catequina, rutina, epicatequina y ácido clorogénico, resaltando la catequina en el epicarpio con 47.29 mg / 100 g.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Camu – camu

El camu-camu es una planta originaria de la cuenca Amazonica y del Orinoco, con algunas poblaciones nativas en el Perú, Brasil, Colombia y Venezuela. Esta especie asociada al crecimiento social de los pequeños grupos de poblaciones de la Amazonía y de otras partes donde se presentan infinidad de históricos usos, se encuentra haciendo parte de ecosistemas ribereños, de lagunas y cursos menores de agua en la Amazonía, interrelacionando y desarrollándose

con otras variedades vegetales y especies de microorganismos y organismos (Osorio-Moreno *et al.* 2001).

a. Clasificación taxonómica

A continuación, se presentará en el Cuadro 1, la clasificación taxonómica del camu-camu (Myrciaria dubia (HBK) Mc Vaugh), en el cual se podrá encontrar datos como el reino al que pertenece, su familia, orden, entre otros aspectos que son importantes para conocer a la planta en mención.

Según Osorio-Moreno *et al.* (2001), los nombres comunes aceptados: Camu-camu en Perú; caçari, araça-d`água en Brasil, guayabo en la frontera de Colombia con Venezuela y guayabito en Venezuela.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica

Reino	*Plantae*
División	*Fanerógamas*
Subdivisión	*Angiospermas*
Clase	*Dicotiledonales*
Orden	*Myrtales*
Familia	*Myrtaceae*
Genero	*Myrciaria*
Especie	*Myrciaria dubia (HBK) Mc Vaugh*

Fuente: Tomado de Osorio-Moreno *et al.* 2001:4.

b. Descripción botánica

Se encuentra en los bosques rivereños momentáneamente inundados en la Amazonia a orillas de los ríos de aguas oscuras y cochas; es un árbol pequeño o arbusto de 3 a 8 m de elongación, su ramificación empieza desde la base originando otros tallos secundarios que así mismo se ramifican en forma de copa abierta. Las ramas y el tronco son lisos, cilíndricos, glabros, de color marrón claro o rojizo y su corteza que se cae de manera natural (Dosert *et al*., citado por Flores 2010).

Figura 1. Camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*)

Fuente: Propia

c. Antecedentes históricos y usos

Hace un promedio de 5 décadas en Loreto, los campesinos comenzaron a sembrar camu-camu en la zona de playa, el cual permitió su desarrollo, esta idea fue alentada por el gobierno central usando variedades de elevada resistencia. La masificación tiene un manejo de muy baja tecnología, aunque recibe ayuda de las instituciones es insuficiente. Los rodales se hallan lejos de la urbe y es importante usar medio fluviales, causa de esto las características del transporte y a la inadecuada manipulación de los frutos, puede llegar a haber merma del 15 al 20 % del contenido de vitamina C, pudiendo llegar inclusive a bordear hasta un 30% de merma (Chang, citado por Flores 2010).

En la época de los colonizadores españoles, los misioneros usaron el runasimi para interactuar con los diferentes grupos nativos de la amazonia, hoy en día, se constata la presencia del dialecto tupí en el vocabulario local de Loreto. De las palabras más usadas en la parte baja de la selva de la amazonía peruana que proceden del tupí encontramos el camu-camu, kamu kamu; con respecto al conocimiento popular, camu-camu es la onomatopeya producida por los peces cuando consumen los frutos que se precipitan al rio, es sabido de igual manera que este fruto es la comida de la gamitana un pez de gran futuro comercial, que en la actualidad se está produciendo en programas acuícolas; el camu-camu actualmente es utilizado en la amazonia como sebo en la pesca. De igual forma, en el dialecto de los pueblos Shipibo - Conibo se identifica a la *Myrciaria dubia*;

como: camo camo; y usan el tinte de su epicarpio maduro para impregnarlos en fibras vegetales de la Chambira (*Astrocarium chambira*) (Flores 2010).

d. Composición química y valor nutricional

En el Cuadro 2 se presenta a continuación el contenido aproximado de la composición química y nutricional del camu-camu.

2.2.2. Compuestos bioactivos

La definición de compuesto bioactivo y su afinidad con los alimentos, no es un concepto nuevo, aunque si lo es el afán de querer aprovechar su potencial y descubrir sus fundamentos científicos con respecto a su modo de acción. Un compuesto bioactivo seria aquel componente químico que ofrece una acción benéfica para alguna función del cuerpo humano estableciendo una mejora en su bienestar y salud o disminuyendo un riesgo de enfermarse. A lo largo de los últimos años, hemos reavivado el interés por lo natural a causa de los hechos públicos que se han creado sobre los productos alimenticios saludables y seguros. Jamás se había centralizado a tal punto la atención en lo beneficioso que puede ser un alimento en estos tiempos. La idea de que los alimentos pueden ser promovedores de la salud más que su valor nutricional inicial, está generando acogida entre los profesionales de la salud y científicos (Vioque y Millan 2006).

2.2.3. Proteínas

Proviene de la lengua griega “proteos” que significa, primero, forma parte fundamental de la estructura corpórea. Este concepto fue recomendado por Mulder, un holandés químico, en el siglo XIX para nombrar al universal de todos los tejidos vegetales y animales. “Sin proteínas la vida no es posible en nuestro mundo”. A partir de estas se originan los principales sucesos de la vida. (Grefa-Andi 2017).

Las proteínas son complejas materias orgánicas nitrogenadas y tienen la tarea principal en células animales y vegetales. Cada ser tiene proteínas específicas, lo que le da su carácter único, tanto inmunológico como genético. (Brandan *et al.*, citado por Grefa-Andi. 2017). La base funcional y estructural de una

proteína son los aminoácidos, que tienen un único elemento en parecido dentro de una amplia diversidad en cuanto a configuración, el alfa-amino-carboxilo, conformado por nitrógeno, oxígeno, hidrogeno y carbono, éste primero, es fundamental de la configuración y funcionamiento de los aminoácidos. (Grefa-Andi 2017).

Cuadro 2. Composición química de 100 g de pulpa de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*).

Componentes	**SIICEX (2016)**	**Reyes *et al.* (2009)**	**Justi *et al.* (2000)**
Energía (kcal)	16.00	24.00	---
Humedad (g)	93.20	93.30	94.10
Proteínas (g)	0.50	0.50	0.40
Carbohidratos (g)	4.00	5.90	3.50
Fibra (g)	0.50	0.40	0.10
Ceniza (g)	0.20	0.20	0.30
Calcio (mg)	28.00	28.00	15.73
Fosforo (mg)	15.00	15.00	---
Hierro (mg)	0.50	0.50	0.53
Vitaminas			
Tiamina (mg)	0.01	0.01	---
Riboflavina (mg)	0.04	0.04	---
Niacina (mg)	0.61	0.61	---
Ac. Ascórbico (mg)	2089.00	2780.00	1410.00

Fuente: Tomado de Arellano-Acuña *et al*. 2016:434.

En la formación se hallan enlaces peptídicos que son una unión amida por un grupo amino y un carboxilo (-CO-NH-), si el enlace es inferior a diez aminoácidos se llaman oligopéptido, si es mayor de diez es un polipéptido, nombre específico dada a una proteína de fuerza molecular alto. (Torres, citado por Grefa-Andi 2017).

Se conocen a las proteínas como las macromoléculas de mayor cantidad en las células, constituyendo la mitad de su peso seco, desempeñando una

elevada cantidad de trabajos, de la mayoría de los ejemplares vivos. Estas tienen una configuración y estructura, que les permite efectuar distintos trabajos vitales en una célula (Byong, citado por Molina-Paredes, 2018).

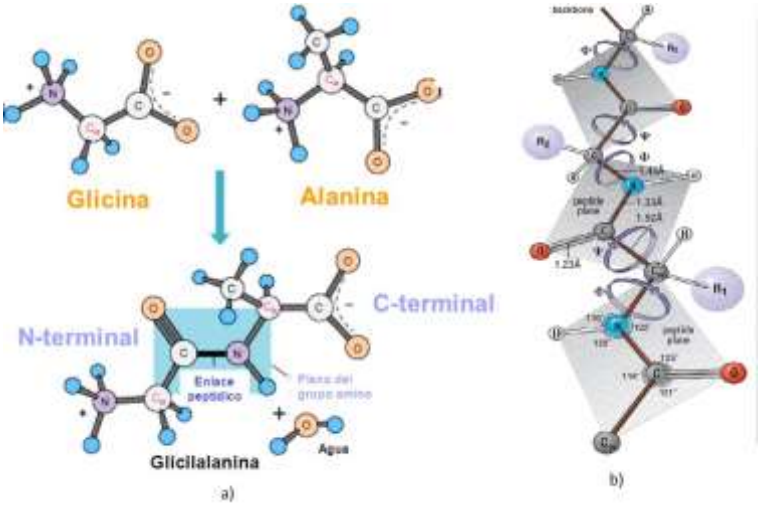


Figura 2. Enlace peptídico: a) Formación de un péptido b) Dimensiones de un dipéptido.

Fuente: Tomado de McKee, citado por Taco-Chisaguano 2016:16.

Las proteínas están conformadas principalmente por hidrógeno, carbono, oxígeno y nitrógeno. Muchas de ellas tienen azufre y hay otras que poseen componentes extras, así por ejemplo las proteínas de la leche, presentan fósforo, la mioglobina y la hemoglobina presentan hierro. (Vaclavik, citado por Molina-Paredes 2018).

Estas son las macromoléculas que tienen más versatilidad de los seres vivientes, conformados incluso por 21 aminoácidos diferentes, un aminoácido es un complejo que está conformado por un grupo amino y uno carboxilo (Colby, citado por Taco-Chisaguano 2016). Los aminoácidos se integran vía uniones amida sustituidos. Diferentemente de los empalmes fosfodiéster y glicosídicos de los ácidos nucleicos y polisacáridos, los empalmes amida de las proteínas poseen incompleto modo de enlace doble, lo que aumenta la difícil estructura de las proteínas, poseen surtidos y amplios grupos funcionales entre los que se encuentran, carboxiamidas, ácidos carboxílicos, tioéteres, alcoholes, tioles y una lista de conjuntos básicos (Berg, Tymoczko, & Stryer, citado por Taco-Chisaguano 2016). A nivel de elementos las proteínas poseen 20 – 23 % de oxígeno, 50 – 55 % de carbono, 0,2 - 3,0 % de azufre, 12-19% de nitrógeno y 6 – 7 % de hidrógeno. (Damodaran, Parkin, & Fennema, citado por Taco-

Chisaguano 2016), en algunas se han hallado cobre, hierro, fósforo y zinc (Robinson, citado por Taco-Chisaguano 2016).

a. Estructura y conformación proteica

Según (Badui, citado por Molina-Paredes 2018), las proteínas tienen una configuración química central en todas sus variedades, consistiendo en una serie lineal de aminoácidos. Lo que forma diferente a una proteína de otra es la configuración de aminoácidos de la que está conformada, a dicha configuración se le denomina como estructura primaria de la proteína. La estructura primaria de una proteína es fundamental en el funcionamiento que efectuara después, por ello las proteínas estructurales (como las que crean los cartílagos y tendones) poseen un número elevado de aminoácidos tiesos y que establecen uniones químicas formidables unos con otros para brindar fuerza a la estructura que crean.

- **Estructura primaria**

  La estructura primaria es antecedida por la configuración de aminoácidos en la serie proteica, es decir, la cantidad de aminoácidos actuales y la disposición en la que están unidas. Las oportunidades de configuración a nivel primario son casi infinitas. Como en la mayoría de las proteínas se hallan 20 aminoácidos distintos, el número de configuraciones potenciales viene previsto por las alteraciones con repetición de 20 elementos escogidos de n en n, siendo n la cantidad de aminoácidos que constituyen la molécula proteínica (Fennema, citado por Molina-Paredes 2018).

- **Estructura secundaria**

  Las estructuras secundarias de las proteínas se dan del doblamiento que la serie polipeptídica adquiere gracias a la creación de conexiones de hidrógeno entre los átomos que conforman la unión peptídica. Las conexiones de hidrógeno se instauran entre los conjuntos -CO- y -NH- de la unión peptídica (el inicial como receptor de H y el siguiente como dador de H). Es así que, la serie polipeptídica es suficiente de acoger formaciones de inferior energía libre, y por ello, más firmes (Chang, citado por Molina-Paredes 2018).

- **Estructura terciaria**

  Se llama estructura terciaria a la ordenación en tres dimensiones de la integridad de átomos que conforman la proteína, definición comparable al de configuración absoluta en otras moléculas. La formación terciaria de una proteína es la encargada principal de sus atributos biológicos, ya que la colocación espacial de los diferentes grupos funcionales dispone su interacción con los distintos ligandos. Para las proteínas que están conformadas por una sola serie polipeptídica (no tienen estructura cuaternaria), la estructura terciaria es la principal información de construcción que se puede alcanzar (Cheftel, citado por Molina-Paredes 2018).

- **Estructura cuaternaria**

  Cuando una proteína tiene más de una cadena polipeptídica, en otras palabras, cuando hablamos de una proteína oligoméricas, se dice que posee estructura cuaternaria (Osborne, citado por Molina-Paredes 2018).

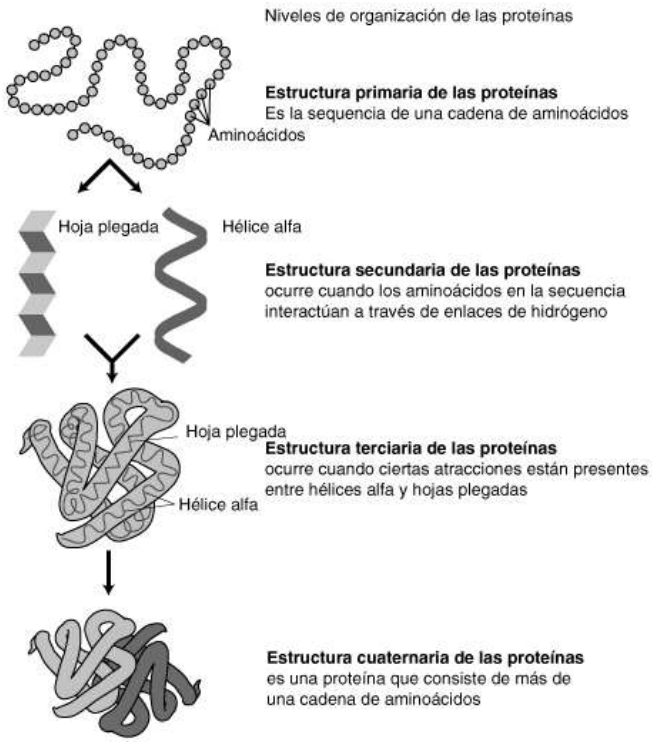


Figura 3. Niveles de organización de las proteínas.

Fuente: Tomado de Badui, citado por Molina-Paredes 2018:42.

b. Clasificación de las proteínas según su origen

i. Proteínas de origen animal

- **Escleroproteínas o proteínas fibrosas**

  Se encuentran el colágeno del tejido conjuntivo y la elastina del músculo. Estas proteínas son indisolubles a causa de su configuración molecular, y cumplen tareas de proteger y dar soporte a los tejidos. (Grefa-Andi 2017).

- **Esferoproteínas o proteínas globulares**

  Son formadores de fluidos orgánicos, como la albúmina de la clara del huevo, las globulinas del plasma sanguíneo y la caseína de la leche. Esta clase de proteínas generalmente, son solubles en agua, se asimilan de manera muy fácil y comprenden una gran cantidad de aminoácidos esenciales. (Grefa-Andi 2017).

- **Protaminas e histonas**

  Son polipéptidos de fuerzas moleculares relativamente bajos. Se hallan en las hueveras de pescados. (Grefa-Andi 2017).

ii. Proteínas de origen vegetal

- **Glutelinas**
- **Prolaminas**

  Las abarcan los vegetales, principalmente los cereales, por ejemplo: ordeina en la cebada, glutenina en el trigo, gliadina en el centeno y trigo, etc. El complejo nombrado gluten es una mezcla de glutenina más gliadina. (Grefa-Andi 2017).

c. Propiedades tecnofuncionales de las proteínas

Así mismo de su significancia como surtidor de aminoácidos en la alimentación, las proteínas contribuyen de forma precisa en las propiedades tecnológicas (gelificación, viscosidad, elasticidad, cohesión, etc.) y de la forma de los alimentos. Por dichas propiedades, las proteínas se emplean de manera comercial en la elaboración de productos para consumo a los que otorgan sus propiedades químicas y físicas (Duarte, citado por Molina-Paredes 2018).

De manera frecuente, las propiedades tecnofuncionales se precisan como "otra propiedad fisicoquímica de los polímeros que tiene efecto y cambia alguna particularidad de un producto alimenticio y que ayuda a la calidad final del alimento" (Sosa, citado por Molina-Paredes 2018).

Como, por decir, son propiedades funcionales: La absorción de grasa y agua, gelificación, la emulsificación, la solubilidad, la formación de espuma, etc. Estas penden de caracterisiticas esenciales propios de la molécula de proteína, así, por ejemplo; peso molecular, la cadena de aminoácidos, solubilidad, carga eléctrica, hidrofobicidad, conformación, etc.; como así mismo de factores externos del ambiente que las circunda como: fuerza iónica, pH, constante dieléctrica, temperatura, etc. (Badui, citado por Molina-Paredes 2018).

e. Capacidad de retención de agua (CRA)

En el interior de estas características de las proteínas se hallan las características de hidratación que pende de las interrelación proteína - agua en el interior de un alimento y cambia las características fisicoquímicas de las mismas (Badui, citado por Molina-Paredes 2018), lo cual da como consecuencia de la gran semejanza de los grupos iónicos que se disuelven en el agua para después la solvatación de los grupos apolares y polares para crear una única capa en la superficie de la proteína conformando conexiones entre la proteína y el agua como se aprecia en la figura 4 (Damodaran, citado por Molina-Paredes 2018). Esta particularidad de unión de agua se exhibe como gramos de agua por gramo de proteína en polvo cuando se encuentra a una humedad relativa de 90 – 95 % (Kunts, citado por Molina-Paredes 2018), se hallan factores del ambiente como la formación de la configuración interna de las proteínas, temperatura, pH, fuerza iónica de las sales presentes los cuales contribuyen sobre esta característica de detener agua ligada aportando grandes acciones en las propiedades de superficie de las proteínas (Vani & Zayas, citado por Molina-Paredes 2018), para las diversas adaptaciones en productor alimenticios se tiene en cuenta que importa más la característica de ligar agua contra la fuerza gravitatoria como por ejemplo de los geles en lugar de su característica de retener agua (Quinn & Paton, citado por Molina-Paredes 2018), por tanto no hay una correlación entre la característica de retener agua dentro de su

conformación y la solubilidad de las proteínas (Ahmedna, citado por Molina-Paredes 2018).

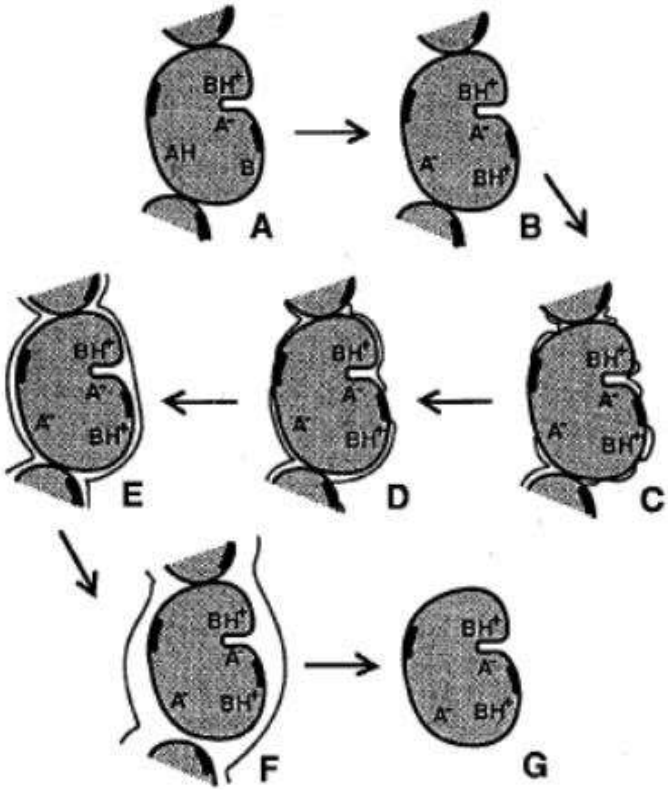


Figura 4. Secuencia de la hidratación de una proteína

Fuente: Tomado de Damodaran, citado por Molina-Paredes 2018:46.

f. Capacidad emulsificante (CE)

La propiedad interfacial fundamental que trata de la no hidrofilicidad del compuesto apolar y la no hidrofobicidad del componente polar para así crear una etapa constante que es conformada por un emulsificante, aceite, agua y utilizando trabajo mecánico gracias a la maleabilidad, tamaño, dureza y forma de la proteína para una óptima creación de films dentro de su composición (Badui, citado por Molina-Paredes 2018).

g. Capacidad espumante

Esta característica funciona con un programa de adsorción en la interfase de las proteínas con el desarrollo de un film, a partir de cómo se encuentren dispuestas al interior de su estructura, esta característica otorga dureza, elasticidad y volumen a shakes, aderezos, helados y espumas (Kinsella & Melachouris, citado por Molina-Paredes 2018). Estas espumas son conformadas de una etapa constante liquida acuosa y una etapa regada que mayormente es aire, las espumas creadas

utilizando proteínas se pueden crear por agitación permanente, burbujeo o batido para la infiltración de aire al interior de las estructuras. (Fennema, citado por Molina-Paredes 2018).

a. Extracción de proteínas

La extracción es una metodología de propagación de materia fundamentada en la mezcla de uno o varios de los elementos de una disolución (acuosa o que conformen un sólido) en un disolvente. Usa, por ello, la desigualdad de solubilidades de los elementos de la unión en el disolvente añadido (Gomis, citado por Mera-Oyola 2018).

La extracción de proteínas inicia de manera recurrente con un rompimiento celular o lisis. Las metodologías más usadas se fundamentan principalmente en la estandarización de los tejidos y la aniquilación de las fronteras celulares por medio de distintos metodos químicos y/o físicos. Consiguiéndose lo que se designa extracto crudo. Se han evolucionado un amplio espectro de metodologías de lisis celular, que se utilizan a grado de laboratorio que se clasifican como: a) métodos mecánicos físicos: agitación con erosivos, mezcla homogénea a presiones altas o extrusión por compresión; b) métodos no mecánicos físicos: shock osmótico, descongelación, fases de congelación, ultrasonido o secado; c) métodos químicos: tratamiento con bases, disolventes, detersorio, sustancias caotrópicas o ácidos. Después del rompimiento, suelen realizarse continuas etapas de división y purificación de los compuestos celulares. (Universidad Nacional de Quilmes, citado por Mera-Oyola 2018).

En los cereales la extracción de proteínas se efectúa a partir de la extracción con un pH básico, seguidamente de una precipitación isoeléctrica, procedimiento en el que se utiliza la solubilidad de las proteínas la cual es elevada a pH básicos y en menor medida en pH próximos al punto isoeléctrico (pI) (Scopes, citado por Mera-Oyola 2018).
Por lo común, las semillas son descascaradas, molidas, y del pulverizado se elimina la grasa en forma de oleo. Luego, se disuelve en agua adaptando a pH básicos (pH 8 - 11), para estimular la solubilización de las proteínas y dividirlas de los componentes no solubles (Scopes, citado por Mera-Oyola 2018).

h. Factores que influyen en el rendimiento de extracción de proteínas

Los factores que influyen en la extracción de la proteína tales como temperatura de extracción, solventes, pH y, tiempo, razón sólida – acuosa y otros, son escogidos para tener rendimientos ideales y no principalmente elevados. (Mera-Oyola 2018).

- **Solventes de extracción**

  Con frecuencia las proteínas se destruyen por los solventes orgánicos, en especial si se emplean temperaturas normales. Por ello se aconseja que, si se usan en la separación de proteínas, se efectúe a temperaturas bajas. El metanol, alcohol y la acetona son los solventes que se usan mayormente y su garantía debe ser fundamental para los rendimientos que se obtienen, sea el caso si son reactivos de alta calidad o no. Es probable que los solventes causen la precipitación de proteínas disminuyendo la constante dieléctrica y por ello incrementa las interconexiones proteína-proteína (Damián, citado por Mera-Oyola 2018).

