



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA CON MENCIÓN EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MODALIDAD: INFORME DE INVESTIGACIÓN

Título:

Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

Protocolo previo a la obtención del título de Magister en Agroindustria con Mención en Tecnología de Alimentos

Autor:

María Fernanda Quinteros Meneses

Tutor:

Wilman Ismael Carrillo Terán PhD.

LATACUNGA – ECUADOR

2020-2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)” presentado por Quinteros Meneses María Fernanda, para optar por el título magíster en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Normandía-Francia, octubre 25, 2021.




Firmado electrónicamente por:
**WILMAN ISMAEL
CARRILLO TERAN**

.....
Wilman Ismael Carrillo Terán PhD.
CC: 1757080054

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Titulación: “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)”, ha sido revisado, aprobado y autorizado su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos; el presente trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

Latacunga, noviembre, 22, 2021


.....
Ing. Mg. Zilia Eliana Zambrano Ochoa
0501773931
Presidente del tribunal


.....
Dra. Mg. Patricia Marcela Andrade Aulestia
0502237555
Miembro 2


.....
Ing. Mg. Manuel Enrique Fernández Paredes
0501511604
Miembro 3

DEDICATORIA

*A mi recordada madre-abuelita, Mayta. Por ser
ejemplo en vida de perseverancia, trabajo,
humildad y amor.*

*A mi querida madre Rosita y a mis apreciadas tías:
Mary Carmen, Mary y Katty. Por todo su
amor y apoyo incondicional brindado.*

Mafer..!!

AGRADECIMIENTO

A Dios, que con su infinito amor me fortaleció a cada instante de mi vida para alcanzar los anhelos de mi corazón.

A mi familia, por el cariño y la confianza depositada, así como el aliento para mantenerme constante en el compromiso de llegar hasta el final.

A Patricio, por su amor desinteresado y su apoyo incondicional que han sido la clave del éxito en la culminación de esta etapa de mi vida.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por medio de ella a la Dirección de Posgrado el cual me brindó la oportunidad de continuar con mi formación profesional a través de su personal docente.

A los laboratorios de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar, por haberme brindado la facilidad del desarrollo experimental de mi investigación.

Mi profundo agradecimiento a Ismael Carrillo, Director del trabajo de Investigación. Agradezco de manera especial la confianza depositada, su capacidad para guiar el trabajo y el tiempo dedicado que han sido aportes invaluableles en mi formación como investigadora y persona.

De manera especial doy las infinitas gracias a Marcelo y Robert, compañeros investigadores que han compartido su tiempo y conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

Gracias Totales. .!!

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación.

Ambato, noviembre, 22, 2021.



.....
María Fernanda Quinteros Meneses
CC: 180462224-7

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente trabajo de titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Ambato, noviembre, 22, 2021.



.....
María Fernanda Quinteros Meneses
CC: 180462224-7

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)”, contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los lectores en sesión científica del tribunal.

Latacunga, noviembre, 22, 2021


.....
Ing. Zoila Eliana Zambrano Ochoa Mg.
0501773931

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGROINDUSTRIA MENCIÓN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Título: “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)”

Autor: María Fernanda Quinteros Meneses

Tutor: Wilman Ismael Carrillo Terán PhD.

RESUMEN

Actualmente, los insectos comestibles se investigan como una fuente alternativa potencial de proteínas y nutrientes lo que les hace importante en la nutrición humana. Su alto contenido de proteína (65 %) permitió estudiar sus propiedades funcionales, digestibilidad gastrointestinal, actividad antioxidante y antiinflamatoria. En este estudio se obtuvo aislados proteicos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*), usando diferentes pHs de solubilización y precipitación, la proteína fue cuantificada por el método Dumas, BCA y Bradford, y analizada por la técnica SDS-PAGE. Para la evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas se empleó % de solubilidad, % de capacidad de absorción de agua y aceite. Además, se determinó la actividad antiinflamatoria y la actividad antioxidante por los métodos: ABTS, DPPH y FRAP.