  Cuando se adiciona una sal a una proteína en solución sucede un aumento en la solubilidad y esto se define con el nombre de solubilización por salado. Este aumento preliminar en la solubilidad se debe a la solidez de la proteína ocasionada por una disminución con el coeficiente de interacción de los conjuntos ionogénicos. A medida que incrementa la fuerza iónica, da como resultado un pico limite en la solubilidad siguiente de una baja en la misma que se denomina como insolubilización por salado (Damián, citado por Mera-Oyola 2018).

  Las sales de iones divalentes al igual que cloruro de manganeso $MnCl_2$, el sulfato de amonio $(NH_4)2SO_4$, el cloruro de magnesio MgCl2, etc, son bastante más eficaces, así como para la decantación o solubilidad de proteínas que las sales de iones con una sola valencia como cloruro de amonio NH_4Cl, cloruro de potasio KCl o el cloruro de sodio NaCl. La sal mayormente usada es el sulfato de amonio por su elevada solubilidad y el obtener fuerzas iónicas muy altas (Damián, citado por Mera-Oyola 2018).

Para el tema de la soya, se utilizaron una variada diversidad de solventes líquidos para extracción de proteínas del pulverizado desengrasada de soya. Entre estos, el agua más base disuelto (pH 7 – 9) y soluciones liquidas de NaCl (0.5 – 2 M) están entre las que poseen mayor eficiencia para extracción de proteínas. Sin embargo, el uso de bases se ha registrado como uno de los de mayor influencia, ya que admite la obtención de productos con excelentes propiedades funcionales y buen contenido proteínico a precios muy adecuados (Smith y Circle, citado por Mera-Oyola 2018).

- **pH**

La solubilidad de las proteínas está bien relacionada por el pH al que se inician. En función del pH de la muestra, estos polímeros pueden comportarse como aniones o cationes; la aversión electrostática y la hidratación de los residuos saturados fomentan la solubilización de la proteína. Si se figura de manera grafica la solubilidad a partir del pH, la mayor fracción de las proteínas de los alimentos exponen un esquema parecido a una U, en la que el menor compete al pI (punto isoeléctrico). Esto es porque que la mayor parte de las proteínas presenta más aminoácidos ácidos (Ac. glutámico y aspártico) que alcalino (arginina, histidina y lisina) mostrando una solubilidad menor a pH 4–5 (pH isoeléctrico) y mayor a pHs básicos (Badui, Cheftel et al., y Fennema, citado por Mera-Oyola 2018).

Como la mayoría de las proteínas son bien afines a pH básico, la extracción de las proteínas en sus materias vegetales, como la harina de quinua, se ejecutan a estos pHs. Sin embargo, se aconseja realizar la extracción a un pH entre 8.5 – 9.0 (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018), ya que desde pH 9 se patrocinan respuestas como la conformación de uniones covalentes intra o intermoleculares, las de racemización de los aminoácidos y la síntesis de conexiones isopectídicos que convierten a las proteínas de menor digestibilidad; expresándose en la disminución del valor biológico de las proteínas y el índice químico (Linden y Lorient y Badui, citado por Mera-Oyola 2018).

- **Temperatura**

  La temperatura se puede visibilizar como excitación térmica. Una solución proteínica tendrá más o menos excitación según la temperatura. Así una proteína usualmente plegada a 37 °C experimentara una elevada cantidad de golpes provenientes del agua a paso que se incrementa la temperatura, ya que las moléculas de agua se sacudirán mucho más bruscamente destapando a las cargas superficiales y provocando que las reacciones internas (reacciones débiles) de la proteína, carezcan de conservar la configuración al punto que se desnaturaliza plegándose. En el otro extremo, al disminuir la temperatura a unos 10 °C, el agua se sacude en menor medida y la proteína no percibirá una cantidad de golpes idóneos proveniente del agua para alcanzar un nivel de elasticidad acorde a su función. A la par, sus capas de agua se incrementarán y convertirán en más dura y de baja funcionalidad (Rocha, citado por Mera-Oyola 2018).

  A pH y fuerza iónica periódicas, la solubilidad de la mayoría de las proteínas incrementa con la temperatura desde 0 a 40-50 °C, cuando se traspasan estas fronteras, los polímeros reaccionan desnaturalizándose y, algunas veces, a la decantación. A temperaturas superiores de 50 °C, la actividad de las moléculas, a causa del aumento de la energía cinética térmica, es capaz para roturar las conexiones involucrados en la estabilidad de las estructuras terciaria y secundaria (desnaturalización), la exhibición de conjuntos apolares, la decantación y la agregación, es decir, origina una disminución de la solubilidad (Cheftel *et al*. y Fennema; citado por Mera-Oyola 2018).

- **Tiempo de extracción**

  Valores entre 15 minutos a 2 horas son usualmente utilizadas industrialmente. Mayormente, la cantidad de nitrógeno extraído incrementa de manera constante en los primeros 30 minutos alcanzando a un grado uniforme pasado los 45 min. (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018). Sin embargo, la temperatura y el tiempo de extracción están enlazados con otras variables tales como el nivel de excitación, tamaño de partículas y otros. Arango *et al*., citado por Mera-Oyola 2018; indica que al momento en que el

tiempo de extracción aumenta de 20 a 60 minutos dicho aumento, incrementa el contenido de extracción de proteínas en un 9%.

- **Relación materia prima/solvente**

  Pese a que cantidades mayores de extracto podrían proporcionar la total extracción de la proteína, su utilización en la ejecución origina inconvenientes en la ingeniería. Para la producción a escalas mayores, el rango más sugerido está entre 1:10- 1:20 (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018). Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018; sugiere en el campo de industrias realizar una extracción por duplicado con una relación 1:15 y la siguiente con 1:5. Un par de extracciones continuas de 1:10 y 1:5 igualmente son utilizadas. De esta forma, si en el desecho aún hay presencia de proteína, esta se extrae en la siguiente operación.

- **Tamaño de partícula**

  Se ha reportado que el tamaño de partícula de la muestra tiene una respuesta evidente en la eficacia de la extracción. Los tamaños más pequeños implican un aumento en el área de unión entre el pulverizado y el solvente confiriendo una mejor actuación del solvente sobre la materia (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018). Una dimensión de tamiz de 100 o más es preferible para una elevada extracción de proteínas (Malla Nº 100 = abertura de 0.147 mm). Sin embargo, al moler el pulverizado a una dimensión de partícula pequeña puede aumentar o disminuir la solubilidad del nitrógeno con relación al origen del tipo de molienda y el resultante fricción o calor (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018).

- **Agitación**

  El nivel de extracción aumenta con la agitación, aun cuando una agitación mesurada para conservar el pulverizado suspendido de manera libre en la dispersión es precisa para obtener una extracción de mayor eficiencia (Rodríguez, citado por Mera-Oyola 2018).

i. Metodos de análisis

- **Método Kjeldahl para la cuantificación de nitrógeno total**

  Es el mayormente empleado, e inclusive se tiene como antecedente cuando se emplean otros metodos. Esta técnica no hace

discriminación entre el nitrógeno que es original de las proteínas (de grupos amino y amida) y el no proteico (aminoácidos, urea), lo que causa defectos en el cálculo. Esta metodología se sustenta en la digeribilidad de la materia con H_2SO_4 y la creación de NH_4OH que es obtenido en ácido para ser virado con un ácido fuerte de concentración conocida. Los complejos nitrogenados no proteínicos que ocasionan una sobrevaloración del método son: carnitina, glutatión, dopamina, carnosina, ornitina, urea, ácido aminobutírico y colina. Deben emplearse múltiplos para convertir nitrógeno a proteína, que son únicos para las diferentes clases de proteínas. Se operan dividiendo 100 sobre el porcentaje de nitrógeno especifico de la proteína en mención. El factor que se usa sin distinción es 6.25 resultado de una universalización de la cantidad de N de las proteínas de 16%, por lo que su múltiplo de conversión será 100/16 →6.25. No obstante, en temas estrictos debe calcularse el factor para cada proteína. Por ejemplo, para la leche el múltiplo es 6.38, para alguna que otras aceitosas como el ajonjolí es de 5.842 El nitrógeno no proteico puede ser estudiado posterior a la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético, con el inconveniente de que quedarían en el extracto péptidos solubles, siendo un aproximado de 12 a 16 aminoácidos, que quedarían sin detectar. Las contras de esta técnica son las que se mencionan: habría mermas de nitrógeno a causa de la temperatura de digeribilidad y a la clase de catalizador que fue usado. Debe estimarse el nitrógeno no-proteico dimensionado en conjunto con el proteico. La operación es tediosa, larga y se usan reactivos y factores un poco dañinas. (Badui, citado por Molina-Paredes 2018).

- **Método Lowry**

Principio

Respecto al principio de la metodología actualmente conocida de Lowry, para determinar proteínas totales, fue inicialmente postulada por Wu, en 1922, siendo este el método más usado en la cuantificación de proteínas. El principio de esta metodología se refiere en una combinación que contiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico, (reactivo Folin-Ciocalteu), que sufre una disminución cuando reacciona con las proteínas, en existencia de un catalizador

de cobre (II), y resulta en un compuesto con absorción limite en 750 nm (Zaia *et al.* 1998).

Chou y Goldstein, Legler *et al.*, citado por Zaia *et al.* 1998, evaluaron profundamente el mecanismo de disminución del reactivo Folin-Ciocalteu por proteínas, péptidos o aminoácidos. Por ello los autores recomiendan que esta disminución ocurra de primera mano a través de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos (tirosina, triptófano, cisteína, asparagina, e histidina), que colaboran con cuatro electrones, o a través de la rebaja de un par de electrones de cada unidad tetrapeptídica de los péptidos y proteína, que es proporcionada por la formación de quelatos entre el cobre (II) y los péptidos/proteínas.

Aplicaciones

Este método tiene la ventaja principal de su elevada susceptibilidad y, por esto, se ha usado para la cuantificación de concentración de proteínas totales en varios ambientes. Siendo ellos: licores, saliva humana, plasma sanguíneo, plantas, tejido animal, membranas, jugos biliares, productos alimenticios y leche humana (Zaia *et al.* 1998). Sargent, citado por Zaia *et al.* 1998; planteo una variación en el método Lowry que permitió el incremento de la sensibilidad en cincuenta veces. Tal variación estaba fundada en el acontecimiento de que el verde de malaquita interacciona con el azul de molibdato elaborado en el método Lowry y el resultado de esta reacción atrae firmemente en 690 nm incrementando la susceptibilidad de la metodología Lowry.

A causa de su amplio uso, la metodología Lowry ha sido empleada en diversos tipos de equipamientos automatizados.

En evaluaciones, contrastando métodos, ciertos autores sugieren el uso del método propuesto por Lowry para evaluar proteínas totales en licor, tejido animal y tejido vegetal. Los autores Vermes *et al.*, Upreti *et al.*, y Mattoo *et al.*, citado por Zaia *et al.* 1998, de manera general recomiendan el método Lowry, pues en el estudio cotejado de metodologías el mismo mostro mayor sensibilidad, con mejor exactitud, menor gasto de muestra, y dependiendo de la ocasión, menos susceptible a algunos tipos de interferentes.

- **Método de extracción de proteínas referidos a distintas solubilidades**

  Las proteínas que se encuentran en algunos vegetales son de baja insolubilidad en agua a causa de su origen no hidrofílica y a los enlaces disulfuro de las moléculas proteínicas (Lianqing et al., citado por Mera-Oyola 2018), haciendo difícil su extracción a causa de las propiedades metabólicas y la configuración de los tejidos, en especial del paredón celular (Martínez *et al*., citado por Mera-Oyola 2018). Para alcanzar su decantación, las proteínas deben ser libradas de las células vegetales que las incluyen, usando soluciones específicas con relación al soluto. Los solventes fuertemente básicos apoyan al rompimiento de las conexiones de hidrógeno y a disociar el hidrógeno de los conjuntos sulfato carbólico, así el aumento de la carga superficial de las moléculas proteínicas incrementa la solubilidad en agua.

  Son solubles en agua las proteínas en el instante que acogen una configuración globular. La solubilidad es a causa de los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, disponen enlaces débiles (conexiones de hidrógeno) con las moléculas de agua. Por ello, al momento que una proteína se solubiliza finaliza envuelta de una franja de moléculas de agua (franja de solvatación) que imposibilita que se permita enlazar a otros compuestos proteicos lo cual ocasionaría su decantación (insolubilización) (Urrutia, citado por Mera-Oyola 2018).

  La solubilidad de una proteína queda afectada por los factores que se mencionan: su contenido en aminoácidos (una proteína abundante en aminoácidos con polaridad es mayormente más soluble que una abundante en aminoácidos no hidrofílicos); su configuración en tres dimensiones (las proteínas fibrosas son mayormente solubles débiles que las globulares) y el ambiente de la misma proteína (Fennema, citado por Mera-Oyola 2018). Los factores fundamentales afines con el ambiente son los que se mencionan: la constante dieléctrica del medio; la temperatura, del mismo, la fuerza iónica y el pH. Estos factores que son espejo del caso de que las proteínas son electrolitos de peso molecular elevados, pueden usarse para dividir mixturas de proteínas, ya que

cada proteína tiene una configuración en aminoácidos única que establece su conducta como electrolito y propiedades (Urrutia, citado por Mera-Oyola 2018).

i. Extracción básica y precipitación isoeléctrica

Este método se sustenta en la solubilización de las proteínas en un ambiente básico; la solución se depura y se separa en fases para desechar los polisacáridos no solubles (incluyendo: fibra). La proteína solubilizada se decanta en su punto isoeléctrico donde se excluye las sales y carbohidratos solubles. Obteniéndose un aislado no menor del 90 % de proteína (Fennema, citado por Mera-Oyola 2018).

ii. Solubilizacion y precipitación por salado de las proteínas

Las sales neutras ejecutan resultados significativos sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A concentraciones bajas, las sales aumentan la solubilidad de varias proteínas, rareza que se denomina, solubilización por salado. Las sales de iones de doble valencia, así como el $MgCl_2$ y el $(NH_4)2SO_4$, tienen una mayor efectividad en la solubilización de las proteínas que las sales de iones con una sola valencia tales como el NaCl, KCl y NH_4Cl. La manera en que las sales neutras influyen en la solubilidad de las proteínas está en relación a su poder iónico que compone una dimensión para la concentración como para el número de las cargas eléctricas preexistentes en los cationes y aniones dados por la sal. La reacción de la solubilidad por salado está dada por variaciones de predisposición a la ionización de los grupos -R disociables de la proteína (Nelson y Cox, citado por Mera-Oyola 2018).

Por otro lado, a momentos que incrementa la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína empieza a bajar, a un poder iónico ampliamente mayor, una proteína puede ser cuasi totalmente decantada de su disolución, efecto denominado insolubilización por salado. El fundamento fisicoquímico de la insolubilización por salado es bien complicado; una de las variables que convergen en esa, es que la cantidad alta de la sal ocasiona supresión del agua de hidratación de las moléculas de proteicas disminuyendo la solubilidad (Nelson y Cox, citado por Mera-Oyola 2018).

iii. Fraccionamiento con disolventes

La agregación de disolventes de origen orgánico neutros mezclables con el agua, específicamente etanol y acetona, reduce la solubilidad de gran parte de las proteínas globulares en el agua, de tal modo que caen en forma de precipitado, de su disolución. El análisis de cantidad de esta relación demuestra que la solubilidad proteica a un pH y fuerza iónica específicos está en relación de las invariables dieléctricas del ambiente. Ya que el alcohol etílico presenta una constante dieléctrica inferior a la del agua, su agregación a una disolución liquida de proteína aumenta el poder de acercamiento entre las cargas contrarias, reduciendo de esta forma el nivel de ionización de los conjuntos -R de la proteína. Como consecuencia las moléculas de proteicas son propensas a desnaturalizarse y caen en forma de precipitado. Las combinaciones de proteínas pueden desunirse fundamentándose en las desigualdades de cantidad de su solubilidad en combinaciones a baja temperatura de agua - acetona y de agua - etanol. Un inconveniente de esta técnica es que al permitir estos solventes alterar a las proteínas a temperaturas altas, las temperaturas de ejecución deben permanecer frías (Nelson y Cox, citado por Mera-Oyola 2018).

2.2.4. Polifenoles

Según el CONACYT, citado por Yanzapanta-Llambo 2014; los componentes fenólicos o polifenoles conforman uno de los grupos de mayor numero y extensamente distribuidos de compuestos en el reino plantae, superando las 8.000 configuraciones fenólicas reconocidas actualmente. Los polifenoles están principalmente subclasificados en taninos hidrolizables, que serán ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como taninos condensados, la lignina y flavonoides. Son mezclas bio-sintetizadas por las plantas (hojas, tallos, frutos, etc.). La única particularidad en configuración de los polifenoles es de tener uno o varios grupos oxidrilo (-OH) enlazados a uno o varios aros bencénicos.

No obstante, son principalmente reconocidos por sus características antioxidantes, la mayoría de los polifenoles demuestra, asimismo, de distintas funciones biológicas probablemente de gran beneficio para el organismo. Los polifenoles, que regularmente poseen gran cantidad de la actividad antioxidante

de las verduras y frutas, se dividen en no flavonoides y flavonoides y estos regularmente son clasificados en taninos hidrolizables que son ésteres del Ácido Gálico de glucosa y otros azucares, fenilpropanoides como taninos condensados, la lignina y flavonoles (Cofré-Martínez 2015).

a. Método de cuantificación de polifenoles totales

La metodología inicial de Folin-Ciocalteu (F-C) se creó en el año 1927 desde los reactivos químicos usados para la investigación de tirosina, en donde la oxidación de los fenoles, a través de un agente de molibdotungstato, resultando un compuesto coloreado (Prior *et al.*, citado por Valenzuela-Bustamante 2015).

Varios años siguientes, Singleton y Rossi (1965) perfeccionaron el análisis y lo ampliaron al ensayo del contenido de fenoles totales en vino; a partir de entonces el método ha descubierto variadas aplicaciones (Huang *et al.*, citado por Valenzuela-Bustamante 2015).

2.2.5. Actividad antioxidante

a. Definición de antioxidante

Un antioxidante dietético es un elemento que se incluye en las comidas de ingesta diaria y que puede prever los efectos contrarios de categorías reactivas sobre las funcionalidades vitales comunes de los humanos (Patthamakanokporn *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

Las propiedades antioxidantes no sólo deben analizarse por sus correlaciones biológico-químicas, sino también por su labor en el detrimento oxidativo que atañe a los productos alimenticios (Pastene, citado por Coronado *et al.* 2015). Se emplean en la industria de alimentos adicionados a las grasas u otros alimentos para retardar las operaciones de oxidación, en tanto detienen el inicio de la rancidez oxidativa (grasas) (Llancari y Matos, citado por Coronado *et al.* 2015).

b. Proceso de oxidación y los agentes promotores

Agregado a la labor antioxidante se denomina a la operación de óxido-reducción que reparte a un par de ocasiones fundamentales: a) oxidación que involucra disminución de electrones de hidrógeno con la obtención de oxígeno en la molécula, b) disminución que representa la obtención de electrones de hidrógeno con la falta de oxígeno. Así el oxidante se minimiza al momento que interacciona con esa molécula que oxida. Este desarrollo es diario en el organismo humano y simboliza el nombrado balance redóx o par óxido-reductor (Quintanar y Calderón, citado por Coronado *et al.* 2015).

Es necesario poner en claro que por momentos el concepto oxidación únicamente se refiere a algunas sustancias apartadas (oxidación de grasa), pero no hay un entendimiento especial de que esta definición (oxidación) se apunta a operaciones celulares interiores que implican el génesis de enfermedades. Es por ello que, no sólo hay que evaluar los procesos de resguardo del organismo, sino igualmente las especies relacionadas, así como los radicales libres que se estudian en párrafos más abajo (Coronado *et al.* 2015).

c. Radicales libres, producción y acción

Un radical libre es esa configuración química que posee en su organización uno o varios electrones sin aparear. Es elevadamente reactiva y fundamental para dar origen a otros radicales libres en fila, (Núñez, citado por Coronado *et al.* 2015), asimismo por la vida promedio que es de microsegundos, acontece una veloz transferencia con moléculas cercanas y de gran deterioro potencial. En efecto un radical libre puede infringir 1 millón de moléculas en el transcurso de la reacción en cadena (Zamora, citado por Coronado *et al.* 2015). Los agregados en mención conforman un grupo de las denominadas ROS (Reactive Oxigen Species) o especies reactivas del oxígeno (ERO) (Núñez, citado por Coronado *et al.* 2015).

Los radicales libres se desprenden en el transcurso de la biotransformación del cuerpo, y de igual forma se originan por polución ambiental, (de suelos atmosféricos, acuáticos), radiaciones (gamma, hertziana, ultravioleta), entre otros. Se pueden enlazar con la ingesta o empleo de sustancias

tóxicas como el etanol, drogas y tabaco o también a una nutrición no estandarizada, exhibición a pesticidas o fertilizantes. Se incorpora además la biotransformación de algunos químicos y a gran cantidad de estrés físico o psíquico (Llancari y Matos, citado por Coronado *et al.* 2015).

La figura 5 explica la interrelación entre antioxidante y radical libre.

d. Estrés oxidativo

No hay que comparar este trabajo celular con el estrés diario a causa de los problemas que afronta el organismo vivo en su vida cotidiana (familia, trámites, trabajo, entre otras). El estrés oxidativo es un concepto relacionado a las células y a la actuación de un radical libre que le malogra, (Reyes *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) es por ello que en factores comunes se da una igualdad entre la elaboración de radicales libres y otras clases reactivas con los procesos antioxidantes (exógeno y endógeno).

Esta simetría da paso a que la toxicidad por oxidación sea inferior y con reducido detrimento celular. Cuando se acaba la igualdad, éste se podrá referenciar con una baja en el proceso antioxidante o por la propagación desmedida de los radicales libres (Quintanar y Calderón, citado por Coronado *et al.* 2015).

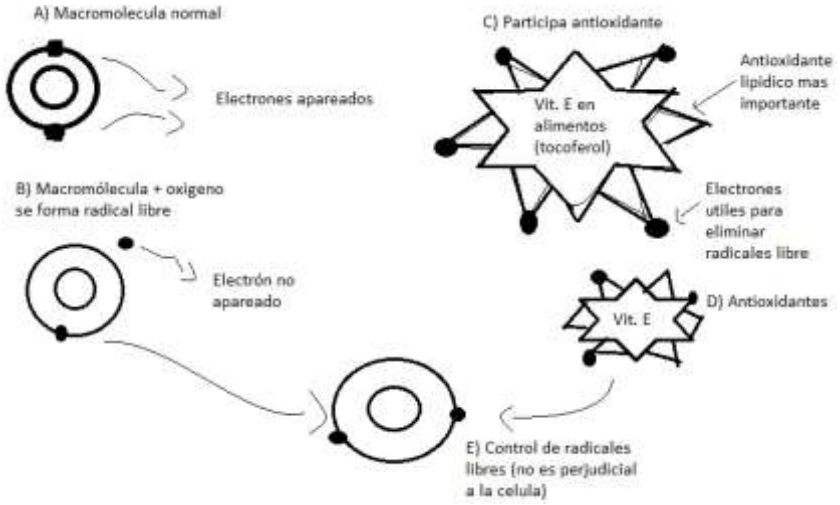


Figura 5. Interacción entre radicales libres y antioxidantes.

Fuente: Tomado de Coronado *et al.* 2015:207.

e. Control biológico de los procesos de óxido-reducción

Se tienen dos líneas principales para preservar al organismo de los radicales libres; no enzimáticos y enzimáticos (exógenos y endógenos) y su interconexión puede ser dentro de la célula o fuera de ella (Zamora, citado por Coronado *et al.* 2015). El medio endógena demanda soporte exterior y por ende se sugiere los antioxidantes exógenos cuya función es importante dado que son los que pueden integrar parte de la ingesta cotidiana, como los mencionados en líneas posteriores.

f. Perspectiva de la relación antioxidantes-envejecimiento humano

Las teorías de la senectud apuntan, por un lado, la planificación de genes con una réplica predispuesta de cada organismo y por otra un sistema no genético que comprende al estrés oxidativo libres o los radicales (Céspedes *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

A partir de 1956 Denham Harman de la Nebraska University, propuso la conexión entre radicales libres y senescencia. Se apunta a que la posibilidad de vida humana sería capaz de incrementar al reducirse los efectos de la operación oxidante. Así las categorías que tienen reacción del oxígeno, entre otros, los radicales libres, pueden adulterar la capa interior o el ADN mitocondrial lo que origina más elaboración de ERO, por consiguiente, más deterioro e incremento del estrés oxidativo, al originarse más oxidantes y degenerarse el balance pretendido por la célula. Se refiere que el genoma mitocondrial es delicado a la agresión de los radicales libres que la propia mitocondria genera. En este aspecto la intervención mitocondrial, y la existencia de estrés oxidativo pueden relacionarse con la patogenia que conlleva a la aniquilación celular característica de la senectud (Céspedes *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

A lo largo del envejecimiento también se reduce la garantía antioxidante y puede originar más arremetida a las moléculas blanco. En cambio, ciertas moléculas como lípidos, proteínas o carbohidratos pueden poseer un efecto especifico (Coronado *et al.* 2015). En el caso de los lípidos, a lo largo de la peroxidación se crea malondialdehido, el cual interacciona con grasas y proteínas produciendo las llamadas bases de Schiff conjugadas, que en conclusión unen al elaborado fluorescente no soluble que se acapara en los

tejidos (lipofucsina) y que se recibe como dato de envejecimiento (Zorrilla, citado por Coronado *et al.* 2015).

Por otro lado, la bibliografía (Zorrilla, citado por Coronado *et al.* 2015) apunta a que la macrobiosis se cree que incrementa en relación con las cantidades de antioxidantes en la ingesta y con una disminución de calorías; lo que puede originar una baja eliminación de las mitocondrias, del metabolismo celular y del gasto de oxígeno. Asimismo, una exposición de constante estrés oxidativo a lo largo de la senectud puede afectar el sistema inmunológico. Se ha examinado un descenso de antioxidantes (como el glutatión) a lo largo del proceso regular de senescencia, ante todo en la sangre y ciertos órganos, en animales como en humanos. Estas variaciones degenerativas del proceso inmune podrían contribuir a dar origen de cataratas, principios de Parkinson, Alzheimer o fallas cardiacas. Por ello un buen proceso inmune se afilia con buena salud y larga vida (De la Fuente, citado por Coronado *et al.* 2015).

Para sustentar la interacción vejez-antioxidante Cesari *et al.,* citado por Coronado *et al.* 2015; elaboraron un análisis en individuos ancianos (mayores a 75.3 años) con el estudio de la fuerza motriz y la capacidad física (poder de elongación de la rodilla, velocidad al trotar, equilibrio y capacidad para ponerse de pie). Se calificó el consumo diario de antioxidantes y la cantidad plasmática de éstos con las ratios de capacidad física detallados anteriormente. Se calculó el consumo de alimentos con especial preocupación a la ingesta de vitamina E, vitamina C, retinol y p-caroteno. Entre otros se identificó una relación de significancia entre el consumo cotidiano de p-caroteno y vitamina C y el poder de elongación de rodilla en los individuos testeados.

Es de gran importancia especificar que la vejez no afecta de la misma forma a todas las personas y en ocasiones la edad biológica y cronológica no concuerdan, parte de allí la importancia de más investigaciones cuantitativas con grupos diferentes.

g. Fuentes exógenos de antioxidantes

Entre los antioxidantes hay diversos grupos de componentes activos como los fitoestrógenos y los polifenoles. Entre los destacados se mencionan a

los taninos y los flavonoides, extensamente investigados. Entre los flavonoides (Escamilla *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) se podrían mencionar sólo como antesala las catequinas (té negro y verde), antocianidinas (rojo-azulado de las fresas), isoflavonoides (daidzaína y genisteína encontrados en soya y sus subproductos), citroflavonoides (naranjina, que le confiere sabor agrio al limón, toronja, naranja). Protoantocianidinas en vino tinto y semillas de uva.

Las cantidades regulares de consumo de flavonoides serian de 20 - 26 mg / días obtenidos de verduras y frutas (uvas, guayabas, naranjas, manzanas). No obstante, hay que advertir sobre la ingesta excesiva que pueden presentar productos comerciales de antioxidantes y combinaciones de hierbas que no se preparan en miligramos sino en gramos (como lo sugerido) conllevando a episodios de intoxicación (Escamilla *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

Otra clase de antioxidantes son los polifenoles (taninos) encontrados en el vino, con su peculiaridad de astringencia. No sólo son de gran utilidad a la industria de alimentos así mismo en la de productos de belleza (Reyes *at al.,* citado por Coronado *et al.* 2015).

Con relación a los fitoestrógenos (lignanos, flavonoides, isoflavonas) están presentes únicamente en las proteínas de la soya o subproductos. Su uso más resaltante se integra con el tratamiento de sustitución de hormonas para femeninas con diagnóstico de climaterio y osteoporosis en la menopausia (Drago *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015). Los componentes resaltantes son la daidzeína y que de igual forma se biotransforman en gran cantidad, en el epicarpio de semillas de centeno y linaza.

De los elaborados con antioxidantes, muy ingeridos, se tiene a los que contienen: vitamina C: frutas secas, todos los cítricos (mandarina, limón, naranja), acelgas, también guayaba, mango, fresa; con vitamina E: tomates (licopeno), aceite de oliva, arroz integral, palta; con p-caroteno: espinacas, zanahoria, melón, kiwi; con flavonoides: peras, té verde, vino, o manzana. Asimismo, existen antioxidantes en la cebolla, ajo, avena, sauco (gripa), ginseng, ginko, verdolagas, jamaica, chaya, menta, albaca (Yucatán), betabel, calabacita y hierbabuena (Reyes *et al.*, citado por Coronado *et al.*

2015). El tomate de árbol posee un contenido regular de antioxidantes y el noni un contenido elevado (Muñoz *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

Han sido analizados extensamente frutos rojizos como el arándano (Cunningham *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) de distintas especies botánicas y se ha cuantificado la cantidad de antioxidantes (proantocinidinas) por porción del arándano americano: seco edulcorado: 32 mg / 40 g; puré de arándano entero: 24 mg / 70 g; coctel de zumo: 30 mg / 240 mg. Estas cantidades de antioxidantes es factible reforzarlos en algunos frutos rojizos (fresa) con el cruzamiento de nuevos genes que resulten más eficientes. Las investigaciones mencionan (Capocasa *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) que la actividad antioxidante esta alterada por la clase del fruto, la familia y la especie y si los frutos rojizos (fresa) tienen de 2 a 11 veces mayores antioxidantes (polifenoles, antocianinas y flavonoides) que el kiwi o la manzana; el reforzar las especies es una misión vanguardista.

Un hecho de dieta es acordarse que los compuestos fenólicos poseen extensa paridad por las proteínas (Ramírez *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) por lo que su capacidad antioxidante puede tener un bajo rendimiento in vivo, y se advierte sobre el consumo de los frutos rojizos (arándano, fresa) en conjunto con lácteos, el cual puede perturbar la eficacia antioxidante de estos. Otro hecho, es la bioreserva, que involucra el total de nutrientes que se consumen, biosintetizan y se absorben, por ello la cantidad total de antioxidantes de una comida es de gran importancia, pero su bioreserva más, entretanto no los más numerosos son los más eficaces en el cuerpo humano, sea por asimilación intestinal deficiente, por un elevado proceso biosintético, o excreta veloz (Quiñonez *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

Un comestible con antioxidante de elevada ingesta es la *Psidium guajava L.* (guayaba*)* que posee polifenoles, vitaminas C y A. Al evaluarse el fruto fresco, el epicarpio, la pulpa y todo el casco (la capa externa) se percata una elevada cantidad de polifenoles (base húmeda) en el epicarpio del fruto y después en la pulpa y la capa externa (Palomino *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015). En efecto, la piel de las frutas tiene una gran cantidad de capacidad antioxidante que la pulpa, asimismo el cocimiento hace que se reduzca esta actividad y disminuya la concentración de polifenoles

(Marquina *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015). Otro origen de antioxidantes (flavononas, procianidinas y antocianinas) es el cacao y sus derivados (cocoa, chocolate amargo, licor de cacao) abundantes en catequinas, (15-20 % p / p) (Perea *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

Perea *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015; dieron cuenta que el chocolate negro posee elevadas cantidades de polifenoles mientras que el chocolate común con canela, clavo y azúcar tiene una contribución media y la cocoa con grasa vegetal posee cantidades menores. Se podría atender que, en comparación con otros productos alimenticios, los polifenoles de cacao y subproductos se posicionan en esta cadena: vino tinto → cacao → té verde → manzana → pera → kiwi.

En México se ha evaluado la actividad antioxidante de la tuna no sólo para crear alimentos funcionales, por el contrario, se usó para la cosmetología o fármacos (Sumaya *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015). Este fruto presenta componentes activos como vitamina E, vitamina C y polifenoles. Las características físicas, químicas y biológicas (variedad, poscosecha y precosecha, estado de madurez) contribuyen en la proporción de nutrimentos encontrados. La tuna púrpura tiene una baja actividad antioxidante que las amarillas o verdes, y en bajas cantidades, en las blancas. Han sido estudiados distintas especies de maíz mexicano con antioxidantes los que forman parte de la ingesta local (maíz pigmentado). Las evaluaciones (López y García, citado por Coronado *et al.*, 2015) refieren que la cantidad de compuestos fenólicos va de acuerdo con las distintas especies de maíz, no obstante, éstos se presenten con idéntica coloración.

En México el tomate (*Solanum lycopersicum*) es de ingesta cotidiana, abundante en flavonoides, vitamina E, licopeno, vitamina C, ácido fólico, β-caroteno y potasio por lo que representa una excelente fuente de antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo. Inclusive una alimentación que integre subproductos procesados de tomate (ricos en licopeno) como pastas, jugos o salsas podrían reducir la oxidación de LDL colesterol y la peroxidación lipídica (Palomo *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015). Un hecho crucial indica que el jugo de tomate guardado por un año podría conservar su contenido de antioxidantes a causa de la estabilidad de los flavonoides totales, licopeno y compuestos fenólicos. Así

la elaboración no destruye la actividad biológica e incrementa la biodisponibilidad del licopeno.

En plantas medicinales, se han efectuado análisis acerca del contenido de polifenoles y la actividad antioxidante. Se puede indicar que la Passiflora (Carvajal *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015) se integra con beneficios farmacológicos (antiespasmódicas o sedativas, antibacteriales). En distintas ciudades se utiliza en afecciones de espasmos, epilepsia, insomnio o ansiedad. Su actividad antioxidante es elevada en las hojas que en los frutos.

Por último, se advierte sobre la ingesta de verduras o frutas troceadas que se ofertan en distintos centros de abastos (supermercados, puestos en la calle, cafeterías), porque el cortado y pelado aumenta el proceso metabólico del producto, afectando los compuestos fitoquímicos que se encuentran y esto termina afectando a la actividad antioxidante. Es por ello que el pardeamiento del tejido, a consecuencia de la destrucción de fenoles (oxidación por la polifenoloxidasa) no sólo produce cambios en el aspecto del alimento, sino que a su vez reduce la capacidad antioxidante (Robles *et al.*, citado por Coronado *et al.* 2015).

h. Metodos para determinar actividad antioxidante

La actividad antioxidante puede ser evaluada por distintas metodologías, entre los que se menciona:

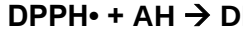
1. Método ABTS

El método ABTS (denominado así por el reactivo 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)). Trata en la producción del radical ABTS•+, por la interacción entre el persulfato de potasio y el ABTS para originar un cromóforo azul verdoso con absorciones límites a 415, 645, 734 y 815 nm de longitudes de onda. En delante de antioxidantes se origina una reducción de la absorbancia del radical ABTS•+; los productos suelen ser presentados como µmol Trolox / g muestra. Esta técnica se puede utilizar en una extensa ratio de pH y se emplea para sistemas tanto líquidos como naturales (Restrepo-Sánchez *et al.* 2009)

Técnica de descoloración con el radical catiónico ABTS•+. Este método se cimienta en el cálculo del cambio de color del radical ABTS, a causa de la reacción con especies dadoras de electrones o de hidrógeno. El radical de cationes ABTS es un cromóforo que se absorbe a 415 ó 734 nm de longitud de onda y se origina por una respuesta de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin -6- sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. Las medidas se trabajan a 734 nm de longitud de onda (Re *et al.*, citado por Rojano *et al.* 2008).

2. Método DPPH

Esta técnica, creada por Brand-Willams, citado por Kuskoski *et al.* (2005); tiene base en la disminución de la absorbancia evaluada a 515 nm del radical DPPH•+, por antioxidantes. El DPPH•+ es un radical no cambiante de tono violeta, cuya absorbancia decae al ser minimizado por un antioxidante (AH) (Rojano *et al.* 2008):



$$\mathbf{DPPH\bullet + AH \rightarrow DPPH - H + A\bullet}$$

El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre permanente que denota un color púrpura en medio alcohólico. Cuando hay dadores de un protón o un electrón por un compuesto con actividad antioxidante esta coloración se pierde (Naranjo *et al.* 2011).

3. Método FRAC

Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power). Esta técnica estudia la actividad antioxidante de una muestra en concordancia a su efectividad para reducir el Fe^{+3} que se encuentra en un compuesto con la 2, 4,6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta su figura ferrosa (Fe^{+2}), que denota un límite de absorbancia de entre 590 - 595 nm de longitud de onda (Benzie y Strain, citado por Rojano *et al.* 2008).

La técnica FRAP se fundamenta en la producción de un compuesto férrico con el reactivo TPTZ, el cual en existencia de antioxidantes origina un compuesto azul de absorción limite a 593 nm de longitud de onda; las unidades se pueden formular como µmol Fe (II) / g o como µmol Trolox / g (Restrepo-Sánchez *et al.* 2009).

2.2.6. Diseño Media Fracción

En la primera fase de un estudio, el investigador posee una responsabilidad con una gran lista de variables que podrían tener efecto en la operación. Como ejemplo, en una operación química típica, de manera muy sencilla podemos identificar las variables que poseen un mayor impacto sobre el contenido de una operación, así mismo la temperatura a la que será realizada, el contenido de acelerador adicional, la máxima velocidad, entre otros. Debido a que es complicado analizar muchos factores a detalle de manera simultánea, este diseño de investigación puede usarse para expresar eficazmente cuales variables poseen una mayor representatividad sobre una operación determinada. El diseño Media Fracción sirve para identificar los factores más influyentes, es un subconjunto de los tratamientos de un diseño factorial completo, dondequiera de ambas partes de un 2^k completo, un cuarto de las corridas, un octavo de las corridas, o alguna otra fracción regular. La cantidad de tratamientos en el diseño es igual a 2^{k-p}, donde p = 1 para una media fracción, p = 2 para un cuarto de fracción, p = 3 para un octavo de fracción, etc (STATGRAPHICS 2006).

2.2.7. Diseño Factor Categórico Único

Este modelo es el más simple del diseño de experimentos, en el cual las variables de respuesta dependen de la influencia de un factor único, de manera que el resto de las causas de variación se engloba en el error experimental (Marín 2014). Es un diseño experimental creado para ocasiones donde el interés principal se concentra en la paridad de niveles de un simple factor categórico (STATGRAPHICS 2006).

2.3. Definición de términos

2.3.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la aptitud de un compuesto para impedir la lisis oxidativa (por mencionar, la peroxidación lipídica), de tal forma que un antioxidante funciona, fundamentalmente, gracias a su eficacia para actuar con radicales libres y, por ello, se le da la denominación de antioxidante finalizador de cadena (Londoño-Londoño 2012).

2.3.2. Compuestos fenólicos

Los polifenoles o componentes fenólicos, son elementos que tienen un aro aromático, enlazados a uno o varios conjuntos oxidrilo, incorporando subproductos funcionales (glucósidos, esteres, etc.), presentes en su mayoría en plantas y se interponen con el proceso de oxidación al interaccionar con radicales libres, atrapan el oxígeno y quelan metales catalíticos; se clasifican en dos grupos: no flavonoides y flavonoides (Macheix *et al.* y Cedillo, citado por Gonzales-Jiménez 2010).

2.3.3. Compuestas bioactivos

Los compuestos bioactivos son elementos extranutricionales presentes en bajas cantidades en algunos alimentos. En su mayoría son metabolitos secundarios generalmente relacionados al sistema de defensa de las plantas contra el estrés biótico y abiótico (Manach *et al.*, citado por De Souza 2014).

2.3.4. Extracción simultanea

Proceso paso a paso para la identificación y cuantificación de diferentes analitos a investigar, haciendo que en el proceso no se registre perdidas sin sentido.

2.3.5. Semilla

En la botánica, una semilla es un óvulo maduro que está dentro del fruto u ovario maduro; está conformado por tres elementos básicos que son: la testa o cubierta de la semilla, el embrión y los tejidos de reserva. Bidwel, citado por Domínguez-Gonzáles (2008); menciona que la semilla es una formación en descanso. Por lo general se encuentra muy deshidratada, conformada generalmente por tejidos de reserva y contorneada por una capa principalmente impermeable (Domínguez-Gonzáles 2008).

2.3.6. Precipitación isoeléctrica

Consiste en la extracción de las proteínas en un rango de pH de 8 a 11, seguida de una precipitación de las principales fracciones proteicas en el punto

isoeléctrico (pH 4.5 a 5). (Salcedo-Chavez *et al.*, citado por Cruz-Solórzano *et al.* 2013).

2.3.7. Punto isoeléctrico

Las proteínas en general tienen una menor solubilidad en relación a su pH isoeléctrico, que es el pH en donde la proteína no presenta carga eléctrica. En estas situaciones, no presenta aversión electrostática entre moléculas proteicas colindantes y son propensas a precipitar y coalescer. Toda proteína presenta una pI (punto Isoeléctrico) y este varía de entre 1.5 hasta 11.0 (Grajales, citado por Grefa-Andi 2017).

2.3.8. Cribado

Estos son evaluaciones en las cuales se integran muchos factores con el fin de determinar los que presentan efectos significativos, de haberlos. Estas evaluaciones, suelen ejecutarse en las fases iniciales de un proyecto, cuando es posible que varios de los factores iniciales considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se designan como importantes se estudian a más detalle en experimentos posteriores (Martínez-Pérez 2014).

2.3.9. Optimización

La optimización del método se efectuar a través del diseño de experimentos, que significa en planificar un experimento para tener datos adecuados, que puedan ser estudiados estadísticamente, con el objetivo de tener conclusiones válidas (Martínez-Pérez 2014).

2.3.10. IC50

Según Gaviria *et al.* (2007), es la concentración inhibitoria del 50 % del reactivo inicial. Se establece mediante un estudio de regresión del porcentaje sobrante versus la concentración requerida de los extractos para inhibir el 50 % del radical (Villanueva-Tiburcio *et al.* 2010).

III. MÉTODOS

3.1. Ubicación y descripción del área de estudio

La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Procesos Agroindustriales (Ex laboratorio de Control de Calidad de Aguas), y Laboratorio de Química de la Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia, que se encuentra ubicada en la carretera San José km. 0.5, distrito Yarinacocha; provincia Coronel Portillo; departamento Ucayali; que cuenta con la disponibilidad de los equipos necesarios para las pruebas correspondientes.

3.2. Identificación y descripción del material experimental

El material biológico que se utilizó son los frutos del camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), que fueron recolectados en el populoso sector de Pucallpillo distrito de Manantay, cuya zona es inundable, en los meses de marzo y agosto del 2019 (Figura 6). Fueron acondicionados de modo que se utilizaron las semillas como materia prima del material experimental para realizar las diferentes pruebas y análisis.

Figura 6. Imágenes del Google Maps, sobre el distrito de Manantay-Pucallpillo

Fuente: Tomado de Google Maps 2014.

3.2.1. Identificación y descripción de la unidad experimental

a. Georreferenciación

Para esto se utilizó la plataforma interactiva de *Google Maps*, ya que esta nos ofrece una vista referencial muy clara de la ubicación principal de donde fueron tomadas las muestras (camu-camu) en el distrito de Manantay, como

se pudo notar en la figura 6, así mismo se usó datos del GPS, para que la exactitud sea considerable poniendo a disposición para su futura ubicación, estos datos se presentan en la figura 7.

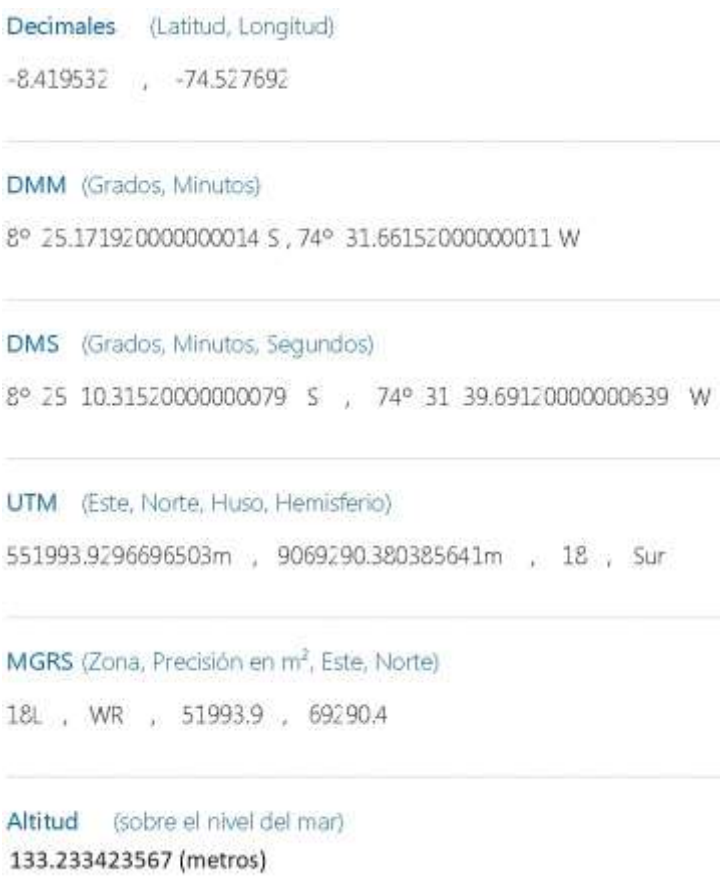


Figura 7. Datos obtenidos del GPS

Fuente: Tomado de Pixelis Maps s.f.

b. Tipo de muestreo

El tipo de muestreo es intencional no probabilístico, para los fines que la investigación requiera; siendo la cantidad de muestra 50 kg de fruta.

3.3. Procedimientos

Los procedimientos (métodos de análisis) que se emplearon en la ejecución de la investigación, son los siguientes:

3.3.1. Caracterización fisicoquímica de la semilla de camu-camu

a. Determinación del contenido de humedad (AOAC 2005) (950.46)

4. Se secó el plato y la tapa vacía de la placa Petri en el horno a 105 °C por tres horas y se transfirió al desecador para que se enfrié y se evite absorber humedad. Se pesó el plato y la tapa vacíos.
5. Se pesó tres gramos de muestra al plato. Esparcir la muestra de manera uniforme.
6. Se colocó el plato con la muestra en el horno, por un tiempo de tres horas a 105 °C.
7. Se transfirió el plato, parcialmente tapada, al desecador, y se pesó el plato con la muestra seca.
8. Para el cálculo del contenido de humedad se utilizó la siguiente formula:

$$Contenido\ de\ humedad\ (\%) = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

Donde W_1 = Peso inicial de la muestra
W_2 = Peso final de la muestra

b. Determinación de proteína total (N x 6.25) (AOAC 2005) (984.13)

- Se colocó la muestra (0.5 – 1 g) en un matraz digestor.
- Se agregó cinco gramos del catalizador Kjeldahl y 200 mL de solución concentrada de H_2SO_4.
- Se preparó un tubo conteniendo los reactivos anteriores excepto la muestra como blanco. Se colocó el matraz de forma inclinada y se calentó la unidad a fuego lento hasta que la espuma cese. Luego se puso a ebullición enérgicamente hasta que la solución se aclare.
- Se esperó a que enfriase y agregó 60 mL de agua destilada de manera cautelosa.
- Inmediatamente se conectó el matraz al bulbo de digestión sobre el condensador y la punta de esta debe estar sumergida en acido estándar, y se adicionó 5 – 7 gotas de indicador de mezcla en el receptor. Se hizo

girar el matraz para mezclar bien el contenido; luego se calentó hasta que el NH_3 este destilado.

- Se removió el receptor, lavó la punta del condensador y valoró el exceso del ácido estándar destilado con una solución de NaOH al 40 %.
- Para el cálculo de la proteína total se utilizó la siguiente formula:

$$Proteina\ total\ (\%) = \frac{(A - B) \times N \times 14.007 \times 6.25}{W}$$

DONDE: A = Volumen (mL) de HCl 0.2 N usado en la valoración de la muestra.

B = Volumen (mL) de HCl 0.2 N usado en la valoración del blanco.