Los aislados proteicos de grillo solubilizados a pHs alcalinos poseen altos rendimientos (70 %) y contenido de proteína de alrededor del 80 % para el caso de Dumas y sobre los 100 mg de proteínas/g muestra para los métodos colorimétricos. Se caracterizaron las proteínas de harina de grillo encontrando bandas de proteína de pesos moleculares entre 250 kDa a 37 kDa. Los porcentajes altos de solubilidad proteica, capacidad de absorción de agua y aceite permitieron establecer el uso de este subproducto como componente rico en proteínas en varios alimentos emulsificados. Los aislados proteicos que presentaron una mayor actividad antioxidante fueron los tratamientos 10.0-4.0, 12.0-6.0 y 10.0-3.0 con valores 70,034 mmol ET/g muestra (FRAP), 12,43 mmol ET/g muestra (ABTS) y 68,01 mmol ET/g muestra (DPPH) respectivamente. Además, las proteínas de grillo presentaron hasta un 93,55 % de protección durante el proceso de inflamación.

PALABRAS CLAVE: Grillo, proteína, solubilidad, antioxidantes, actividad antiinflamatoria,

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRIA EN AGROINDUSTRIA MENCIÓN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Title: “Evaluation of the biological activities *in vitro* of the protein isolates obtained from cricket flour (*Gryllus assimilis*)”

Author: María Fernanda Quinteros Meneses

Tutor: Wilman Ismael Carrillo Terán PhD.

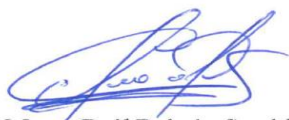
ABSTRACT

The insects are currently being investigated as a potential alternative source of protein and nutrients, which makes them important in human nutrition. The high protein content (65 %) allowed the study of its functional properties, gastrointestinal digestibility, antioxidant and anti-inflammatory activity. In this study, protein isolates were obtained from cricket flour (*Gryllus assimilis*), using different solubilization and precipitation pHs, the protein was quantified by the Dumas, BCA and Bradford method, and analyzed by the SDS-PAGE technique. For the evaluation of the functional properties of the proteins %, solubility %, water and oil absorption capacity were used. In addition, the anti-inflammatory activity and the antioxidant activity were determined by the methods: ABTS, DPPH and FRAP.

Cricket protein isolates solubilized at alkaline pHs have high yields (70 %) and protein content of around 80 % in the case of Dumas and over 100 mg of proteins/g sample for colorimetric methods. Cricket meal proteins were characterized by finding protein bands of molecular weights between 250 kDa to 37 kDa. The high percentages of protein solubility, water and oil absorption capacity allowed to establish the use of this by-product as component rich in proteins in various emulsified foods. The protein isolates that presented the highest antioxidant activity were treatments 10.0-4.0, 12.0-6.0 and 10.0-3.0 with values 70.034 mM Trolox / g sample (FRAP), 12.43 mM Trolox / g sample (ABTS) and 68.01 mM Trolox / g sample (DPPH) respectively. The cricket proteins presented up to 93.55 % protection during the inflammation process.

KEYWORD: Cricket, proteins, solubility, antioxidants, anti-inflammatory activity.

Yo, Mg Marco Paúl Beltrán Semblantes con cédula de identidad número 0502666514 Licenciado en Ciencias de la Educación especialización Inglés con número de registro de la SENESCYT: 1020-06-701921; **CERTIFICO** haber revisado y aprobado la traducción al idioma inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)” de: María Fernanda Quinteros Meneses aspirante a Magíster en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos



Mg. Marco Paúl Beltrán Semblantes
0502666514



CENTRO
DE IDIOMAS

Latacunga, noviembre, 19, 2021

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Justificación..... | 2 |
| 1.3 Planteamiento del problema..... | 3 |
| 1.4 Hipótesis..... | 4 |
| 1.5 Objetivos de la investigación..... | 5 |
| 1.5.1 Objetivo general..... | 5 |
| 1.5.2 Objetivos específicos..... | 5 |
| CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA..... | 8 |
| 2.1 Antecedentes..... | 8 |
| 2.2 Fundamentación epistemológica..... | 10 |
| 2.2.1 Los insectos..... | 10 |
| 2.2.2 Grillo común (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 10 |
| 2.2.3 La entomafagia..... | 11 |
| 2.2.4 Grillo común (<i>Gryllus assimilis</i>) como alimento para el hombre..... | 12 |
| 2.2.5 Proteínas..... | 13 |
| 2.2.6 Aislados y concentrados proteicos..... | 14 |
| 2.2.7 Métodos para cuantificar proteína..... | 15 |
| 2.2.7.2 Método Bradford..... | 15 |
| 2.2.8 Digestibilidad de las proteínas..... | 16 |
| 2.2.9 Caracterización de las proteínas por Electroforesis..... | 17 |
| 2.2.10 Actividades Biológicas..... | 18 |
| 2.3 Fundamentación del estado del arte..... | 20 |
| CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1 Metodología..... | 22 |
| 3.1.1 Obtención de la materia prima..... | 22 |
| 3.1.2 Análisis proximal de la harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 22 |
| 3.1.3 Obtención de aislados proteicos de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 26 |
| 3.1.4 Cuantificación de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo..... | 27 |

| | | |
|--|---|----|
| 3.1.5 | Evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas | 28 |
| 3.1.6 | Caracterización de las proteínas de grillo por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE 30 | |
| 3.1.7 | Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> | 31 |
| 3.1.8 | Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>). | 32 |
| 3.1.9 | Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) | 34 |
| 3.2 | Investigación experimental | 35 |
| CAPÍTULO IV. APLICACIÓN Y/O VALIDACIÓN DE LA PROPUESTA | | 36 |
| 4.1 | Resultados y discusión | 36 |
| 4.1.1 | Análisis proximal de la harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) | 36 |
| 4.1.2 | Obtención de aislados proteicos de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 37 |
| 4.1.3 | Cuantificación de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo | 38 |
| 4.1.4 | Evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas | 40 |
| 4.1.5 | Caracterización de las proteínas de grillo por la técnica de electroforesis SDS-PAGE | 46 |
| 4.1.6 | Simulación de digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.1.7 | Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>). | 49 |
| 4.1.8 | Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) | 51 |
| 4.2 | Evaluación de expertos..... | 53 |
| 4.3 | Evaluación de usuarios | 54 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 55 |
| 5.1 | Conclusiones | 55 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | 56 |
| CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | | 58 |
| CAPÍTULO VII. ANEXOS | | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Actividades para el cumplimiento de los objetivos..... | 6 |
| Tabla 2. Etapas críticas que ha atravesado la investigación..... | 7 |
| Tabla 3. Diseño experimental A*B..... | 27 |
| Tabla 4. Análisis proximal de la harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 35 |
| Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de los aislados y concentrados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) a diferentes pHs..... | 36 |
| Tabla 6. Contenido de proteína en los aislados y concentrados de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) mediante la aplicación del método Dumas, Bradford y BCA..... | 38 |
| Tabla 7. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 10.0 de solubilización..... | 41 |
| Tabla 8. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 12.0 de solubilización..... | 42 |
| Tabla 9. Porcentaje de capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) a diferentes pHs..... | 44 |
| Tabla 10. Porcentaje de capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) a diferentes pHs..... | 45 |
| Tabla 11. Determinación de la actividad antioxidante in vitro de los aislados proteicos de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) a diferentes pHs..... | 50 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 10.0 de solubilización..... | 41 |
| Gráfico 2. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 12.0 de solubilización..... | 42 |
| Gráfico 3. Caracterización proteica de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE. Pocillo 1 (estándar de proteínas), pocillo 2 (10-3), pocillo 3 (10-4), pocillo 4 (10-5), pocillo 5 (10-6), pocillo 6 (12-3), pocillo 7 (12-4), pocillo 8 (12-5) y pocillo 9 (12-6)..... | 46 |
| Gráfico 4. Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> de aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) solubilizados a pH 10.0 y precipitados a pHs 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0.... | 48 |
| Gráfico 5. Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> de aislados proteicos de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) solubilizados a pH 12.0 y precipitados a pHs 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0..... | 48 |
| Gráfico 6. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) a diferentes pHs de solubilización y precipitación..... | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Grillo común (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 11 |
|---|----|