N = Normalidad del HCl

W = Peso (g) de la muestra

14.007 =Peso atómico del nitrógeno

6.25 = Factor de conversión de nitrógeno – proteína.

c. Determinación del contenido de grasas (AOAC 2005) (2003.05)

- Se colocó la botella y tapa en la incubadora a 105 °C por toda la noche asegurando que el peso de la botella sea estable.
- Se pesó de 3 – 5 g de muestra en papel filtro y se envolvió.
- Se tomó la muestra al dedal de extracción y se transfirió al Soxhlet.
- Se llenó con éter de petróleo (250 mL) a la botella y se llevó al manto calefactor.
- Se conectó el equipo de Soxhlet y se activó el pase del agua para enfriarlo y luego se encendió la manta calefactora.
- Se calentó la muestra cerca de 14 horas (tasa de calor de 150 gotas/minuto).
- Se evaporó el solvente por medio del condensador al vacío.
- Se incubó la botella a 80 – 90 °C hasta que el solvente este completamente evaporado y la botella este completamente seca.
- Después del secado, se transfirió la botella parcialmente cubierta con la tapa al desecador para que se enfrié. Se volvió a pesar la botella y su contenido seco.
- Para el cálculo del porcentaje de grasa, se usó la siguiente formula:

$$Contenido\ de\ grasa\ (\%) = \frac{Peso\ de\ contenido\ de\ grasa}{Peso\ de\ la\ muesta} \times 100$$

d. Determinación del contenido de fibra cruda (AOAC 2005) (962.09)

- Se pesó aproximadamente de 2 a 3 gramos de la muestra desgrasada y seca. Se puso en el matraz y agregó 200 mL de la solución de H_2SO_4 a 0.255 N en ebullición.
- Se fijó el condensador y llevó a ebullición por sesenta segundos; de ser necesario adiciónele antiespumante. Se dejó a ebullición por 30 minutos exactos, a volumen constante con agua destilada y agitando por momentos el matraz para quitar las partículas pegadas a las paredes.
- Se colocó el embudo Buchner con papel filtro y precalentó con agua a ebullición. Al mismo tiempo y al finalizar el tiempo de ebullición, se extrajo el matraz, dejándolo descansar por 60 segundos y se filtró de manera cuidadosa utilizando succión; el filtrado se debe efectuar en 10 minutos o menos. Se enjuagó el papel filtro con agua en ebullición.
- Se traspasó el desecho al matraz con apoyo de una pizeta que contenía 200 mL de solución de NaOH 0.313 N hirviendo y se dejó a ebullición por 30 min como en el paso 2.
- El crisol de filtración se precalentó con agua hirviendo y filtró de manera cuidadosa después de dejar descansar el hidrolizado por 60 segundos.
- Se enjuagó el desecho con agua hirviendo, con la solución de HCI al 1 % (v/v) y de nuevo con agua en ebullición, para finalizar con tres enjuagadas con éter de petróleo. Se fijó el crisol en el horno a 105°C por 12 horas y ambiento en desecador.
- Se pesó de enseguida los crisoles con los desechos (no los manipule) y se colocó en la mufla a 550°C por 3 horas, se dejó ambientar en un desecador y se pesó de nuevo.
- Para el cálculo del contenido de fibra cruda, se usó la siguiente formula:

$$Fibra\ cruda\ (\%) = \frac{A - B}{C} \times 100$$

DONDE: A = Peso del crisol con el residuo seco (g)
B = Peso del crisol con la ceniza (g)
C = Peso de la muestra (g)

e. Determinación del contenido de ceniza (AOAC 2005) (942.05)

- En un crisol de porcelana anteriormente calcinado que se condujo a peso constante, se colocó de 2.5 a 5 g de muestra seca.
- Se colocó el crisol en una mufla y quemó a 550°C por 12 horas, dejando ambientar y pasándolo a un desecador.

- De manera cuidadosa se pesó por segunda vez el crisol conteniendo la ceniza.
- Para el cálculo del contenido de ceniza, se utilizó la siguiente formula:

$$Ceniza\ (\%) = \frac{A - B}{C} \times 100$$

DONDE: A = Peso del crisol con la muestra (g)
B = Peso del crisol con la ceniza (g)
C = Peso de la muestra (g)

3.3.2. Procedimiento para la determinación de proteínas solubles

El método para determinar proteínas solubles (Método de Lowry) según Mera-Oyola (2018), con modificaciones, es como sigue:

a. Los reactivos stock fueron: solución A, 2% p/v de $CuSO_4.5H_2O$; solución B, 4% p/v de tartrato de sodio potasio; y la solución C, 3% p/v de Na_2CO_3 en una solución de NaOH 0.1 M. Estos reactivos son estables a temperatura ambiente.

b. El reactivo D se preparó al momento del análisis adicionando a 50 mL de reactivo C, 0.5 mL de reactivo B y 0.5 mL de reactivo A.

c. El reactivo E se preparó diluyendo reactivo de Folin con agua en una proporción 1:2.

d. El ensayo fue realizado adicionando a 0.5 mL de muestra convenientemente diluida con suero fisiológico (0.9% NaCl) y 2.5 mL de reactivo D.

e. Después se mezcló en un vórtex y de un tiempo de reposo de 20 min a temperatura ambiente se adicionó 0.5 mL de reactivo E. Después de 40 min se midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco preparado con suero fisiológico (0.9%).

f. La curva estándar se construyó ploteando la absorbancia medida a 750 nm de albumina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones (0-0.25 mg/mL) tratada con el mismo procedimiento de la muestra.

g. El rendimiento de la extracción (Y), fue calculado utilizando la siguiente formula:

$$Y = \frac{Proteina\ soluble\ en\ el\ sobrenadante\ (g)}{Proteina\ total\ en\ la\ muestra\ (g)} x100$$

3.3.3. Procedimiento para la determinación de polifenoles totales

El método para determinar polifenoles totales (Método Folin-Ciocalteu) según Valenzuela-Bustamante (2015), con modificaciones, es como sigue:

a. Se preparó un stock de ácido gálico a una concentración de 1000 µg / mL a un volumen de 10 mL, así mismo el carbonato de sodio a una concentración del 7.5%.

b. De la solución stock del ácido gálico se diluyó a concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL, a estos llamamos, “estándar”.

c. En tubos de ensayo aparte se añadió, 100uL de muestra/estándar; 500uL de Folin-Ciocalteu (0.1 N), y se mezcló en vórtex para dejar reposar por 8 min, por último, se añadió 400uL de carbonato de sodio.

d. Para la curva patrón, se prepararon 6 muestras + 1 blanco, las muestras se preparan como se menciona anteriormente, y se almacenaran por un tiempo de 2h a oscuras.

e. El orden es primordial ya que de esto dependerá las reacciones requeridas.

f. Teniendo la curva de calibración, ya definida, se procedió a trabajar las muestras con el mismo método mencionado.

g. Para la lectura, se utilizó un espectrofotómetro (GENESYS 10S) a 740 nm de longitud de onda.

h. Para el cálculo del contenido de polifenoles totales, se utilizó la ecuación de la curva (y = mx ± b) que esta nos expresa.

3.3.4. Procedimiento para determinar la actividad antioxidante: IC 50

El método para determinar la actividad antioxidante: IC 50 (Método 2.2 difenil-1-picrilhidrazil DPPH), según Kuskoski *et al.* (2005), con modificaciones. Es como sigue:

a. Se preparó un stock de DPPH a una concentración de 1mM y a partir de esta, se preparó una solución de trabajo a una concentración de 100µM a un volumen que se desee.

b. La proporción de reactivo y muestra fue de 975µL de DPPH y 25µL de muestra, para nuestro control en remplazo de agua destilada se usó alcohol (96°).

c. Se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm durante 10 minutos y se anotaron las absorbancias medidas en intervalos de 30 segundos.

d. De las absorbancias obtenidas se hizo un promedio y este fue la lectura control.

e. A partir de esto se puso a medir las muestras de la investigación siguiendo el mismo procedimiento, pero en este caso se tuvo en cuenta la lectura donde las diferencias entre una y otra sean mínimas.

f. Para calcular el porcentaje de inhibición se empleó la siguiente formula:

$$\%\boldsymbol{Inhibición} = \left(\frac{\boldsymbol{Abs_{control}} - \boldsymbol{Abs_{muestra\ consumida}}}{\boldsymbol{Abs_{control}}}\right) \times \mathbf{100}$$

g. El IC50 se obtuvo a partir del ploteo entre el porcentaje de inhibición y las concentraciones de las muestras, formando una gráfica cuya línea de tendencia debe ser lineal y su R^2 cercano a uno.

3.4. Variables

Los factores y las respuestas mostradas a continuación en el Cuadro 3, representan a las variables que fueron tomadas en cuenta para la investigación.

3.5. Población y muestra

3.5.1. Población

La población fueron los frutos del camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), que se recolectaron en el fundo del Sr. Juan Ruiz, que se encuentra ubicado en la carretera Pucallpillo, margen izquierda, interior 3 km, del distrito de Manantay, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, contando con un promedio de 3 hectáreas y media, teniendo un rendimiento de 2.6 toneladas x hectárea.

3.5.2. Muestra

La muestra que se utilizó en el estudio fueron las semillas obtenidas a partir de dicho fruto para los cuales fueron previamente acondicionados (lavado,

desinfectado, despulpado, secado de la semilla, molienda y almacenado), para el desarrollo de la investigación. La cantidad obtenida de muestra del pulverizado de semilla fue de aproximadamente 1 kg.

Cuadro 3. Variables, indicadores y niveles propuestos para extracción simultanea de proteínas y compuestos bioactivos

Variable	Indicador	Definición	Niveles	Unidades
Independiente				
Condiciones de extracción	Relación solvente/muestra	Cantidad de solvente, que se adicionará como solución extractora.	30 – 60	mL/g
	pH	Grado de alcalinidad y acidez de un compuesto.	7 – 9	---
	Concentración de NaCl	Utilizado para darle cierto grado de salinidad al momento de la extracción.	0 – 1	M
	Temperatura	Propiedad física que nos indicará el grado de relación en la optimización.	30 – 50	°C
	Tiempo	Utilizada para determinar la duración de las extracciones.	45 – 90	min
Dependiente				
Compuestos funcionales	Proteínas solubles	Compuestos funcionales que ayudan a mejorar la salud humana.		%
	Polifenoles totales			mg GAE/100 g de muestra
	Actividad antioxidante			IC 50 (mg/mL)

Fuente: Elaboración propia

3.6. Tratamientos

3.6.1. Diseños experimentales

Para la etapa de cribado se utilizó un Diseño de Cribado Media Fracción 2^{5-1} (Cuadro 4), el cual estudió el efecto de 5 factores (X_1, relación solvente/muestra; X_2, pH; X_3, concentración de NaCl; X_4, temperatura y X_5, tiempo), de los cuales se obtuvieron tres respuestas (Y_1, proteínas solubles; Y_2, polifenoles totales y Y_3, actividad antioxidante IC50); en 16 corridas.

Cuadro 4. Diseño Media Fracción 2^{5-1}

Corrida	Variables codificadas					Variables no codificadas					Y_1	Y_2	Y_3
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5			
1	-1	-1	-1	-1	1	30	7	0	30	90			
2	1	-1	-1	-1	-1	60	7	0	30	45			
3	-1	1	-1	-1	-1	30	9	0	30	45			
4	1	1	-1	-1	1	60	9	0	30	90			
5	-1	-1	1	-1	-1	30	7	1	30	45			
6	1	-1	1	-1	1	60	7	1	30	90			
7	-1	1	1	-1	1	30	9	1	30	90			
8	1	1	1	-1	-1	60	9	1	30	45			
9	-1	-1	-1	1	-1	30	7	0	50	45			
10	1	-1	-1	1	1	60	7	0	50	90			
11	-1	1	-1	1	1	30	9	0	50	90			
12	1	1	-1	1	-1	60	9	0	50	45			
13	-1	-1	1	1	1	30	7	1	50	90			
14	1	-1	1	1	-1	60	7	1	50	45			
15	-1	1	1	1	-1	30	9	1	50	45			
16	1	1	1	1	1	60	9	1	50	90			

X_1, Relación solvente/muestra; X_2, pH; X_3, Concentración NaCl; X_4, Temperatura; X_5, Tiempo.
Y_1, Proteínas solubles; Y_2, Polifenoles totales; Y_3, Actividad antioxidante.
Fuente: Elaboración propia.

Para la etapa de optimización se utilizó un Diseño de Factor Categórico Único, debido a que los resultados de la etapa de cribado solo arrojaron un factor significativo con incidencia positiva, que fue la temperatura. Se evaluaron en

cinco niveles diferentes (30; 40; 50; 60 y 70 °C), con las mismas respuestas que anteriormente se utilizaron (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diseño de Factor Categórico Único

Corrida	Variables codificadas	Variables no codificadas	Y_1	Y_2	Y_3
	x_1	X_1			
1	1	30			
2	2	40			
3	3	50			
4	4	60			
5	5	70			

X_1, Temperatura. Y_1, Proteínas solubles; Y_2, Polifenoles totales; Y_3, Actividad antioxidante.

Fuente: Elaboración propia.

3.6.2. Verificación de los resultados

En esta etapa de la investigación se verificó experimentalmente los resultados obtenidos en la etapa de optimización, comparándolos a su vez con los obtenidos por los modelos matemáticos resultantes de dichas optimizaciones para las diferentes respuestas (proteínas, polifenoles totales y actividad antioxidante).

3.7. Recolección de datos

3.7.1. Descripción de las fuentes de información primaria y secundaria

a. **Sitio web buscador online: Google académico**

   Google académico es un buscador que se utilizó, debido a su especificidad y potencia para las labores académicas y profesionales al ofrecer enlaces directos a los diferentes artículos científicos de interés.

b. **Sitios web online de revistas científicas: SCIELO, repositorios digitales, Redalyc**

   Estas son una red de revistas científicas en línea, que agrupan diversos tipos de investigaciones con carácter científico. Se utilizó estos focos de información ya que en su mayoría nos brinda la accesibilidad del caso, teniendo al alcance de un click, diferentes investigaciones en infinidad de

rubros, haciendo que el tesista pueda tener una fuente confiable de información al momento de elaborar su tesis.

c. **Tesis y otros**

Las tesis usadas también representaron una excelente fuente de información a la hora de realizar las discusiones.

3.8. Procesamiento de los datos

Con respecto al procesamiento de los datos (Análisis de varianza, diagrama de Pareto, entre otros), se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion XVI 16.1.18 (Stat Point Inc., Warrenton, VA, USA), ya que esta plataforma tiene las herramienta necesarias para diseñar nuestros experimentos a partir de las variables que sean convenientes para los fines de la investigación, y a su vez analizarlos; como complemento de esta también se usó el software MINITAB 17 Statistical Software, de igual manera se utilizó el software Microsoft Excel 2013 con la finalidad de obtener los estadísticos básicos como promedios, desviación estándar, coeficiente de varianza, entre otros.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fisicoquímica de la semilla de camu-camu

Los resultados de la caracterización fisicoquímica (análisis químico proximal), fueron obtenidos por prestación de servicio del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se muestra a continuación en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados del análisis químico proximal

ANÁLISIS	R1	R2	Ẋ	S.D.	C.V.	Error estándar
Humedad, %	13.90	14.04	13.97	0.10	0.71	0.07
Proteína total (N x 6.25), %	6.12	6.04	6.08	0.06	0.93	0.04
Grasa, %	3.15	3.24	3.20	0.06	1.99	0.05
Fibra cruda, %	3.02	2.83	2.93	0.13	4.59	0.10
Ceniza, %	1.42	1.39	1.41	0.02	1.51	0.02
Extracto libre de Nitrógeno, %	72.39	72.46	72.43	0.05	0.07	0.03

R1 y R2, corresponden a las repeticiones; Ẋ, corresponde al promedio; SD, corresponde a la desviación estándar, CV, corresponde al coeficiente de variación.

Fuente: Elaboración propia

Se encontró que el contenido de humedad en la semilla pulverizada de camu-camu fue de 13.97 ± 0.10 %, comparado con lo que reporta Silva de Azevêdo *et al.* (2014), quienes encontraron su contenido de humedad, del 5.9 ± 0.9 % para residuo de camu-camu secado por aire caliente y 5.9 ± 0.1 % para liofilizado difiriendo de lo obtenido, porque utilizaron semilla y cascara en conjunto, así mismo el acondicionamiento que se le dio al material experimental fue distinto al que se realizó en este trabajo con un secado por estufa, otra razón de la diferencia de resultados es el método que se aplicó para determina el contenido de humedad, ya que Silva de Azevêdo *et al.* (2014), utilizó el 934.06, AOAC (1995); mientras que el autor reporta el método 950.46, AOAC (2005), pudiendo tener algún efecto que difiera en la determinación de la humedad. Según la norma CODEX STAN 152-1985, determina que el contenido de humedad para harina de trigo, debe ser como máximo 15.5 %, por ello se considera que lo reportado, se encuentra dentro del parámetro indicado.

Para el contenido de proteína se ha encontrado que es 6.08 ± 0.06 % que representa un contenido de 7.06 % BS, que fue mayor al reportado por Silva de Azevêdo (2015), quien encontró un contenido de proteína de 5.58 ± 0.01 g / 100 g BS para la muestra de residuo de camu-camu (semilla y cascara) liofilizada, y de 5.53 ± 0.27 g / 100 g BS para la muestra de residuo de camu-camu secada por convección a 50 °C. Como en el anterior caso para la humedad, el tipo de secado fue diferente y la muestra en si no consistió de semilla pura, sino que fue una mezcla con cascara que pudo disminuir el contenido de proteína en el global. Por otro lado, Rodriguez-Ponce y Laura-Vela (2009), reportaron que el contenido de proteínas en semilla es de 6.07 ± 0.26 % BH, similar a lo reportado en la investigación reafirmando la validez de los resultados obtenidos, el método usado para la determinación del contenido de proteínas fue el mismo y esta vez se hizo el estudio en la semilla. Así mismo Garay-Vega y Villafuerte-Paredes (2015), muestran un contenido de proteínas de la semilla en 5.42 g / 100 g de muestras de camu-camu, menor al reportado en la investigación. Por otro lado, Álvarez-Romaní (2012), reportó un contenido de proteína de 12.51 %, valor muy alejado de lo reportado por el autor, debiéndose talvez al tipo de metodología aplicada, ya que Álvarez-Romaní (2012), utilizó el método AOAC (1995): 979.09, mientras que el autor utilizó el método AOAC (2005): 984.13.

El contenido de grasa determinado fue de 3.20 ± 0.06 % que representa un 3.72 %, menor al encontrado po Vega citado por Garay-Vega y Villafuerte-Paredes (2015), quien reportó valor de 4.12 g / 100 g muestra fresca. Así mismo Álvarez-Romaní (2012), reportó el contenido de grasa para la semilla fresca de camu-camu de 3.17 %, este resultado está más cercano a lo que el autor reportó en la investigación, ambas determinaciones se realizaron con la misma metodología descrita por la AOAC (2005). Por su parte Rodriguez-Ponce y Laura-Vela (2009), en su resultado de contenido de grasa que reportaron se tuvo un 3.95 ± 0.18 %, valor ligeramente mayor al encontrado, según Martin del Campo y Estarrón (2016), la diferencia composicional se explicaría por las diferencias de origen en las materias primas que podrían estar afectadas por la variedad, clima y suelo.

En cuanto al contenido de fibra cruda fue de 2.93 ± 0.13 % (3.41 % BS), Vega citado por Garay-Vega y Villafuerte-Paredes (2015), reportó un contenido más alto, 4.77 g / 100 g muestra fresca; para Rodriguez-Ponce y Laura-Vela (2009), el contenido de fibra cruda fue de 10.36 ± 0.64 %; y para Álvarez-Romaní (2012), de 9.11 g / 100 g muestra fresca, todos los resultados usados para las discusiones de resultados fueron convertido a base seca, ya que estos son necesarios para hacer las comparaciones respectivas. Como se muestra, los resultados son muy variables y no se puede

establecer una comparación directa a lo reportado por el autor; según Hincapié et al. (2010), la variabilidad posiblemente se deba a que el tratamiento de secado que se le dio a las semillas, pudo haber afectado el contenido de fibra cruda.

El contenido de ceniza que reportó el autor fue de 1.41 ± 0.02 % (1.64 % BS); mientras que Rodriguez-Ponce y Laura-Vela (2009), reportan un contenido de cenizas del 2.02 ± 0.33 %; así mismo Vega, citado por Garay-Vega y Villafuerte-Paredes (2015), reportó un contenido de cenizas de 1.95 g/100 g muestra fresca; y Álvarez-Romaní (2012), por su parte reportaron que la semilla fresca de camu-camu, presentaba un contenido de cenizas de 1.3 g/100 g, siendo este el que se acerca más al resultado reportado por el autor. Igualmente recordando que estos resultados tuvieron que ser convertidos de base húmeda, como originalmente fueron reportados, a base seca, para proceder a realizar la igualación de términos y poder tener una apreciación más correcta de las diferencias que puedan existir entre uno y otro resultado; la metodología aplicada en todos los casos fue la misma a la que el autor reportó sus resultados, entonces las diferencias que existen, se pueden deber a características externas de cada investigador.

4.2. Cribado de factores significativos (Diseño de media fracción 2^{5-1})

Los resultados del cribado (screening), fueron obtenidos a través del desarrollo de un diseño experimental de media fracción 2^{5-1} en el cual se establecieron como factores la relación solvente/muestra (X_1), el pH (X_2), la concentración de NaCl (X_3), la temperatura de extracción (X_4) y el tiempo de extracción (X_5) y como respuestas el contenido de proteínas solubles, Y_1, %; el contenido de polifenoles totales, Y_2, mg GAE / 100 g y la actividad antioxidante, Y_3, IC50. El uso correcto de este tipo de diseños experimentales permitió reducir la cantidad de experimentos a través de la distinción de factores clave que rigen las variables de respuesta, así para los experimentos posteriores tendrán un mejor enfoque. El diseño de media fracción es una herramienta que reduce el número de corridas experimentales y tiene la potencia de poder identificar los factores significativos. Dieciséis corridas fueron llevadas a cabo durante la etapa de cribado, estos resultados se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Diseño Media Fracción 2^{5-1}

Corrida	Variables no codificadas					Y_1 (%)	Y_2 (mg GAE/100g)	Y_3 (IC50 mg/mL)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5			
1	30	7	0	30	90	24.411 ± 0.28	279.870 ± 1.95	6.122 ± 0.035
2	60	7	0	30	45	23.245 ± 0.36	228.259 ± 5.01	5.840 ± 1.946
3	30	9	0	30	45	27.960 ± 0.40	292.833 ± 1.47	7.182 ± 1.827
4	60	9	0	30	90	27.726 ± 0.56	290.481 ± 1.28	5.480 ± 1.997
5	30	7	1	30	45	7.531 ± 0.15	71.907 ± 0.85	27.869 ± 3.993
6	60	7	1	30	90	8.411 ± 0.49	91.222 ± 4.44	27.415 ± 1.214
7	30	9	1	30	90	7.893 ± 0.59	70.981 ± 1.16	28.377 ± 0.054
8	60	9	1	30	45	5.850 ± 0.29	51.222 ± 2.94	25.050 ± 1.052
9	30	7	0	50	45	34.974 ± 0.16	373.019 ± 6.90	4.018 ± 0.854
10	60	7	0	50	90	36.632 ± 0.43	399.000 ± 5.09	3.354 ± 0.253
11	30	9	0	50	90	46.900 ± 0.22	500.056 ± 6.00	6.587 ± 0.658
12	60	9	0	50	45	39.137 ± 0.21	423.074 ± 9.45	4.135 ± 1.984
13	30	7	1	50	90	11.873 ± 0.29	133.389 ± 2.42	17.677 ± 3.142
14	60	7	1	50	45	11.305 ± 0.29	123.815 ± 3.40	24.021 ± 0.265
15	30	9	1	50	45	13.084 ± 0.22	106.352 ± 2.63	32.724 ± 0.478
16	60	9	1	50	90	10.665 ± 0.42	102.333 ± 5.56	13.750 ± 0.235

X_1, Relación solvente/muestra; X_2, pH; X_3, Concentración NaCl; X_4, Temperatura; X_5, Tiempo. Y_1, Proteínas solubles; Y_2, Polifenoles totales; Y_3, Actividad antioxidante.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.1. Cribado para proteínas solubles

Los valores experimentales de extracción de proteínas solubles (%) encontrados, estuvieron en el rango de 5.850 ± 0.29 a 46.900 ± 0.22 %, los de polifenoles totales (mg GAE / 100 g) en el rango de 51.222 ± 2.94 a 500.056 ± 6.00, y por último para la actividad antioxidante (IC 50) estuvieron entre 3.354 ± 0.253 y 32.724 ± 0.478 mg / mL. El análisis de varianza (Cuadro 12, Anexo 8.2) reveló como factores altamente significativos ($p < 0.01$) para el rendimiento de extracción de proteínas solubles, a la concentración de NaCl y a la temperatura, y los no significantes ($p > 0.05$): relación solvente/muestra, pH y tiempo; el coeficiente de determinación fue satisfactorio (R^2 = 0.943391), este coeficiente sugiere un buen ajuste del modelo dado, ya que al menos el R^2 debe ser superior a 0.8000 (Joglekar & May citado por Guerrero-Ochoa *et al*. 2015). Para polifenoles totales el análisis de varianza (Cuadro 13, Anexo 8.2) nos

muestra los factores altamente significativos ($p < 0.01$): concentración de NaCl y temperatura, mientras que los factores que no poseen significancia ($p > 0.05$) fueron: relación solvente/muestra, pH y tiempo; el coeficiente de determinación para este caso fue igualmente satisfactorio ($R^2 = 0.93811$). Para la actividad antioxidante el análisis de varianza (Cuadro S6) reveló un único factor altamente significativo ($p < 0.01$) que fue la concentración de NaCl, y los no significantes ($p > 0.05$): relación solvente/muestra, pH, temperatura y tiempo; el coeficiente de determinación para este caso también fue satisfactorio ($R^2 = 0.903697$).

Los efectos más significativos ($p < 0.05$) de los factores que se evaluaron en orden de importancia decreciente, están representados en el diagrama de Pareto (Figura 8), así mismo se muestra si el efecto fue positivo o negativo para la variable de respuesta proteína soluble.

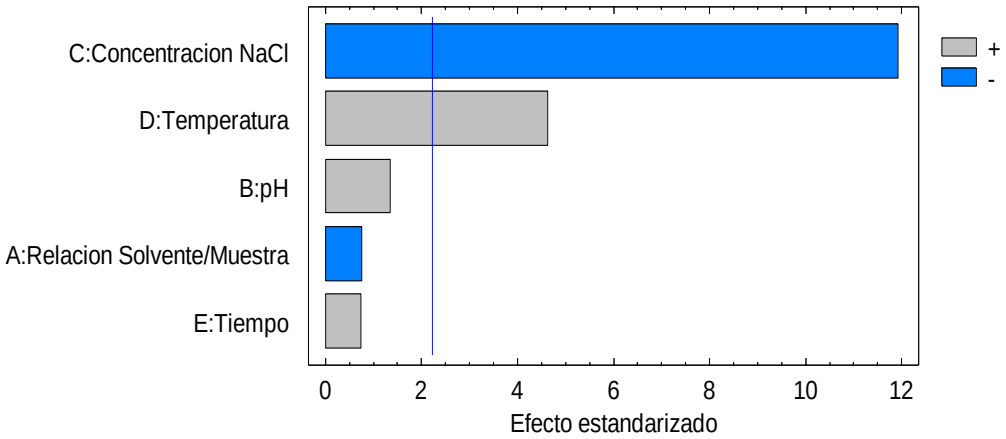


Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizada para proteínas solubles.

Fuente: Elaboración propia.

Los factores claves en orden decreciente de importancia corresponden a: concentración de NaCl > temperatura > pH > relación solvente muestra > tiempo. Entre los principales factores, la concentración de NaCl presento un efecto negativo en la extracción de proteínas solubles, esto puede deberse a la fuerza iónica que posee el NaCl a la hora de extraer proteínas ya que este produce una disminución en la solubilidad debido a la naturaleza no polar de la superficie de la proteína de la semilla de camu-camu (Goundan, citado por Guerrero-Ochoa *et al.* 2015), un fenómeno conocido como precipitación salina y también observado con proteínas de la semilla de soja (Lee *et al.,* citado por Guerrero-Ochoa *et al.* 2015); al parecer la utilización del NaCl puede tener efectos negativos en la solubilidad de proteínas en rangos específicos de pH, comportamiento que podría ser aludido a un aumento de las reacciones

hidrofóbicas (Foste *et al.*, citado por Mera-Oyola 2018). Por otro lado la temperatura presentó un efecto positivo en la extracción de proteínas solubles esto debido a que incrementó la destreza del solvente a solubilizar los compuestos y, disminuye la viscosidad del solvente liquido lo cual permitió una mejor inserción del solvente en la matriz solida (Samavati, citado por Mera-Oyola 2018); por ejemplo, Zhang *et al*., citado por Mera-Oyola (2018), descubrieron una respuesta positiva de la temperatura (20-80 °C) en la evaluación de extracción de proteína de la semilla de algodón, expresan esa tendencia mencionando que cuando hay mayor temperatura, las moléculas se excitan haciendo que su movimiento aumente, demostrando una mayor velocidad de trasferencia de masa desde el espacio de contacto entre los sólidos y el líquido; es por ello que, el incremento de la temperatura podría provocar el intercambio de masa y la solubilidad, disminuyendo la viscosidad de la solución; no obstante también mencionan que temperaturas elevadas podrían originar la disminución de la actividad de la proteína y su posterior desnaturalización térmica.

4.2.2. Cribado para polifenoles totales

Para la variable de respuesta polifenoles totales también se presenta el diagrama de Pareto (Figura 9) para representar los factores evaluados en forma decreciente y el efecto que estos poseen (negativo o positivo).

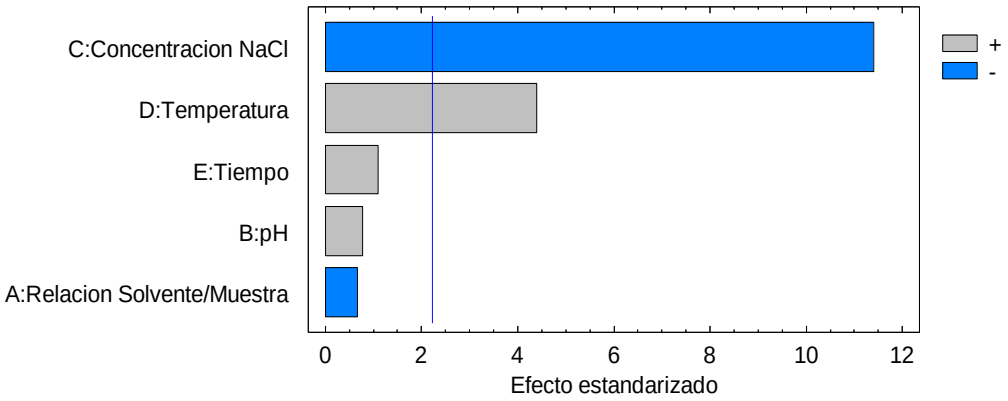


Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizada para polifenoles totales.
Fuente: Elaboración propia.

Los factores claves importantes en orden decreciente corresponden a: concentración de NaCl > temperatura > tiempo > pH > relación solvente muestra. De los principales factores la concentración de NaCl mostró un efecto negativo en la extracción de polifenoles totales, lo cual podría estar causado por un rompimiento del metabolismo de los fenoles a altas concentraciones de esta sal, la respuesta desestabilizadora del cloruro de sodio en el ámbito intra

y extracelular (Fuentes *et al.* 2010); así mismo por la presencia de distintas configuraciones de réplica frente al estrés salino (Flowers y Hajibagheri, Ahmad *et al.*, citado por Fuentes *et al.* 2010), como la acción e inacción de genes que confieren el restablecimiento de la homeostasis iónica y osmótica; los efectos fundamentales sobre tales indicadores pueden estar asociados a la toxicidad iónica (Caseira, Mohamedin *et al.*, citado por Fuentes *et al.* 2010), la toxicidad de los iones Cl^+ y Na^-, un déficit provocado por la interferencia iónica (Ghoulam *et al.*, citado por Fuentes *et al.* 2010). De manera diferente la temperatura tuvo un efecto positivo para la extracción de polifenoles, probablemente esto se deba a que el calor origina una elevada penetrabilidad en la pared celular, perfeccionando así la solubilidad y el coeficiente de difusión del solvente, lo cual posibilita la extracción de los polifenoles con el tiempo (Alberti *et al.*, citado por Ceballos-Jaimes 2018).

4.2.3. Cribado para actividad antioxidante

Para la variable de respuesta de actividad antioxidante se muestra el diagrama de Pareto (Figura 10) que presentaran los factores significativos ($P < 0.05$) en orden decreciente de importancia y el efecto positivo o negativo que influencian en la actividad antioxidante.

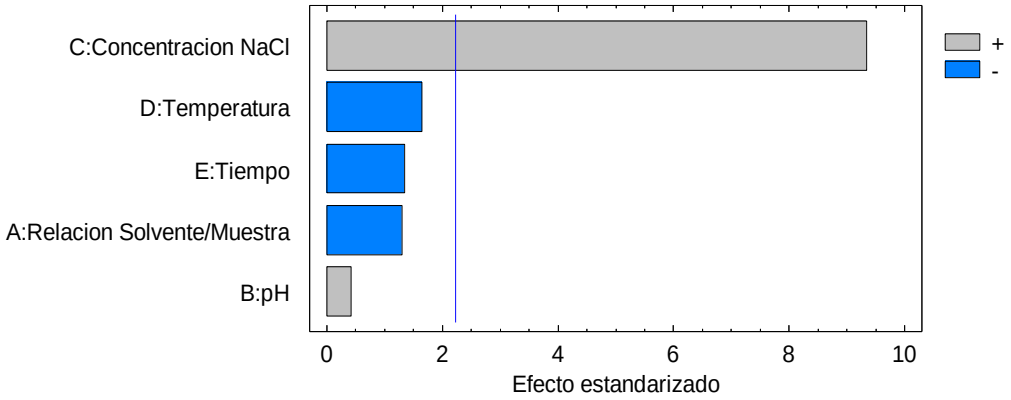


Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizada para actividad antioxidante.

Fuente: Elaboración propia.

Los factores claves de mayor importancia en orden decreciente corresponden a: concentración de NaCl > temperatura > tiempo > relación solvente/muestra > pH. De estos el único factor que tuvo significancia ($P < 0.05$) fue la concentración de NaCl y este presento un efecto positivo. Para apreciar mejor el efecto verdadero significativo de las variables para la actividad antioxidante, se optó por usar la técnica de transformación a la inversa de los datos obtenidos (1/x) para que este tenga un mejor entendimiento sobre la interacción de los

factores en la actividad antioxidante. Con los datos ya transformados se vuelve a realizar un diagrama de Pareto y se procedió a analizar lo obtenido.

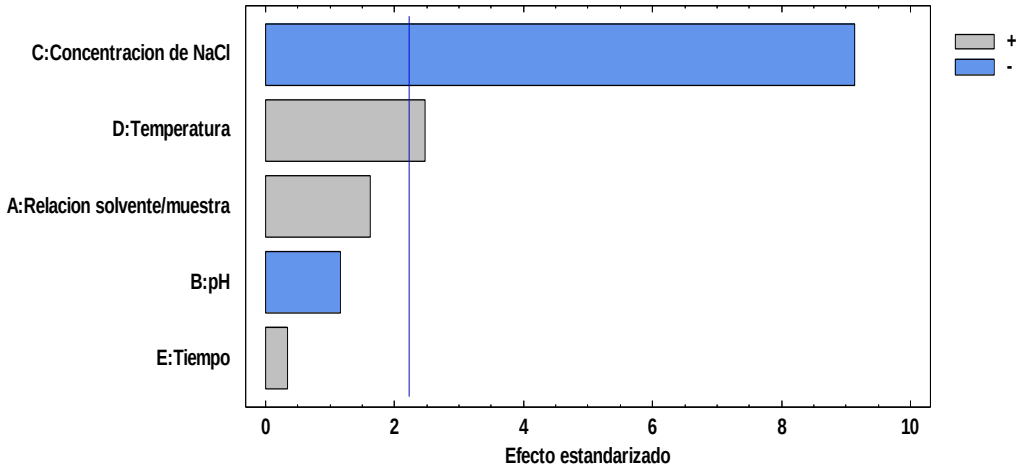


Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizada para actividad antioxidante con datos transformados.

Fuente: Elaboración propia.

Los factores claves de mayor importancia en orden decreciente corresponden a: concentración de NaCl > temperatura > relación solvente/muestra > pH > tiempo. De estos los factores que tuvieron significancia ($P < 0.05$) fue la concentración de NaCl, que presentó un efecto negativo; y la temperatura presentando un efecto positivo. Lo que nos indica este nuevo diagrama de Pareto a diferencia del anterior, es que la concentración de NaCl en realidad desfavorece la actividad antioxidante, y que la temperatura tiende a mejorar esta actividad.

4.3. Optimización (Diseño de factor categórico individual)

Dado que en los diagramas de Pareto mostrados en la etapa de cribado, se expresa de manera excepcional la significancia positiva de un solo factor categórico común (la temperatura) para las respuestas (proteínas solubles y polifenoles totales), se procedió a estudiar este factor en cinco (5) diferentes niveles para ampliar el espectro de opciones y por consiguiente la obtención de resultados favorables; es por ello que se empleó el diseño de Factor Categórico Individual para hacer las evaluaciones correspondientes, este es un diseño experimental para situaciones donde el interés primario se centra en la comparación de niveles (30; 40; 50; 60; y 70 °C) de un factor categórico (temperatura); y tomando como valores fijos o constantes las variables antes estudiadas: relación solvente/muestra (30 mL/g), pH (9), concentración NaCl (0) y tiempo (90 min). Estos valores fijos, se determinaron con la ayuda del análisis al

diagrama de Pareto, así mismo el programa STATGRAPHICS, nos muestra los valores óptimos, que nos sirvieron como los valores constantes usado en esta etapa.

Otro aspecto a discutir es sobre la temperatura, como bien se sabe, esta puede afectar dependiendo de cuanta esta sea aumentada o disminuida, en esta investigación se hizo análisis con hasta temperaturas de 90 °C, viéndose que a temperaturas superiores a los 70 °C las proteínas tendían a desnaturalizarse, esto se puede explicar teniendo como base que la temperatura se puede interpretar como una agitación térmica, por ello es que a mayores temperaturas las proteínas sufren más cantidad de choques haciendo que las interacciones débiles (internas) de las proteínas no puedan conservar su estructura, desplegándose y por ende se desagrega (Rocha, citado por Mera-Oyola 2018). De igual forma sucede con los polifenoles totales, ya que a altas temperaturas estas suelen alterarse, pero Bennett *et al*., citado por Silva de Azevedo (2015) se refieren a el error que se menciona cuando se determina la perdida de compuestos fenólicos, ya que estos no necesariamente se pierden, sino que son químicamente convertidos, y por ello no son detectados analíticamente.

En el cuadro 8, se muestra con más detalle lo que se obtuvo, para su mejor análisis.

Cuadro 8. Diseño de factor categórico individual

Corridas	**X_1 (°C)**	**Y_1 (%)**	**Y_2 (mg GAE / 100g)**	**Y_3 (IC50 mg / mL)**
1	30	28.580 ± 1.45[a]	279.107 ± 4.33[a]	7.802 ± 0.168[a]
2	40	37.371 ± 3.35[b]	376.618 ± 2.17[b]	6.885 ± 0.119[b]
3	50	44.162 ± 2.02[c]	425.204 ± 2.47[c]	6.450 ± 0.227[c]
4	60	56.002 ± 1.99[d]	523.330 ± 1.95[d]	6.180 ± 0.219[c]
5	70	67.010 ± 2.35[e]	595.389 ± 6.35[e]	6.518 ± 0.195[c]

X_1, Temperatura; Y_1, Proteínas solubles; Y_2, Polifenoles totales; Y_3, Actividad antioxidante.

Las respuestas simbolizan (promedio ± desviación estándar), valores de una propia columna con superíndices distintas son significativos ($p \leq 0.05$)

Fuente: Elaboración propia.

Como puede verse, los valores obtenidos para proteínas solubles (Y_1), se encontraron comprendidos en el rango de 28.580 ± 1.45 a 67.010± 2.35 %, para polifenoles totales (Y_2) estuvieron en 279.107 ± 4.33 a 595.389 ± 6.35 mg GAE / 100 g de ratio, por último, para la actividad antioxidante se obtuvieron valores de 7.802 ± 0.168 a 6.518 ± 0.195 mg / mL.

4.3.1. Optimización para proteínas solubles

El contenido de proteínas recuperada de semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*) en el proceso de optimización tuvo un valor máximo de 56.002 ± 1.99 % en promedio. Comparándolos con otras semillas y/o cereales fue inferior a los reportados; como por ejemplo Ochoa-Pacha (2018), para cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*) que obtuvo un 71.95 % y Mera-Oyola (2018) que logró un contenido que varía entre 64.05 ± 1.02 a 85.1 ± 3.56 %; para el caso de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) según Molina-Paredes (2018) reporta un 78 % y 71.63 % para las variedades blanca de Juli y Pasankalla respectivamente. Sin embargo, fue mayor que otras semillas, así lo reportado por Grefa-Andi (2017) en el contenido de proteínas de semilla del fruto de guachanzo (*Caryodendron orinocense Karst*) fue de 21.91 %; para semilla de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) el contenido de proteínas reportado por Aquino-Méndez (2015) fue de 57.9 %, un tanto mayor con el contenido reportado por el autor. Vit *et al.* (2014) reportó el contenido de proteínas en semilla de guanábana (*Annona muricata*) de 14.77 g / 100 g.

En la Figura 12, se muestra el ploteo de proteína recuperada (%) vs temperatura (°C), el cual denota una posible igualdad estadística de los resultados en dos temperaturas (40 y 50 °C), sin embargo al momento de hacer el análisis cuantitativo de las respuestas dadas para estas dos temperaturas (37.371 ± 3.35 y 44.162 ± 2.02 , respectivamente) se observa que debido a la posible cercanía dada por la desviación estándar que existe entre las mismas se puede incurrir en esa equivocación, por lo que se realizó la prueba de rangos múltiples (Cuadro 13, Anexo 8.3), que confirma la no igualdad estadística entre las mismas. Además, se muestra para conocimiento dentro de ella el coeficiente de relación dado y la ecuación de la gráfica que nos permitirá contrastar más adelante los resultados experimentales con lo predicho por dicha ecuación.

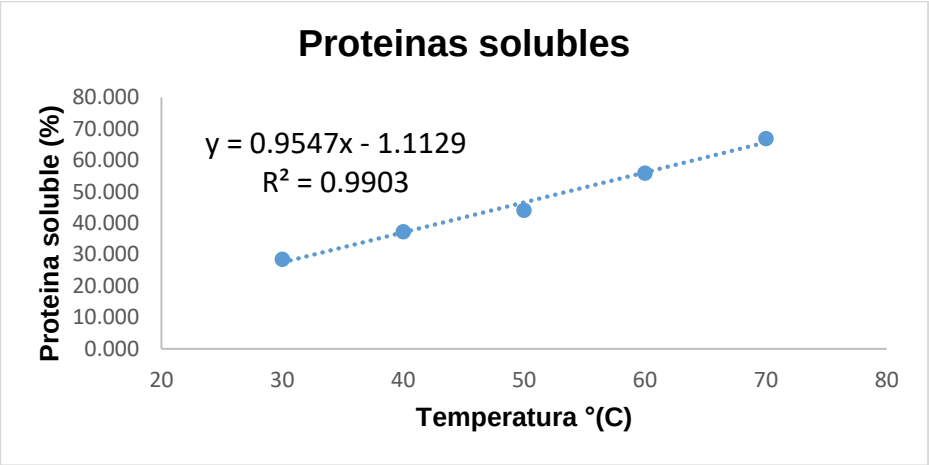


Figura 12. Grafica de dispersión de proteínas vs temperatura.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.2. Optimización para polifenoles totales

En el caso de la extracción de polifenoles totales se reportó un valor máximo de 523.330 ± 1.95 mg GAE / 100 g en el proceso de optimización; comparando con ensayos preliminares que se realizaron (273.598 mg GAE / 100 g) antes de la ejecución de esta tesis, con la nueva metodología aplicada y con los parámetros ya optimizados, se concluye que hay una recuperación de poco más del 190 %. Así mismo se compara a lo reportado por García-Gutiérrez y Miranda-Rodríguez (2017), cuya investigación se realizó en semillas de chía (*Salvia hispanica L.*), encontrándose un valor, para la variedad de chía blanca, de 0.0221 ± 0.05 mg GAE / 100 g y para chía negra 0.0218 ± 0.02 mg GAE / 100 g, siendo en este caso el valor reportado por el autor, mayor que estos mostrados para la discusión. Valencia *et al.* (2017), también reportan resultados sobre el contenido de fenólicos totales para 24 accesiones de semilla de quinua (*Chenopodium quinua W.*) con valores comprendidos entre 0.00783 ± 0.052 y 0.03437 ± 0.267 mg GAE / 100 g, aun persistiendo la superioridad de lo reportado por el autor de esta investigación; Belmán-Ramírez *et al.* (2016) también reportó resultados sobre el contenido de compuestos bioactivos (fenólicos totales) en semilla de mijo perla (*Pennisetum glaucum*) por un valor de 0.6 mg EAG.100 g^{-1} de peso fresco, siendo este resultado inferior al reportado por el autor; otro estudio también relacionado al contenido de fenólicos totales en semilla de chía fue investigado por Corona-Jiménez *et al.* (2016), utilizando una metodología asistida por ultrasonido obtuvieron 194.06 ± 11.11 mg GAE.100 g^{-1}.

En la Figura 14, se muestra la gráfica de intervalos de polifenoles totales vs temperatura, para poder tener una mejor visualización de la tendencia que esta nos indica. Al igual que en la anterior sección (4.3.1) se presenta el grafico de dispersión con el mismo fin y motivo ya expresado.

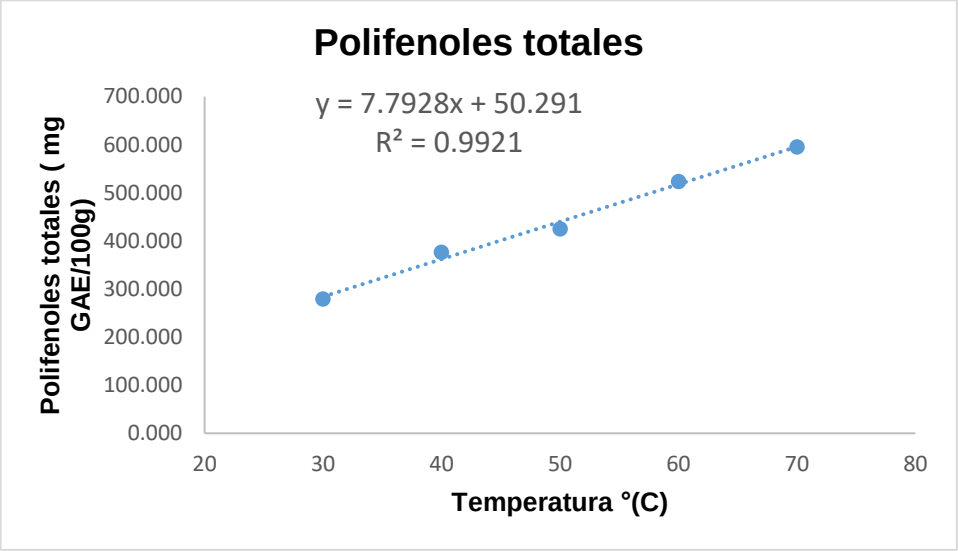


Figura 13. Grafica de dispersión de polifenoles vs temperatura.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.3. Optimización para actividad antioxidante

Con respecto a la actividad antioxidante que se presentó en esta parte del diseño el mejor valor que se obtuvo es de 6.180 ± 0.219 mg / g de coeficiente inhibitorio al 50 %, notándose que, a diferencia de los anteriores ensayos mostrados, para la actividad antioxidante en efectos de comparación es más apreciada el que tiene un menor valor de IC50 ya que esta posee una mejor actividad antioxidante (Guija-Poma et al. 2015). Por otro lado, estudios de otras semillas, como la chía (*Salvia hispanica L.*), en capacidad antioxidante, García-Gutiérrez (2017) presentaron valores de 528.95 ± 6.78 μmol TE / g para la variedad negra y con cultivo convencional y para la variedad blanca con cultivo orgánico, presentó un valor de 459.28 ± 7.56 μmol TE / g; así mismo Valencia *et al.* (2017) en su estudio en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa W.*), reportaron valores comprendidos entre 486.080 ± 3.572 y 1195.746 ± 18.086 μmol Trolox / 100 g, la característica de esto fue que las extracciones fueron en medio etanólico, para medio metanólico se obtuvo valores de entre 474.215 ± 17.545 – 972.875 ± 53.896 μmol Trolox / 100 g; en su investigación, Vit *et al.* (2014) obtuvieron un resultado de 131.2 μmol equivalentes de Trolox /

100 g en semillas de guanábana (*Annona muricata*), que fueron extraídas en medio etanólico; uno de los autores mencionados en los antecedentes (Sotero-Solis *et al.* 2019) hizo un estudio en semilla de camu-camu, y su valor para actividad antioxidante fue de 0.39977 mg / ml, comparando con lo reportado se tiene que es superior la cifra en actividad antioxidante IC50. Las diferencias entre los valores reportados en comparación con los demás autores se pueden justificar, ya sea por el tipo de metodología aplicada, la variabilidad que existe entre las diferentes materias primas, así mismo las condiciones agroecológicas que son propias de cada una de ellas.

En la Figura 14, se muestra la gráfica de intervalos de actividad antioxidante vs temperatura, el cual denota una superposición entre las temperaturas (°C) 50, 60 y 70; el cual se confirma al momento de hacer el análisis cuantitativo de las respuestas dadas con sus desviaciones estándar usando la prueba de múltiple rango para estas temperaturas. Por lo tanto, si hay una igualdad estadística entre estos datos, para poder visualizarlo mejor diríjase a la sección Anexo 8.3, Cuadro 15, se presenta la gráfica de dispersión por los motivos y fines ya expresados.

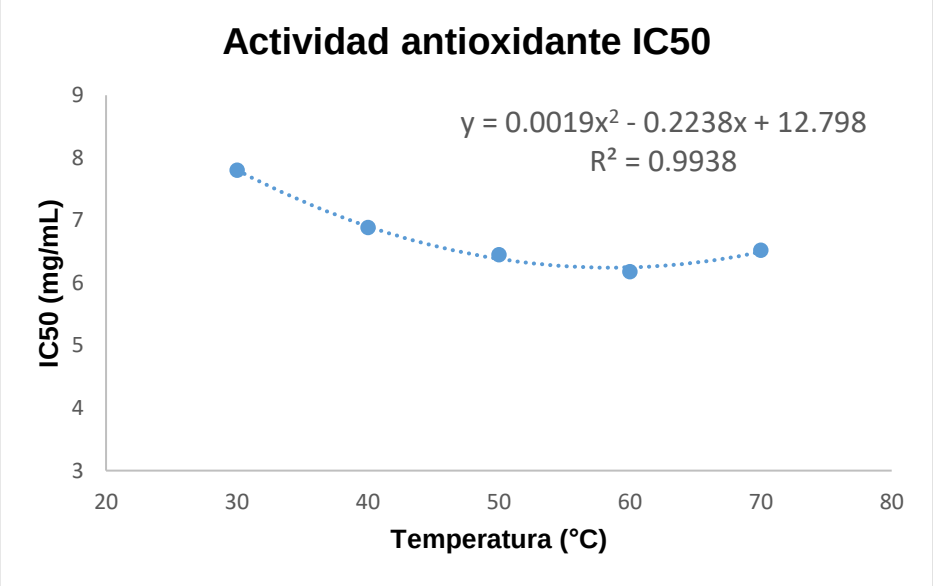


Figura 14. Grafica de dispersión de actividad antioxidante vs temperatura.

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Verificación de resultados obtenidos

Consistió en recrear la formulación que dio un mejor comportamiento de acuerdo a los resultados mostrados en el apartado 4.3; es por ello que se trabajó con el nivel 4 (60 °C) del factor categórico (Temperatura) que se obtuvo en la optimización, dando como consecuencia los siguientes resultados que se muestran en el Cuadro 9 y que fueron comparados con los valores obtenidos en la optimización.

Cuadro 9. Resultados de la verificación

Corrida	Variables no codificadas					Y_1 (%)	Y_2 (mg GAE/100g)	Y_3 (IC50 mg/mL)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5			
Verific.	30	9	0	60	90	56.242 ± 0.25[a]	521.043 ± 4.23[a]	6.089 ± 0.122[a]
Predic.	30	9	0	60	90	56.169	517.661	6.210
Optim.	30	9	0	60	90	56.002 ± 1.99[a]	523.330 ± 1.95[a]	6.180 ± 0.219[a]

X_1, Relación solvente/muestra; X_2, pH; X_3, Concentración NaCl; X_4, Temperatura; X_5, Tiempo. Y_1, Proteínas solubles; Y_2, Polifenoles totales; Y_3, Actividad antioxidante.

Las respuestas simbolizan (promedio ± desviación estándar) del experimento, valores de una propia columna con superíndices distintos son significativos ($p \leq 0.05$).

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro anterior mostrado nos revela el resultado obtenido en la verificación para el pulverizado de semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), para el contenido de proteínas solubles tenemos 56.242 ± 0.25 %, a su vez el contenido de polifenoles totales fue de 521.043 ± 4.23 mg GAE / 100 g, y por último en la actividad antioxidante se obtuvo un coeficiente inhibitorio al 50 % (IC 50) de 6.089 ± 0.122 mg / mL. Los resultados obtenidos tuvieron que ser contrastados con los resultados que se obtuvieron en la etapa de optimización, y de igual manera con los resultados predichos por las ecuaciones de las gráficas que se presentaron, teniendo que los resultados se ajustan de buena manera, comprobando que los datos obtenidos cumplen satisfactoriamente con los resultados predichos por las ecuaciones de las rectas para cada caso.

V. CONCLUSIONES

Con la presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se caracterizó fisicoquímicamente la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), obteniéndose los siguientes valores: humedad, 13.97 %; para proteína total, 6.08 %; para grasa, 3.20 %; fibra cruda con un 2.93 %; ceniza, 1.41 %; y extracto libre de nitrógeno de 72.43 %, polifenoles 273.598 mg GAE / 100 g.

- Se determinó que los únicos factores significativos para la extracción simultánea de proteínas solubles y compuestos bioactivos (polifenoles totales y actividad antioxidante) en la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), fueron la temperatura, que mostro un efecto positivo en las respuestas evaluadas; y la concentración de NaCl, que mostro un efecto negativo, por lo que no fue considerada para la etapa de optimización, sin dejar de lados los otros factores que fueron el tiempo, relación solvente/ muestra y el pH que fueron constantes en la etapa de optimización.

- Se encontró que existe una relación lineal entre polifenoles totales y proteínas solubles.

- Se optimizo la extracción simultanea mediante la determinación de la temperatura óptima para la extracción, que fue 60 °C obteniéndose para proteínas solubles 56.002 ± 1.99 %, polifenoles totales 523.330 ± 1.95 mg GAE / 100 g, y actividad antioxidante un valor de IC50 de 6.180 ± 0.219 mg / mL. Los otros factores que completan la optimización son los siguientes: relación solvente/muestra (30 mL/g), pH (9), y tiempo (90 min), parámetros con los que se obtiene un producto con importantes características nutricionales y funcionales.

- Finalmente se concluye que todos los objetivos fueron cumplidos de manera satisfactoria y acorde a la investigación.

VI. RECOMENDACIONES

De la investigación se desprenden las siguientes recomendaciones:

- Realizar la determinación del perfil aminoacídico de la proteína obtenida a partir de la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*).
- Profundizar las investigaciones de la relación que existe en la extracción de las proteínas solubles y los polifenoles totales de materiales similares a las semillas de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*).
- Realizar estudios que permita obtener hidrolizados a partir de las proteínas solubles de la semilla de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*), así como purificar los péptidos obtenidos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Akter, MS; Oh, S; Eun, JB; Ahmed, M. 2011. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. Food Research International 44(7):1728-1732.

Álvarez-Romaní, JE. 2012. Utilización de la semilla de *Myrciaria dubia* (camú camú) y su reemplazo parcial como sucedáneo del *Coffea arabica* (café). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Iquitos, Perú, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. 102p.

AOAC. 2005. Official Method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC, Methods 950.46; 984.13; 2003.05; 962.09 and 942.05.

Aquino-Méndez, EM. 2015. Optimización del proceso de extracción de las proteínas de la torta de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Tesis Mag. Sc. Tec. de Alimentos. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 130p.

Arellano-Acuña, E; Rojas-Zavaleta, I; Paucar-Menacho, LM. 2016. Camu-camu (*Myrciaria dubia*): fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. Scientia Agropecuaria 7(4):433-443.

Belmán-Ramírez, IJ; Sosa-Morales, ME; Cerón-García, A. 2016. Evaluación de componentes bioactivos y compuestos antinutricionales en semillas de mijo perla (*Pennisetum glaucum*). Revista de Divulgación Científica 2(1):1172-1176.

Bonino, J; Cagnassi, L; Giudicci, A; Ibarra, J; Oriolani March, P; Vidal, A; Molina, M; Flores, A; Lopez, D; Montellano Duran, N; Galante, M; Spelzini, D; Boeris, V. 2016. Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales. Energeia 14(14):14-22.

Ceballos-Jaimes, JG. 2018. Estudio de las condiciones de extracción de polifenoles a partir de flores de *Hibiscus rosa sinensis* (Familia *Malvaceae*). Tesis Ing. Químico. Bucaramanga, Colombia, Universidad Industrial de Santander. 64p.

Chaparro, SP; Tavera, ML; Martínez, JJ; Gil, JH. 2014. Propiedades funcionales de la harina y de los aislados proteicos de la semilla de guanábana (*Annona muricata*). Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 17(1):151-159.

Cofré-Martínez, A. 2015. Determinación de polifenoles totales, actividad antioxidante y antocianinas de jugo de murtilla (Ugni molinae Turcz) obtenido por condensación de vapor. Tesis Ing. Alimentos. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile. 45p.

Corona-Jiménez, E; Martínez-Navarrete, N; Ruiz-Espinoza, H; Carranza-Concha, J. 2016. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) y su actividad antioxidante. Agrociencia 50(4):403-412.

Coronado, M; Vega y León, S; Gutiérrez, R; Vásquez, M; Radilla, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista Chilena de Nutrición 42(2):206-212.

Correa Navarro, YM; Buriticá Salazar, LM; Rivera Giraldo, JD; Penagos González, JP; Torres Osorio, JI. 2017. Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays L.*). Revista Faculta de Ciencias Básicas 13(1):60-64.

Cruz-Solórzano, JI; Arana-Sánchez, A; Urías-Silvas, JE. 2013. Obtención de aislados proteicos de la semilla de chía (*Salvia hispanica L.*). Academia Mexicana de Investigacion y Docencia en Ingeniería Química 1(1):3025-3029.

De Souza, AO. 2014. Principais compostos bioativos e capacidade antioxidante no epicarpo do camu-camu (*Myrciaria dubia*) em função da maturação. Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Belén, Brasil, Universidad Federal de Para. 66p.

Domínguez-Gonzáles, JL. 2008. Caracterización de 10 líneas elite de trigo forrajero (*Triticum aestivum L.*) por cuantificación de proteínas y su relación con la calidad. Tesis. Ing. Agrobiología. Coahuila de Zaragoza, México, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 70p.

Flores, D. 2010. Uso histórico: camu-camu (Myrciaria dubia (HBK) Mc Vaugh. Proyecto Perú Biodiverso.

Fracassetti, D; Costa, C; Moulay, L; Tomás-Barberán, FA. 2013. Ellagic acid derivates, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). Food Chemistry 139(2013):578-588.

Fuentes, L; Pérez, Y; Alemán, S; Sosa, D; Sosa, M; González, S; Infante, D; Dominguez, D; Mesa, AR. 2010. Respuesta fisiológica y bioquímica de *Stylosanthes guianensis cv. CIAT-184* y C*entrosema molle* al estrés por cloruro de sodio. Pastos y Forrajes 33(2):1-16.

Garay-Vega, N; Villafuerte-Paredes, E. 2015. Evaluación de diferentes temperaturas de secado en la concentración de antioxidantes y las características organolépticas de la bebida funcional elaborado a partir de la cascara de camu camu (*Myrciaria dubia*). Tesis Ing. Agroindustrial. Pucallpa, Perú, Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia. 108p

González-Jiménez, FE. 2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla de chía (*Salvia hispanica L.*) mediante electroforesis capilar. Tesis Maestría Ciencias en Alimentos. México DF, México, Instituto Politécnico Nacional. 113p.

García-Gutiérrez, MR; Miranda-Rodriguez, CL. 2017. Composición nutricional, propiedades funcionales, componentes bioactivos y actividad antioxidante de dos variedades de semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) de cultivo convencional y orgánico en el Perú. Tesis Lic. Nutrición y Dietética. Lima, Perú, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. 46p.

Gaviria, C; Cifuentes, O; Monsalve, C; Rojano, B. 2007. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Attalea butyracea*. Scientia Et Technica 13(33):297-298.

Grefa-Andi, JL. 2017. Extracción mecánica de la torta de guachanzo (*Caryodendron orinocense Karst*) y su caracterización de proteínas y polifenoles. Tesis Bioqco. Farmacéutico. Riobamba, Ecuador, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 74p.

Guerrero-Ochoa, MR; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). International Journal of Food Science and Technology 50(1):1815-1822.

Guija-Poma, E; Inocente-Camones, MA; Ponce-Pardo, J; Zarzosa-Norabuena, E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horiz Med 15(1):57-60.

Hincapié, A; Omaña, M; Hincapié, C; Arias, Z; Vélez, L. 2010. Efecto de la temperatura de secado sobre las propiedades funcionales de la fibra dietaria presente en la citropulpa. Revista Lasallista de Investigacion 7(2): 85-93.

Kaneshima, T. 2015. Functional constituents in the peel and seed of camu-camu (*Myrciaria dubia*). Food Science and Technology 69(2015).

Kaneshima, T; Myoda, T; Nakata, M; Fujimori, T; Toeda, K; Nishizawa, M. 2016. Antioxidant activity of *C-Glicosidic* ellagitannins from seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*). Food Science and Technology 69(2016):76-81.

Kuskoski, M; Asuero, A; Troncoso, A; Mancini-Filho. J; Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology 25(4):726-732.

Londoño-Londoño, J. 2012. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En Desarrollo y Transversidad serie Lasallista Investigacion y Ciencia. Corporación Universitaria Lasallista. p. 129.

Marín, J. Modelo de diseño unifactorial completamente aleatorizado. Computational Statistics and Data Analysis.

Martin del Campo, ST; Estarrón, M. 2016. Compuestos relacionados con el aroma del mango. Introducción a la tecnología del mango. 1er Ed: 15-45.

Martínez-Pérez, JM. 2014. Determinación de antioxidantes mediante microextracción liquida dispersiva y cromatografía de líquidos: optimización del método de extracción. Tesis Nutr. Hum. y Diet. Alicante, España, Universidad de Alicante. 48p.

Mera-Oyola, L. 2018. Optimización de la extracción de proteína de cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*) utilizando metodología de superficie de respuesta. Tesis Ing. Ind. Alimentarias. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 110p.

Molina-Paredes, KE. 2018. Influencia del pH en la extracción de aislado proteico de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) de la variedad blanca de Juli y Pasankalla. Tesis Ing. Químico. Puno, Perú, Universidad Nacional del Altiplano. 103p.

Naranjo, M; Vélez, L; Rojano, B. 2011. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. Revista Cubana de Plantas Medicinales 16(2):164-173.

Ochoa-Pachas, KG. 2018. Purificación de péptidos de un hidrolizado proteico de cañihua (*Chenopodium pallidicaule Aellen*): con actividad antioxidante y antihipertensiva. Tesis Ing. Ind. Alimentarias. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 108p.

Osorio-Moreno, VE; Escobar-Acevedo, CJ; Zuluaga-Peláez, JJ; Lozano-Useche, F. 2001. El cultivo del camu-camu (Myrciaria dubia (HBK) Mc Vaugh): manejo y utilización. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria Regional.

Ramírez-Pimentel, JG; Herrera-Herrera, A; Aguirre-Mancilla, CL; Covarrubias Prieto, J; Iturriaga de la Fuente, G; Raya-Pérez, JC. 2016. Caracterización de las proteínas de reserva y contenido mineral de semilla de melón (*Cucumis melo L.*). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(8):1667-1678.

Restrepo-Sánchez, DC; Narváez-Cuenca, CE; Restrepo-Sánchez, LP. 2009. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. Química Novoa 32(6):1517-1522.

Rodriguez-Ponce, K; Laura-Vela, EG. 2009. Aprovechamiento de los residuos (cascara y semilla) del despulpado de camu-camu (*Myrciaria dubia H.B.K*) para la obtención de productos derivados en Iquitos. Tesis Ing. Químico. Iquitos, Perú, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. 113p.

Rojano, B; Gaviria, C; Gil, M; Saez, J; Schinella, G; Tournier, H. 2008. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica 15(1):173-181.

Silva de Azevêdo, JC. 2015. Características bioativas, funcionáis e efeito protetor do resíduo desidratado de camu-camu (*Myrciaria dubia H.B.K.* (*Mc. Vaugh*)) sobre doenças degenerativas utilizando modelos *in vivo C. elagens*. Tesis doctorado Ing. Química. Rio Grande del Norte, Brasil, Universidad Federal de Rio Grande del Norte. 147p.

Silva de Azevêdo, JC; Fujita, A; Leandro de Oliveira, E; Genovese, MI; Pinto Correia, RT. 2014. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia H.B.K* (*Mc. Vaugh*)) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. Food Research International 62:934-940.

Sotero-Solis, V; Silva-Doza, L; García de Sotero, D; Imán-Correa, S. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cascara y semilla del fruto del camu-camu (*Myrciaria dubia H.B.K*). Revista de la Sociedad Química del Perú 75(3):293-299.

STATGRAPHICS. 2006. DDE – Diseños de Cribado y Diseño de un Solo Factor Categórico. StatPoint Inc.

Taco-Chisaguano, DR. 2016. Aislamiento y caracterización de las proteínas del grano de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) ecuatoriana, variedad INIAP-Tunkahuán. Tesis Qco. de Alimentos. Quito, Ecuador, Universidad Central del Ecuador. 102p.

Valencia, Z; Cámara, F; Ccapa, K; Catacora, P; Quispe, F. 2017. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de semillas de quinua (*Chenopodium quinoa W.*). Revista Sociedad Química del Perú 83(1):16-29.

Valenzuela-Bustamante, PD. 2015. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni Molinae Turcz. Tesis Qco. Farmacéutico. Santiago, Chile, Universidad de Chile. 83p.

Vasconcelos-Costa, AG; Garcia-Diaz, DF; Jiménez, P; Silva, PI. 2013. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. Journal of Functional Foods 5(2013):539-549.

Villanueva-Tiburcio, JE; Condezo-Hoyos, LA; Ramirez-Asquieri, E. 2010. Antocianinas, acido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cascara de camu-camu (*Myrciaria dubia (HBK) Mc. Vaugh*). Ciencia e Tecnología de Alimentos 30(1):151-160.

Vioque, J; Millan, F. 2006. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. CTC Alimentacion 26:103-107.

Vit, P; Santiago, B; Pérez-Pérez, EM. 2014. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata L*. Interciencia 39(5):350-353.

Yanzapanta-Llambo, AG. 2014. Estudio de la variación de los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y grasa en almendras de cacao fino de aroma en tres diferentes zonas de producción de la amazonia ecuatoriana. Tesis Ing. Alimentos. Ambato, Ecuador, Universidad Técnica de Ambato. 86p.

VIII. ANEXOS

8.1. Curvas estándar utilizadas en la investigación

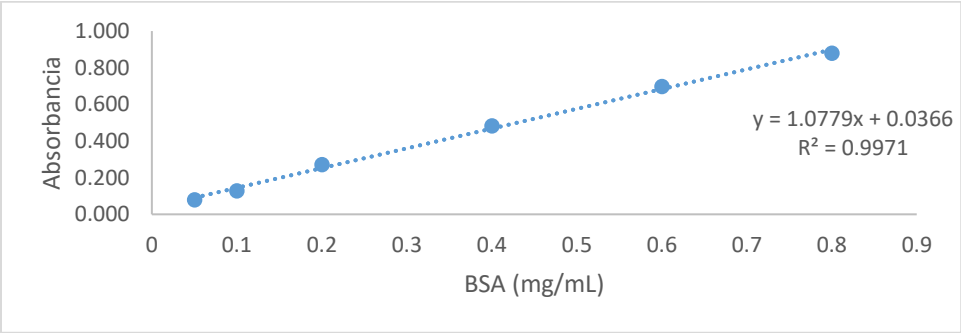


Figura 15. Curva estándar de albumina de suero bovino para proteínas solubles.

Fuente: Elaboración propia.

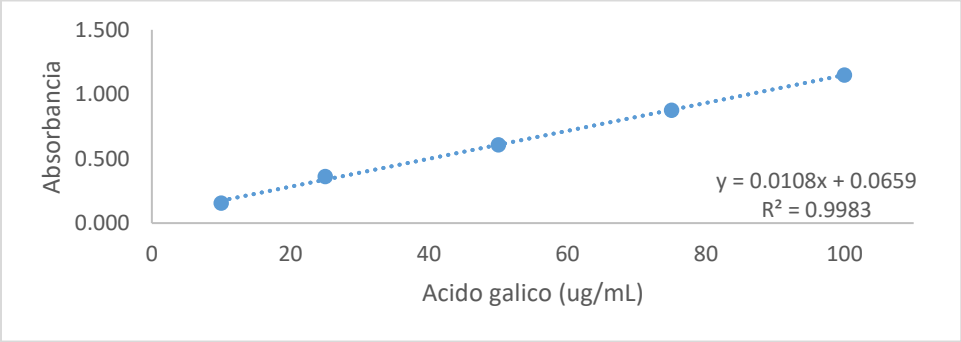


Figura 16. Curva estándar de ácido gálico para polifenoles totales.

Fuente: Elaboración propia.

8.2. Resultados obtenidos en la etapa de cribado

Cuadro 10. Análisis de varianza para proteínas solubles

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón -F*	*Valor-P*
A: Relación Solvente/Muestra	8.48994	1	8.48994	0.57	0.4682
B: pH	27.1259	1	27.1259	1.82	0.2074
C: Concentración de NaCl	2124.59	1	2124.59	142.29	0.0000
D: Temperatura	319.9	1	319.9	21.43	0.0009
E: Tiempo	8.15816	1	8.15816	0.55	0.4768
Error total	149.311	10	14.9311		
Total (corr.)	2637.57	15			

R-cuadrada = 94.3391 porciento, R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.5086 porciento, Error estándar del est. = 3.86407, Error absoluto medio = 2.4205, Estadístico Durbin-Watson = 1.07174 (P=0.0177), Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.340637.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 11. Análisis de varianza para polifenoles totales

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón -F*	*Valor-P*
A: Relación Solvente/Muestra	885.077	1	885.077	0.44	0.5201
B: pH	1170.51	1	1170.51	0.59	0.4610
C: Concentración de NaCl	258921.	1	258921.	130.02	0.0000
D: Temperatura	38441.8	1	38441.8	19.30	0.0013
E: Tiempo	2421.89	1	2421.89	1.22	0.2959
Error total	19913.4	10	1991.34		
Total (corr.)	321754.	15			

R-cuadrada = 93.811 porciento, R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 90.7165 porciento, Error estándar del est. = 44.6245, Error absoluto medio = 29.2333, Estadístico Durbin-Watson = 1.13456 (P=0.0250), Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.33594.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 12. Análisis de varianza para actividad antioxidante

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razó n-F*	*Valor-P*
A: Relación Solvente/Muestra	28.9233	1	28.9233	1.70	0.2211
B: pH	3.03405	1	3.03405	0.18	0.6815
C: Concentración de NaCl	1485.41	1	1485.41	87.47	0.0000
D: Temperatura	45.7952	1	45.7952	2.70	0.1316
E: Tiempo	30.461	1	30.461	1.79	0.2101
Error total	169.825	10	16.9825		
Total (corr.)	1763.45	15			

R-cuadrada = 90.3697 porciento, R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 85.5546 porciento, Error estándar del est. = 4.12098, Error absoluto medio = 2.53173, Estadístico, Durbin-Watson = 2.15222 (P=0.5367), Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.216033.

Fuente: Elaboración propia.

8.3. Resultados obtenidos en la etapa de optimización

Cuadro 13. Pruebas de múltiples rangos para proteínas solubles por temperatura

Temperatura	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
30	3	28.5800	X
40	3	37.3713	X
50	3	44.1617	X
60	3	56.0023	X
70	3	67.0103	X

Método: 95.0 porcentaje LSD (*Least Significant Difference*) Fisher

Fuente: Elaboración propia.

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
30 - 40	*	-8.79133	4.2206
30 - 50	*	-15.5817	4.2206
30 - 60	*	-27.4223	4.2206
30 - 70	*	-38.4303	4.2206
40 - 50	*	-6.79033	4.2206
40 - 60	*	-18.631	4.2206
40 - 70	*	-29.639	4.2206
50 - 60	*	-11.8407	4.2206
50 - 70	*	-22.8487	4.2206
60 - 70	*	-11.008	4.2206

(*) Indica una diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 14. Pruebas de múltiples rangos para polifenoles totales por temperatura

Temperatura	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
30	3	279.107	X
40	3	376.618	X
50	3	425.204	X
60	3	523.327	X
70	3	595.389	X

Método: 95.0 porcentaje LSD (*Least Significant Difference*) Fisher

Fuente: Elaboración propia.

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
30 - 40	*	-97.5103	6.98599
30 - 50	*	-146.097	6.98599
30 - 60	*	-244.22	6.98599
30 - 70	*	-316.281	6.98599
40 - 50	*	-48.5867	6.98599
40 - 60	*	-146.709	6.98599
40 - 70	*	-218.771	6.98599
50 - 60	*	-98.1227	6.98599
50 - 70	*	-170.184	6.98599
60 - 70	*	-72.0617	6.98599

(*) Indica una diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 15. Pruebas de múltiple rango para actividad antioxidante por temperatura.

Temperatura	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*		
60	3	6.18033	X		
50	3	6.454	X		
70	3	6.518	X		
40	3	6.885		X	
30	3	7.802			X

Método: 95.0 porcentaje LSD (*Least Significant Difference*) Fisher

Fuente: Elaboración propia.

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
30 - 40	*	0.917	0.345045
30 - 50	*	1.348	0.345045
30 - 60	*	1.62167	0.345045
30 - 70	*	1.284	0.345045
40 - 50	*	0.431	0.345045
40 - 60	*	0.704667	0.345045
40 - 70	*	0.367	0.345045
50 - 60		0.273667	0.345045
50 - 70		-0.064	0.345045
60 - 70		-0.337667	0.345045

(*) Indica una diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

8.4. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 1

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T1

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																
1.057	2	1´ 5	0.706	0	0	1´ 10	0.815	0	0	1´ 15	0.915	0	0	1´ 3	0.532	0	0
1.057	3		0.626	30	0.5		0.782	30	0.5		0.889	30	0.5		0.433	30	0.5
1.057	4		0.595	60	1		0.769	60	1		0.876	60	1		0.391	60	1
1.056	5		0.572	90	1.5		0.756	90	1.5		0.867	90	1.5		0.363	90	1.5
1.057	6		0.556	120	2		0.747	120	2		0.861	120	2		0.344	120	2
1.057	7		0.541	150	2.5		0.739	150	2.5		0.856	150	2.5		0.33	150	2.5
1.056	8		0.531	180	3		0.732	180	3		0.851	180	3		0.319	180	3
1.057	9		0.521	210	3.5		0.729	210	3.5		0.848	210	3.5		0.31	210	3.5
1.057	10		0.510	240	4		0.728	240	4		0.845	240	4		0.302	240	4
1.057	11		0.502	270	4.5		0.731	270	4.5		0.839	270	4.5		0.296	270	4.5
1.057	12		0.495	300	5		0.721	300	5		0.838	300	5		0.291	300	5
1.057	13		0.489	330	5.5		0.715	330	5.5		0.835	330	5.5		0.287	330	5.5
1.057	14		0.485	360	6		0.711	360	6		0.831	360	6		0.282	360	6
1.057	15		0.481	390	6.5		0.708	390	6.5		0.831	390	6.5		0.28	390	6.5
1.057	16	x	0.479	420	7		0.706	420	7		0.83	420	7		0.278	420	7
1.057	17		0.492	450	7.5		0.702	450	7.5		0.827	450	7.5	x	0.275	450	7.5
1.057	18		0.49	480	8		0.697	480	8		0.824	480	8		0.276	480	8
1.057	19		0.477	510	8.5		0.695	510	8.5		0.823	510	8.5		0.278	510	8.5
1.057	20		0.47	540	9		0.693	540	9		0.821	540	9		0.281	540	9
1.057	21		0.47	570	9.5	x	0.691	570	9.5		0.819	570	9.5		0.281	570	9.5
1.057	Promedio	54.679	0.468	600	10	34.620	0.689	600	10	22.699 x	0.817	600	10	73.981	0.274	600	10

		% Inhibicion	Concentraciones
1			
30	1:15	22.699	2.222222222
	1:10	34.620	3.333333333
0.0333333	1:5	54.679	6.666666667
	1:3	73.981	10.11111111
0.0333333			

y = mx-b	
Donde	
y =	50.000
m =	13.587
b =	0.7191

[redacted] mg/mL

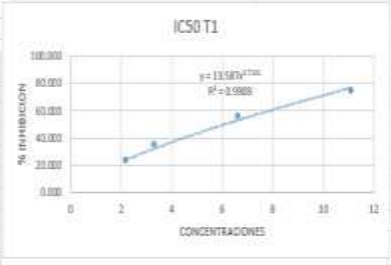


Figura 17. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.5. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 2

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T2

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1	1´ 3	0.733	0	0	1´ 5	0.838	0	0	1´ 10	0.92	0	0	1´ 15	0.971	0	0
1.057	2		0.671	30	0.5		0.802	30	0.5		98	30	0.5		0.964	30	0.5
1.057	3		0.644	60	1		0.785	60	1		0.888	60	1		0.954	60	1
1.056	4		0.628	90	1.5		0.775	90	1.5		0.884	90	1.5		0.951	90	1.5
1.057	5		0.616	120	2		0.766	120	2		0.879	120	2		0.948	120	2
1.057	6		0.608	150	2.5		0.76	150	2.5		0.872	150	2.5		0.945	150	2.5
1.056	7		0.599	180	3		0.755	180	3		0.87	180	3		0.943	180	3
1.057	8		0.589	210	3.5		0.75	210	3.5		0.867	210	3.5		0.941	210	3.5
1.057	9		0.583	240	4		0.744	240	4		0.865	240	4		0.938	240	4
1.057	10		0.576	270	4.5		0.74	270	4.5		0.862	270	4.5		0.936	270	4.5
1.057	11		0.569	300	5		0.735	300	5		0.859	300	5	x	0.936	300	5
1.057	12		0.567	330	5.5		0.739	330	5.5		0.858	330	5.5		0.94	330	5.5
1.057	13		0.557	360	6		0.737	360	6		0.856	360	6		0.937	360	6
1.057	14	x	0.574	390	6.5	x	0.735	390	6.5		0.853	390	6.5		0.934	390	6.5
1.057	15		0.563	420	7		0.732	420	7		0.851	420	7		0.935	420	7
1.057	16		0.555	450	7.5		0.729	450	7.5		0.850	450	7.5		0.935	450	7.5
1.057	17		0.554	480	8		0.725	480	8		0.849	480	8		0.934	480	8
1.057	18		0.555	510	8.5		0.723	510	8.5		0.848	510	8.5		0.933	510	8.5
1.057	19		0.555	540	9		0.72	540	9	x	0.847	540	9		0.933	540	9
1.057	20		0.548	570	9.5		0.716	570	9.5		0.845	570	9.5		0.932	570	9.5
1.057	21		0.544	600	10		0.714	600	10		0.844	600	10		0.931	600	10
1.057	Promedio	47.299				30.457				19.860				11.440			

		% Inhibicion	Concentraciones			
1						
60	1: 3	47.299	5.555555556	y = mx-b		
	1: 5	30.457	3.333333333	Donde		
0.0166667	1: 10	19.860	1.666666667	y =	50.000	
	1: 15	11.440	1.111111111	m =	11.415	
	1: 156173.6842			b =	0.837	
	1: 0					
	1: 0					
					5.594035	mg/mL

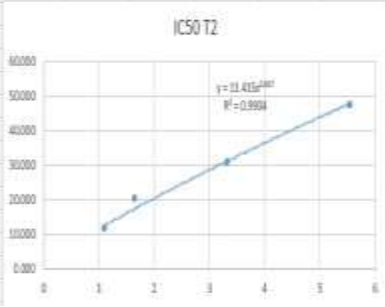


Figura 18. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.6. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 3

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T3

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1		0.642	0	0		0.786	0	0		0.877	0	0		0.915	0	0
1.057	2	1´3	0.546	30	0.5	1´5	0.71	30	0.5	1´10	0.831	30	0.5	1´15	0.882	30	0.5
1.057	3		0.503	60	1		0.678	60	1		0.809	60	1		0.868	60	1
1.056	4		0.476	90	1.5		0.655	90	1.5		0.795	90	1.5		0.859	90	1.5
1.057	5		0.455	120	2		0.637	120	2		0.784	120	2		0.850	120	2
1.057	6		0.44	150	2.5		0.624	150	2.5		0.776	150	2.5		0.844	150	2.5
1.056	7		0.428	180	3		0.612	180	3		0.767	180	3		0.841	180	3
1.057	8		0.417	210	3.5		0.605	210	3.5		0.76	210	3.5	x	0.835	210	3.5
1.057	9		0.407	240	4		0.600	240	4		0.754	240	4		0.836	240	4
1.057	10		0.400	270	4.5		0.597	270	4.5		0.753	270	4.5		0.829	270	4.5
1.057	11		0.394	300	5		0.585	300	5		0.746	300	5		0.825	300	5
1.057	12		0.389	330	5.5		0.58	330	5.5		0.742	330	5.5		0.823	330	5.5
1.057	13		0.385	360	6		0.576	360	6		0.737	360	6		0.821	360	6
1.057	14		0.381	390	6.5		0.564	390	6.5		0.733	390	6.5		0.817	390	6.5
1.057	15		0.376	420	7		0.562	420	7		0.73	420	7		0.815	420	7
1.057	16		0.373	450	7.5		0.559	450	7.5	x	0.727	450	7.5		0.814	450	7.5
1.057	17		0.37	480	8		0.555	480	8		0.725	480	8		0.813	480	8
1.057	18		0.366	510	8.5		0.551	510	8.5		0.722	510	8.5		0.809	510	8.5
1.057	19		0.363	540	9	x	0.547	540	9		0.72	540	9		0.807	540	9
1.057	20	x	0.36	570	9.5		0.544	570	9.5		0.717	570	9.5		0.805	570	9.5
1.057	21		0.358	600	10		0.54	600	10		0.715	600	10		0.802	600	10
1.057	Promedio	65.938				48.245				31.214				20.996			

		% Inhibicion	Concentraciones
1			
30	1:3	65.938	11.1111111
	1:5	48.245	6.666666667
0.0333333	1:10	31.214	3.333333333
	1:15	20.996	2.222222222

y = mx+b	
Donde	
y =	50.000
m =	12.692
b =	0.6954
	7.562838 mg/mL

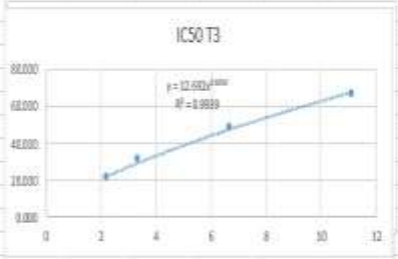


Figura 19. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.7. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 4

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T4

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1		0.731	0	0		0.797	0	0		0.905	0	0		0.929	0	0
1.057	2	1´ 3	0.665	30	0.5	1´ 5	0.779	30	0.5	1´ 10	0.879	30	0.5	1´ 15	0.92	30	0.5
1.057	3		0.635	60	1		0.763	60	1		0.870	60	1		0.913	60	1
1.056	4		0.615	90	1.5		0.752	90	1.5		0.861	90	1.5		0.908	90	1.5
1.057	5		0.599	120	2		0.743	120	2		0.855	120	2		0.905	120	2
1.057	6		0.588	150	2.5		0.736	150	2.5		0.851	150	2.5		0.901	150	2.5
1.056	7		0.576	180	3		0.73	180	3	x	0.847	180	3		0.897	180	3
1.057	8		0.566	210	3.5		0.723	210	3.5		0.844	210	3.5		0.895	210	3.5
1.057	9		0.554	240	4		0.720	240	4		0.841	240	4		0.896	240	4
1.057	10		0.547	270	4.5		0.711	270	4.5		0.839	270	4.5		0.897	270	4.5
1.057	11		0.552	300	5		0.705	300	5		0.835	300	5		0.893	300	5
1.057	12		0.545	330	5.5	x	0.698	330	5.5		0.832	330	5.5		0.893	330	5.5
1.057	13		0.542	360	6		0.703	360	6		0.83	360	6		0.892	360	6
1.057	14		0.535	390	6.5		0.697	390	6.5		0.827	390	6.5		0.891	390	6.5
1.057	15		0.527	420	7		0.694	420	7		0.826	420	7		0.889	420	7
1.057	16		0.525	450	7.5		0.693	450	7.5		0.825	450	7.5		0.888	450	7.5
1.057	17		0.523	480	8		0.689	480	8		0.824	480	8		0.887	480	8
1.057	18		0.518	510	8.5		0.688	510	8.5		0.822	510	8.5		0.886	510	8.5
1.057	19		0.513	540	9		0.685	540	9		0.82	540	9		0.885	540	9
1.057	20		0.51	570	9.5		0.682	570	9.5		0.819	570	9.5	x	0.884	570	9.5
1.057	21		0.507	600	10		0.679	600	10		0.817	600	10		0.882	600	10
1.057	Promedio	52.030 x				33.958				19.860				16.360			

		% Inhibicion	Concentraciones
1			
60	1: 3	52.030	5.555555556
	1: 5	33.958	3.333333333
0.0166667	1: 10	19.860	1.666666667
	1: 15	16.360	1.111111111

y = mx-b
Donde
y = 50.000
m = 14.438
b = 0.7302

5.4000934 mg/mL

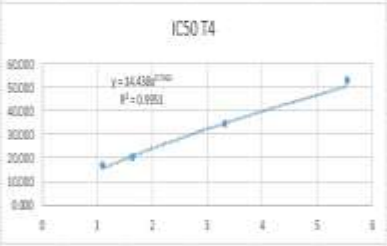


Figura 20. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.8. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 5

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T5

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																
1.057	2	1: 3	0.891	0	0	1: 5	0.916	0	0	1: 10	0.962	0	0	1: 15	0.985	0	0
1.057	3		0.859	30	0.5		0.894	30	0.5		0.948	30	0.5		0.977	30	0.5
1.057	4		0.844	60	1		0.883	60	1		0.941	60	1		0.973	60	1
1.056	5		0.834	90	1.5		0.876	90	1.5		0.937	90	1.5		0.969	90	1.5
1.057	6		0.827	120	2		0.871	120	2		0.934	120	2		0.967	120	2
1.057	7		0.821	150	2.5		0.866	150	2.5		0.931	150	2.5		0.965	150	2.5
1.056	8		0.815	180	3		0.862	180	3		0.929	180	3		0.964	180	3
1.057	9		0.810	210	3.5		0.859	210	3.5		0.927	210	3.5		0.962	210	3.5
1.057	10		0.809	240	4		0.855	240	4		0.925	240	4		0.959	240	4
1.057	11		0.808	270	4.5		0.853	270	4.5	x	0.923	270	4.5		0.959	270	4.5
1.057	12		0.802	300	5		0.85	300	5		0.922	300	5	x	0.959	300	5
1.057	13		0.799	330	5.5		0.848	330	5.5		0.92	330	5.5		0.957	330	5.5
1.057	14		0.798	360	6		0.846	360	6		0.919	360	6		0.956	360	6
1.057	15		0.793	390	6.5		0.844	390	6.5		0.918	390	6.5		0.957	390	6.5
1.057	16		0.793	420	7		0.842	420	7		0.917	420	7		0.957	420	7
1.057	17		0.789	450	7.5		0.84	450	7.5		0.915	450	7.5		0.956	450	7.5
1.057	18		0.786	480	8		0.838	480	8		0.914	480	8		0.954	480	8
1.057	19		0.785	510	8.5		0.837	510	8.5		0.914	510	8.5		0.955	510	8.5
1.057	20		0.784	540	9	x	0.837	540	9		0.912	540	9		0.954	540	9
1.057	21		0.782	570	9.5		0.835	570	9.5	x	0.912	570	9.5		0.954	570	9.5
1.057	Promedio	26.200 x	0.780	600	10	20.806	0.833	600	10	12.670	0.911	600	10	9.263	0.953	600	10

		% Inhibicion	Concentraciones
1			
30	1: 3	26.200	11.111111111
	1: 5	20.806	6.666666667
0.0333333	1: 10	12.670	3.333333333
	1: 15	9.263	2.222222222

y = mx+b
Donde
y = 50.000
m = 5.6679
b = 0.6543

27.36548 mg/mL

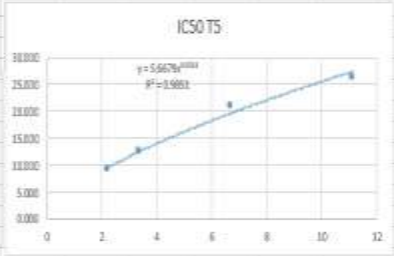


Figura 21. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.9. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 6

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T6

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																
1.057	2	1' 3	0.895	0	0	1' 5	0.926	0	0	1' 10	0.959	0	0	1' 15	0.977	0	0
1.057	3		0.873	30	0.5		0.909	30	0.5		0.955	30	0.5		0.969	30	0.5
1.057	4		0.862	60	1		0.902	60	1		0.954	60	1		0.966	60	1
1.056	5		0.853	90	1.5		0.897	90	1.5		0.953	90	1.5		0.964	90	1.5
1.057	6		0.847	120	2		0.893	120	2		0.953	120	2		0.962	120	2
1.057	7		0.843	150	2.5		0.889	150	2.5		0.952	150	2.5		0.961	150	2.5
1.056	8		0.839	180	3		0.886	180	3		0.944	180	3		0.962	180	3
1.057	9		0.835	210	3.5		0.883	210	3.5		0.944	210	3.5		0.961	210	3.5
1.057	10	x	0.830	240	4		0.883	240	4	x	0.943	240	4		0.960	240	4
1.057	11		0.833	270	4.5		0.88	270	4.5		0.946	270	4.5		0.959	270	4.5
1.057	12		0.826	300	5		0.881	300	5		0.942	300	5		0.958	300	5
1.057	13		0.824	330	5.5		0.879	330	5.5		0.939	330	5.5		0.957	330	5.5
1.057	14		0.820	360	6		0.877	360	6		0.941	360	6		0.957	360	6
1.057	15		0.819	390	6.5		0.876	390	6.5		0.939	390	6.5		0.954	390	6.5
1.057	16		0.817	420	7		0.874	420	7		0.938	420	7		0.955	420	7
1.057	17		0.816	450	7.5		0.873	450	7.5		0.939	450	7.5		0.954	450	7.5
1.057	18		0.814	480	8		0.872	480	8		0.937	480	8		0.954	480	8
1.057	19		0.813	510	8.5		0.871	510	8.5		0.937	510	8.5	x	0.954	510	8.5
1.057	20		0.81	540	9		0.87	540	9		0.936	540	9		0.953	540	9
1.057	21		0.809	570	9.5		0.869	570	9.5		0.935	570	9.5		0.952	570	9.5
1.057	Promedio	21.469	0.808	600	10	17.873 x	0.868	600	10	11.534	0.935	600	10	9.736	0.952	600	10

		% Inhibicion	Concentraciones
1			
60	1: 3	21.469	5.555555556
	1: 5	17.873	3.333333333
0.0166667	1: 10	11.534	1.666666667
	1: 15	9.736	1.111111111

y = mx-b
Donde
y = 50.000
m = 9.1592
b = 0.5126

23.414963 mg/mL

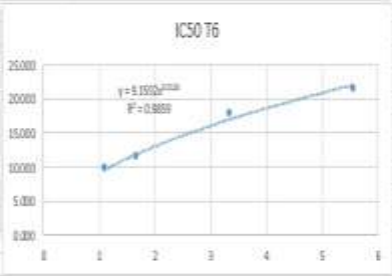


Figura 22. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.10. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 7

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T7

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1		0.95	0	0		0.98	0	0		0.973	0	0		0.991	0	0
1.057	2	1´ 3	0.917	30	0.5	1´ 5	0.949	30	0.5	1´ 10	0.958	30	0.5	1´ 15	0.978	30	0.5
1.057	3		0.899	60	1		0.93	60	1		0.960	60	1		0.973	60	1
1.056	4		0.896	90	1.5		0.919	90	1.5		0.956	90	1.5		0.970	90	1.5
1.057	5		0.876	120	2		0.910	120	2		0.953	120	2		0.967	120	2
1.057	6		0.867	150	2.5		0.902	150	2.5		0.95	150	2.5		0.966	150	2.5
1.056	7		0.86	180	3		0.895	180	3		0.948	180	3		0.964	180	3
1.057	8		0.853	210	3.5		0.89	210	3.5		0.946	210	3.5		0.963	210	3.5
1.057	9		0.847	240	4		0.884	240	4		0.944	240	4		0.961	240	4
1.057	10		0.841	270	4.5		0.88	270	4.5		0.942	270	4.5		0.96	270	4.5
1.057	11		0.836	300	5		0.876	300	5		0.941	300	5		0.959	300	5
1.057	12		0.831	330	5.5		0.872	330	5.5		0.939	330	5.5		0.958	330	5.5
1.057	13		0.826	360	6		0.868	360	6		0.938	360	6		0.957	360	6
1.057	14		0.822	390	6.5		0.865	390	6.5		0.937	390	6.5		0.957	390	6.5
1.057	15		0.818	420	7		0.861	420	7		0.936	420	7		0.956	420	7
1.057	16		0.814	450	7.5		0.858	450	7.5		0.935	450	7.5		0.955	450	7.5
1.057	17		0.811	480	8		0.855	480	8	x	0.934	480	8		0.955	480	8
1.057	18	x	0.807	510	8.5		0.852	510	8.5		0.932	510	8.5		0.954	510	8.5
1.057	19		0.803	540	9		0.849	540	9		0.932	540	9	x	0.954	540	9
1.057	20		0.8	570	9.5	x	0.847	570	9.5		0.931	570	9.5		0.954	570	9.5
1.057	21		0.797	600	10		0.844	600	10		0.93	600	10		0.953	600	10
1.057	Promedio	24.591				20.144				9.169				8.885			

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
30	1	3	24.591	11.1111111
	1	5	20.144	6.666666667
0.0333333	1	10	9.169	3.333333333
	1	15	8.885	2.222222222

y = mx-b
Donde
y = 50.000
m = 4.6057
b = 0.7128

26.478338 mg/mL

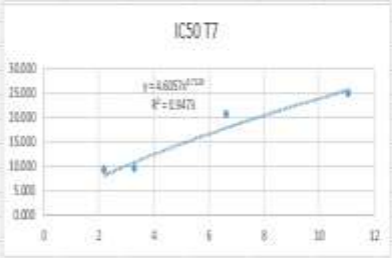


Figura 23. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.11. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 8

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T8

1.057	1	Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	2	1' 3	0.954	0	0	1' 5	0.994	0	0	1' 10	0.982	0	0	1' 15	0.994	0	0
1.057	3		0.923	30	0.5		0.973	30	0.5		0.975	30	0.5		0.989	30	0.5
1.057	4		0.91	60	1		0.963	60	1		0.972	60	1		0.988	60	1
1.056	5		0.9	90	1.5		0.955	90	1.5		0.97	90	1.5		0.986	90	1.5
1.057	6		0.893	120	2		0.95	120	2		0.968	120	2		0.985	120	2
1.057	7		0.886	150	2.5		0.945	150	2.5		0.967	150	2.5		0.984	150	2.5
1.056	8		0.881	180	3		0.941	180	3		0.965	180	3	x	0.984	180	3
1.057	9		0.876	210	3.5		0.937	210	3.5		0.964	210	3.5		0.985	210	3.5
1.057	10		0.871	240	4		0.934	240	4		0.963	240	4		0.986	240	4
1.057	11		0.869	270	4.5		0.930	270	4.5		0.962	270	4.5		0.986	270	4.5
1.057	12		0.863	300	5		0.928	300	5	x	0.962	300	5		0.983	300	5
1.057	13		0.86	330	5.5		0.925	330	5.5		0.961	330	5.5		0.982	330	5.5
1.057	14		0.857	360	6		0.923	360	6		0.96	360	6		0.981	360	6
1.057	15		0.854	390	6.5		0.92	390	6.5		0.959	390	6.5		0.98	390	6.5
1.057	16		0.852	420	7		0.918	420	7		0.959	420	7		0.979	420	7
1.057	17		0.849	450	7.5	x	0.918	450	7.5		0.958	450	7.5		0.978	450	7.5
1.057	18		0.847	480	8		0.915	480	8		0.957	480	8		0.978	480	8
1.057	19		0.844	510	8.5		0.914	510	8.5		0.957	510	8.5		0.978	510	8.5
1.057	20		0.842	540	9		0.912	540	9		0.956	540	9		0.978	540	9
1.057	21		0.84	570	9.5		0.915	570	9.5		0.956	570	9.5		0.978	570	9.5
1.057	Promedio	20.712 x	0.838	600	10	13.143	0.909	600	10	8.979	0.955	600	10	7.466 x	0.978	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones			
1							
60	1	3	20.712	5.555555556	y = mx+b		
	1	5	13.143	3.333333333	Donde		
0.0166667	1	10	8.979	1.666666667	y =	50.000	
	1	15	7.466	1.111111111	m =	6.8942	
					b =	0.6243	
						25.049556	mg/mL

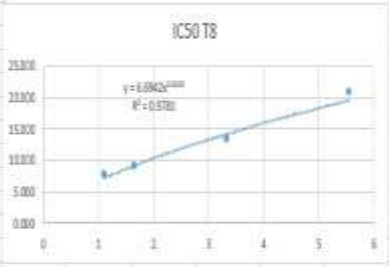


Figura 24. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.12. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 9

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T9

1.057	1		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	2		1´3	0.535	0	0	1´5	0.64	0	0	1´10	0.761	0	0	1´15	0.813	0	0
1.057	3			0.391	30	0.5		0.52	30	0.5		0.683	30	0.5		0.758	30	0.5
1.057	4			0.338	60	1		0.47	60	1		0.652	60	1		0.738	60	1
1.056	5			0.307	90	1.5		0.438	90	1.5		0.629	90	1.5		0.724	90	1.5
1.057	6			0.286	120	2	x	0.415	120	2		0.612	120	2		0.712	120	2
1.057	7			0.271	150	2.5		0.397	150	2.5		0.599	150	2.5		0.703	150	2.5
1.056	8			0.26	180	3		0.383	180	3		0.59	180	3		0.695	180	3
1.057	9			0.252	210	3.5		0.368	210	3.5		0.578	210	3.5		0.688	210	3.5
1.057	10			0.247	240	4		0.357	240	4		0.571	240	4		0.682	240	4
1.057	11			0.243	270	4.5		0.347	270	4.5	x	0.564	270	4.5		0.677	270	4.5
1.057	12			0.239	300	5		0.341	300	5		0.558	300	5		0.671	300	5
1.057	13			0.236	330	5.5		0.331	330	5.5		0.55	330	5.5		0.667	330	5.5
1.057	14			0.235	360	6		0.326	360	6		0.545	360	6		0.664	360	6
1.057	15			0.234	390	6.5		0.32	390	6.5		0.541	390	6.5		0.66	390	6.5
1.057	16			0.232	420	7		0.313	420	7		0.538	420	7		0.656	420	7
1.057	17			0.232	450	7.5		0.307	450	7.5		0.534	450	7.5		0.653	450	7.5
1.057	18			0.231	480	8		0.302	480	8		0.529	480	8		0.650	480	8
1.057	19			0.23	510	8.5		0.298	510	8.5		0.525	510	8.5	x	0.647	510	8.5
1.057	20			0.23	540	9		0.293	540	9		0.522	540	9		0.645	540	9
1.057	21			0.23	570	9.5		0.29	570	9.5		0.536	570	9.5		0.642	570	9.5
1.057	Promedio		78.238 x	0.23	600	10	60.734	0.297	600	10	46.637	0.538	600	10	38.784	0.64	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
30	1	3	78.238	11.111111
	1	5	60.734	6.666666667
0.0333333	1	10	46.637	3.333333333
	1	15	38.784	2.222222222

y = mx+b
Donde
y = 50.000
m = 27.578
b = 0.4278

4.082545 mg/mL

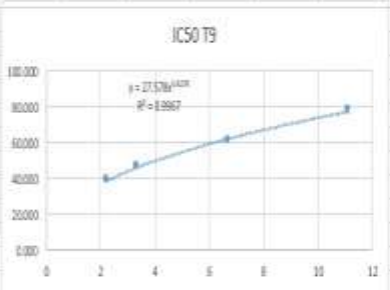


Figura 25. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.13. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 10

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T10

			Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1	Diluciones															
1.057	2	1´3	0.596	0	0	1´5	0.701	0	0	1´10	0.832	0	0	1´15	0.884	0	0
1.057	3		0.475	30	0.5		0.657	30	0.5		0.796	30	0.5		0.861	30	0.5
1.057	4		0.424	60	1		0.633	60	1		0.781	60	1		0.852	60	1
1.056	5		0.392	90	1.5		0.616	90	1.5		0.769	90	1.5		0.846	90	1.5
1.057	6		0.37	120	2		0.605	120	2		0.763	120	2		0.841	120	2
1.057	7		0.353	150	2.5		0.593	150	2.5		0.757	150	2.5		0.837	150	2.5
1.056	8		0.339	180	3		0.584	180	3		0.75	180	3		0.835	180	3
1.057	9		0.327	210	3.5	x	0.577	210	3.5		0.746	210	3.5		0.831	210	3.5
1.057	10		0.316	240	4		0.579	240	4		0.742	240	4		0.829	240	4
1.057	11		0.306	270	4.5		0.571	270	4.5		0.739	270	4.5		0.827	270	4.5
1.057	12		0.297	300	5		0.559	300	5	x	0.737	300	5		0.826	300	5
1.057	13		0.288	330	5.5		0.557	330	5.5		0.743	330	5.5		0.824	330	5.5
1.057	14		0.281	360	6		0.553	360	6		0.735	360	6		0.822	360	6
1.057	15		0.271	390	6.5		0.546	390	6.5		0.738	390	6.5		0.82	390	6.5
1.057	16		0.266	420	7		0.541	420	7		0.734	420	7	x	0.818	420	7
1.057	17		0.261	450	7.5		0.538	450	7.5		0.729	450	7.5		0.817	450	7.5
1.057	18		0.256	480	8		0.535	480	8		0.728	480	8		0.815	480	8
1.057	19		0.252	510	8.5		0.531	510	8.5		0.726	510	8.5		0.814	510	8.5
1.057	20		0.248	540	9		0.527	540	9		0.726	540	9		0.812	540	9
1.057	21	x	0.244	570	9.5		0.524	570	9.5		0.722	570	9.5		0.811	570	9.5
1.057	Promedio	76.914	0.241	600	10	45.407	0.521	600	10	30.268	0.719	600	10	22.604	0.81	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
60	1	3	76.914	5.555555556
	1	5	45.407	3.333333333
0.0166667	1	10	30.268	1.666666667
	1	15	22.604	1.111111111

y = mx+b
Donde
y = 50.000
m = 20.515
b = 0.7361

3.554301 mg/mL

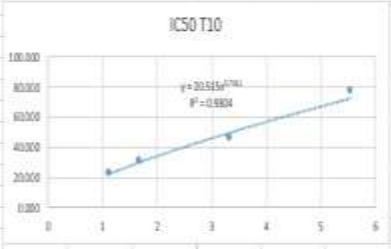


Figura 26. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.14. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 11

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T11

1.057	1		Diluciones		Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)
1.057	2		1´ 3		0.627	0	0		1´ 5	0.698	0	0		1´ 10	0.779	0	0		1´ 15	0.809	0	0
1.057	3				0.511	30	0.5			0.583	30	0.5			0.705	30	0.5			0.779	30	0.5
1.057	4				0.474	60	1			0.537	60	1			0.674	60	1			0.761	60	1
1.056	5				0.455	90	1.5			0.509	90	1.5			0.652	90	1.5			0.748	90	1.5
1.057	6				0.445	120	2			0.489	120	2			0.634	120	2			0.738	120	2
1.057	7				0.44	150	2.5			0.473	150	2.5			0.621	150	2.5			0.73	150	2.5
1.056	8				0.437	180	3			0.46	180	3			0.609	180	3			0.723	180	3
1.057	9				0.436	210	3.5			0.451	210	3.5			0.599	210	3.5			0.716	210	3.5
1.057	10			x	0.435	240	4			0.444	240	4		x	0.591	240	4			0.714	240	4
1.057	11				0.435	270	4.5			0.434	270	4.5			0.584	270	4.5			0.709	270	4.5
1.057	12				0.436	300	5			0.432	300	5			0.577	300	5			0.705	300	5
1.057	13				0.436	330	5.5			0.426	330	5.5			0.57	330	5.5			0.701	330	5.5
1.057	14				0.436	360	6		x	0.42	360	6			0.568	360	6			0.698	360	6
1.057	15				0.437	390	6.5			0.415	390	6.5			0.56	390	6.5			0.695	390	6.5
1.057	16				0.439	420	7			0.411	420	7			0.569	420	7			0.691	420	7
1.057	17				0.438	450	7.5			0.406	450	7.5			0.560	450	7.5			0.688	450	7.5
1.057	18				0.44	480	8			0.401	480	8			0.554	480	8			0.684	480	8
1.057	19				0.44	510	8.5			0.397	510	8.5			0.549	510	8.5			0.682	510	8.5
1.057	20				0.44	540	9			0.394	540	9			0.549	540	9			0.679	540	9
1.057	21				0.442	570	9.5			0.392	570	9.5			0.547	570	9.5			0.679	570	9.5
1.057	Promedio		58.842		0.442	600	10		49.191	0.389	600	10		44.082	0.542	600	10		32.444 x	0.673	600	10

1			% Inhibicion	Concentraciones
30	1:	3	58.842	11.111111111
	1:	5	49.191	6.666666667
0.0333333	1:	10	44.082	3.333333333
	1:	15	32.444	2.222222222

y = mx-b	
Donde	
y =	50.000
m =	26.639
b =	0.334

6.5014728 mg/mL

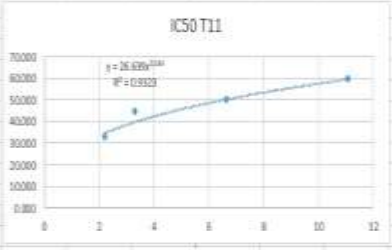


Figura 27. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.15. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 12

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T12

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																
1.057	2	1' 3	0.713	0	0	1' 5	0.757	0	0	1' 10	0.872	0	0	1' 15	0.903	0	0
1.057	3		0.632	30	0.5		0.735	30	0.5		0.832	30	0.5		0.876	30	0.5
1.057	4		0.594	60	1		0.707	60	1		0.816	60	1		0.865	60	1
1.056	5		0.567	90	1.5		0.69	90	1.5		0.804	90	1.5		0.857	90	1.5
1.057	6		0.546	120	2		0.675	120	2		0.795	120	2		0.852	120	2
1.057	7		0.53	150	2.5		0.665	150	2.5		0.788	150	2.5		0.847	150	2.5
1.056	8		0.515	180	3		0.654	180	3		0.783	180	3		0.843	180	3
1.057	9		0.506	210	3.5		0.646	210	3.5		0.777	210	3.5		0.84	210	3.5
1.057	10		0.497	240	4		0.639	240	4		0.773	240	4		0.837	240	4
1.057	11		0.488	270	4.5		0.633	270	4.5		0.77	270	4.5		0.834	270	4.5
1.057	12		0.48	300	5		0.627	300	5		0.767	300	5		0.831	300	5
1.057	13		0.472	330	5.5		0.623	330	5.5		0.764	330	5.5		0.829	330	5.5
1.057	14		0.465	360	6		0.619	360	6		0.761	360	6		0.826	360	6
1.057	15		0.458	390	6.5		0.614	390	6.5		0.758	390	6.5		0.824	390	6.5
1.057	16		0.452	420	7		0.61	420	7		0.756	420	7		0.822	420	7
1.057	17		0.447	450	7.5		0.606	450	7.5		0.753	450	7.5	x	0.820	450	7.5
1.057	18		0.442	480	8		0.602	480	8		0.751	480	8		0.819	480	8
1.057	19		0.437	510	8.5		0.599	510	8.5		0.749	510	8.5		0.817	510	8.5
1.057	20	x	0.432	540	9		0.596	540	9		0.747	540	9		0.816	540	9
1.057	21		0.428	570	9.5		0.593	570	9.5		0.745	570	9.5		0.814	570	9.5
1.057	Promedio	59.126	0.424	600	10	44.177 x	0.59	600	10	29.700 x	0.743	600	10	22.415	0.812	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
60	1	3	59.126	5.555555556
	1	5	44.177	3.333333333
0.0166667	1	10	29.700	1.666666667
	1	15	22.415	1.111111111

y = mx+b	
Donde	
y =	50.000
m =	21.424
b =	0.5971

4.1055556 mg/mL

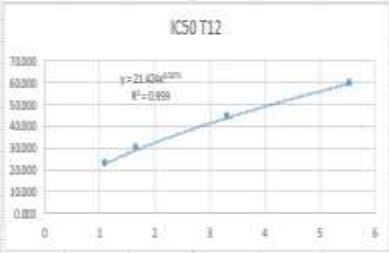


Figura 28. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.16. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 13

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T13

			Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																	
1.057	2		1´ 3	0.827	0	0	1´ 5	0.86	0	0	1´ 10	0.902	0	0	1´ 15	0.904	0	0
1.057	3			0.766	30	0.5		0.825	30	0.5		0.878	30	0.5		0.887	30	0.5
1.057	4			0.737	60	1		0.807	60	1		0.869	60	1		0.882	60	1
1.056	5			0.72	90	1.5		0.795	90	1.5		0.854	90	1.5		0.878	90	1.5
1.057	6			0.705	120	2		0.787	120	2		0.846	120	2		0.875	120	2
1.057	7			0.696	150	2.5		0.78	150	2.5		0.841	150	2.5		0.869	150	2.5
1.056	8			0.687	180	3		0.774	180	3		0.837	180	3		0.865	180	3
1.057	9			0.678	210	3.5		0.768	210	3.5		0.834	210	3.5		0.863	210	3.5
1.057	10			0.671	240	4		0.762	240	4		0.831	240	4		0.861	240	4
1.057	11			0.664	270	4.5		0.757	270	4.5		0.828	270	4.5		0.859	270	4.5
1.057	12			0.657	300	5		0.751	300	5		0.826	300	5		0.857	300	5
1.057	13			0.651	330	5.5		0.747	330	5.5		0.824	330	5.5		0.856	330	5.5
1.057	14			0.647	360	6		0.744	360	6		0.822	360	6		0.854	360	6
1.057	15			0.641	390	6.5		0.74	390	6.5	X	0.82	390	6.5		0.853	390	6.5
1.057	16			0.636	420	7		0.736	420	7		0.819	420	7		0.852	420	7
1.057	17			0.63	450	7.5		0.734	450	7.5		0.819	450	7.5		0.851	450	7.5
1.057	18			0.626	480	8		0.734	480	8		0.818	480	8	x	0.850	480	8
1.057	19		x	0.622	510	8.5		0.732	510	8.5		0.819	510	8.5		0.851	510	8.5
1.057	20			0.617	540	9		0.73	540	9		0.82	540	9		0.853	540	9
1.057	21			0.613	570	9.5	X	0.728	570	9.5		0.819	570	9.5		0.852	570	9.5
1.057	Promedio		41.149	0.609	600	10	31.120	0.725	600	10	22.415	0.816	600	10	19.576	0.849	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
30	1	3	41.149	11.11111111
	1	5	31.120	6.666666667
0.0333333	1	10	22.415	3.333333333
	1	15	19.576	2.222222222

y = mx-b
Donde
y = 50.000
m = 13.15
b = 0.465

12.6639 mg/mL

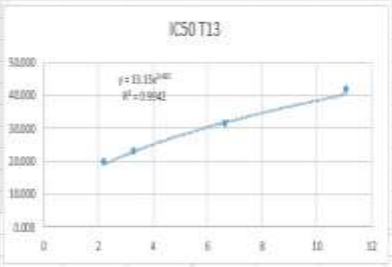


Figura 29. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.17. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 14

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 516nm durante 10 min, cada 30 segundos — T14

1.057	1		Diluciones		Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)
1.057	2		1´ 3		0.863	0	0		1´ 5	0.88	0	0		1´ 10	0.905	0	0		1´ 15	0.921	0	0
1.057	3				0.828	30	0.5			0.86	30	0.5			0.893	30	0.5			0.911	30	0.5
1.057	4				0.813	60	1			0.85	60	1			0.886	60	1			0.907	60	1
1.056	5				0.803	90	1.5			0.843	90	1.5			0.881	90	1.5			0.904	90	1.5
1.057	6				0.795	120	2			0.838	120	2			0.878	120	2			0.902	120	2
1.057	7				0.789	150	2.5			0.834	150	2.5			0.876	150	2.5			0.901	150	2.5
1.056	8				0.783	180	3			0.83	180	3			0.875	180	3			0.899	180	3
1.057	9				0.779	210	3.5			0.826	210	3.5			0.873	210	3.5			0.898	210	3.5
1.057	10				0.775	240	4			0.823	240	4			0.871	240	4			0.897	240	4
1.057	11				0.771	270	4.5			0.82	270	4.5			0.869	270	4.5			0.895	270	4.5
1.057	12				0.768	300	5			0.817	300	5			0.868	300	5		x	0.895	300	5
1.057	13				0.765	330	5.5		x	0.815	330	5.5			0.867	330	5.5			0.898	330	5.5
1.057	14				0.762	360	6			0.817	360	6			0.872	360	6			0.9	360	6
1.057	15				0.76	390	6.5			0.82	390	6.5			0.87	390	6.5			0.902	390	6.5
1.057	16				0.757	420	7			0.821	420	7		x	0.867	420	7			0.899	420	7
1.057	17				0.754	450	7.5			0.816	450	7.5			0.866	450	7.5			0.899	450	7.5
1.057	18				0.754	480	8			0.814	480	8			0.865	480	8			0.899	480	8
1.057	19				0.751	510	8.5			0.812	510	8.5			0.864	510	8.5			0.899	510	8.5
1.057	20		x		0.749	540	9			0.812	540	9			0.864	540	9			0.898	540	9
1.057	21				0.751	570	9.5			0.81	570	9.5			0.864	570	9.5			0.897	570	9.5
1.057	Promedio		29.133		0.756	600	10		22.320	0.809	600	10		17.968	0.863	600	10		15.319	0.897	600	10

1			% Inhibicion	Concentraciones		
60	1	3	29.133	5.555555556	y = mx-b	
	1	5	22.320	3.333333333	Donde	
0.0166667	1	10	17.968	1.666666667	y =	50.000
	1	15	15.319	1.111111111	m =	14.611
					b =	0.387

24.021188 mg/mL

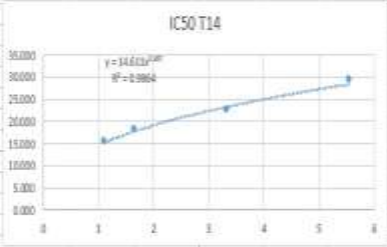


Figura 30. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.18. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 15

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T15

		Diluciones	Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)		Abs	T(seg)	T(min)
1.057	1																
1.057	2	1´ 3	0.999	0	0	1´ 5	0.993	0	0	1´ 10	0.975	0	0	1´ 15	1	0	0
1.057	3		0.959	30	0.5		0.940	30	0.5		0.959	30	0.5		0.977	30	0.5
1.057	4		0.933	60	1		0.923	60	1	x	0.951	60	1	x	0.967	60	1
1.056	5		0.918	90	1.5		0.914	90	1.5		0.946	90	1.5		0.959	90	1.5
1.057	6		0.904	120	2		0.906	120	2		0.942	120	2		0.955	120	2
1.057	7		0.894	150	2.5		0.899	150	2.5		0.938	150	2.5		0.949	150	2.5
1.056	8		0.883	180	3		0.893	180	3		0.935	180	3		0.944	180	3
1.057	9		0.875	210	3.5		0.887	210	3.5		0.932	210	3.5		0.94	210	3.5
1.057	10		0.867	240	4		0.883	240	4		0.930	240	4		0.938	240	4
1.057	11		0.86	270	4.5		0.879	270	4.5		0.931	270	4.5		0.935	270	4.5
1.057	12		0.851	300	5		0.875	300	5		0.929	300	5		0.937	300	5
1.057	13		0.843	330	5.5		0.871	330	5.5		0.927	330	5.5		0.934	330	5.5
1.057	14		0.836	360	6		0.867	360	6		0.924	360	6		0.931	360	6
1.057	15		0.83	390	6.5		0.864	390	6.5		0.922	390	6.5		0.929	390	6.5
1.057	16		0.825	420	7		0.861	420	7		0.92	420	7		0.927	420	7
1.057	17		0.818	450	7.5		0.858	450	7.5		0.920	450	7.5		0.925	450	7.5
1.057	18		0.813	480	8		0.855	480	8		0.938	480	8		0.923	480	8
1.057	19		0.818	510	8.5		0.853	510	8.5		0.937	510	8.5		0.922	510	8.5
1.057	20		0.819	540	9		0.85	540	9		0.937	540	9		0.92	540	9
1.057	21		0.827	570	9.5		0.848	570	9.5		0.936	570	9.5		0.919	570	9.5
1.057	Promedio	22.604 x	0.818	600	10	19.955 x	0.846	600	10	10.020	0.935	600	10	8.506	0.919	600	10

			% Inhibicion	Concentraciones
1				
30	1	3	22.604	11.111111111
	1	5	19.955	6.666666667
0.0333333	1	10	10.020	3.333333333
	1	15	8.506	2.222222222

y = mx-b	
Donde	
y =	50.000
m =	4.9003
b =	0.6659

32.723752 mg/mL

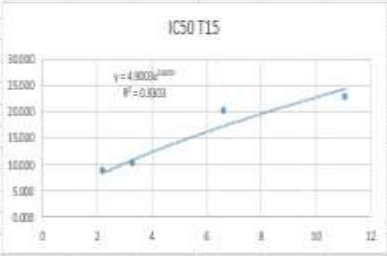


Figura 31. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia

8.19. Ejemplo de determinación de IC 50: Tratamiento 16

DPPH CINETICA DEL CONTROL A 515nm durante 10 min, cada 30 segundos — T16

1.057	1		Diluciones		Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)			Abs	T(seg)	T(min)
1.057	2		1´3		0.833	0	0		1´5	0.906	0	0		1´10	0.927	0	0		1´15	0.931	0	0
1.057	3				0.794	30	0.5			0.870	30	0.5			0.914	30	0.5			0.924	30	0.5
1.057	4				0.775	60	1		x	0.857	60	1			0.909	60	1			0.921	60	1
1.056	5				0.761	90	1.5			0.847	90	1.5			0.906	90	1.5			0.919	90	1.5
1.057	6				0.749	120	2			0.84	120	2			0.903	120	2			0.917	120	2
1.057	7				0.738	150	2.5			0.831	150	2.5			0.901	150	2.5			0.915	150	2.5
1.056	8				0.729	180	3			0.824	180	3			0.899	180	3			0.913	180	3
1.057	9				0.722	210	3.5			0.818	210	3.5			0.897	210	3.5			0.912	210	3.5
1.057	10				0.715	240	4			0.813	240	4			0.895	240	4			0.911	240	4
1.057	11				0.709	270	4.5			0.808	270	4.5			0.894	270	4.5			0.91	270	4.5
1.057	12				0.703	300	5			0.802	300	5			0.893	300	5			0.909	300	5
1.057	13				0.697	330	5.5			0.796	330	5.5			0.892	330	5.5			0.908	330	5.5
1.057	14				0.693	360	6			0.794	360	6			0.891	360	6			0.912	360	6
1.057	15				0.688	390	6.5			0.79	390	6.5			0.889	390	6.5			0.91	390	6.5
1.057	16				0.684	420	7			0.787	420	7			0.889	420	7			0.91	420	7
1.057	17				0.682	450	7.5			0.783	450	7.5			0.888	450	7.5			0.909	450	7.5
1.057	18				0.687	480	8			0.777	480	8			0.887	480	8			0.909	480	8
1.057	19		x		0.678	510	8.5			0.771	510	8.5			0.887	510	8.5			0.909	510	8.5
1.057	20				0.678	540	9			0.769	540	9			0.887	540	9			0.908	540	9
1.057	21				0.677	570	9.5			0.767	570	9.5		x	0.886	570	9.5			0.908	570	9.5
1.057	Promedio		35.850		0.674	600	10		18.914	0.762	600	10		16.170	0.887	600	10		14.089 x	0.908	600	10

1			% Inhibicion	Concentraciones
60	1:	3	35.850	5.555555556
	1:	5	18.914	3.333333333
0.0166667	1:	10	16.170	1.666666667
	1:	15	14.089	1.111111111

y = mx-b
Donde
y = 50.000
m = 12.383
b = 0.5125

11.749378 mg/mL

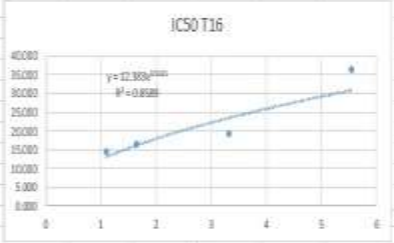


Figura 32. Sistema de determinación IC 50

Fuente: Elaboración propia