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo A. Fotografías de la parte experimental realizada durante el estudio..... | 67 |
| Anexo B. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales del análisis proximal y rendimiento de proteína de la harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 69 |
| Anexo C. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la cuantificación de proteína de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>) por diferentes métodos..... | 71 |
| Anexo D. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la evaluación de las propiedades funcionales de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 76 |
| Anexo E. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la determinación de la actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 84 |
| Anexo F. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (<i>Gryllus assimilis</i>)..... | 92 |

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La investigación corresponde a la línea de “Desarrollo y seguridad alimentaria y procesos industriales”, teniendo como sub línea de investigación: “Investigación-innovación y emprendimientos”. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria se considera dos aspectos primordiales: El acceso económico y físico a los alimentos donde se establece una oferta adecuada de alimentos a nivel nacional o internacional esto no garantiza la seguridad alimentaria a nivel de los hogares. La preocupación por problemas en el acceso a los alimentos ha conducido al diseño de políticas con mayor enfoque en materia de ingresos y gastos, para alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria; y la utilización de los alimentos que normalmente se entiende como la forma en la que el cuerpo aprovecha los diversos nutrientes presentes en los alimentos. El ingerir energía y nutrientes suficientes es el resultado de buenas prácticas de salud y alimentación, la correcta preparación de los alimentos, la diversidad de la dieta y la buena distribución de los alimentos dentro de los hogares. Si se combina esos factores con el buen uso biológico de los alimentos consumidos, se obtendrá la condición nutricional de los individuos.

Por otro lado, la investigación e innovación son ejes claves en el desarrollo del Ecuador, la idea de innovación pasa por la necesidad de vincular a las instituciones que hacen investigación científica con los requerimientos de la sociedad ecuatoriana. El estudio al constituir un tema netamente innovador y de carácter investigativo, permite cumplir con las expectativas propuestas anteriormente y cubrir los requerimientos de la sociedad.

1.2 Justificación

Ecuador es megadiverso y con la viabilidad de criar diversas especies de insectos comestibles, la crianza de grillos constituye una alternativa alimentaria con posibilidades de industrialización y un alto potencial económico. Actualmente, existen pequeños empresarios que, de manera científica y técnica, aprovechan las potencialidades de los insectos como fuente de proteína alternativa. Uno de los emprendimientos pioneros en nuestro país, es SARGRILLO, un programa de cría de grillos en granja, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, bioseguridad, alimentación y asepsia, como una alternativa alimentaria para los seres humanos.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la entomofagia se practica en muchas regiones del mundo, principalmente en África, Asia y América Latina. La alimentación que incluye insectos constituye un hábito que complementa la dieta de aproximadamente 2.000 millones de personas. Los insectos pueden ser consumidos de forma directa o en forma de suplementos alimenticios. Además, pueden elaborarse con ellos balanceados o piensos para alimentar a los animales reemplazando las harinas de soja, cereales y pescado (Carvajal, 2016).

Un organismo especializado dentro de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la FAO, indica a los insectos como alternativa alimentaria de futuro más viable con relación a la alimentación para afrontar los problemas de sobrepoblación, si la situación no cambia, los pocos recursos disponibles no serán los suficientes para alimentar miles de millones de personas (Viñeta, 2017). Además, la Unión Europea y diversos estudios establecen que los insectos comestibles podrían convertirse en una de las soluciones al problema del suministro mundial de alimentos (Montowska et al., 2019).

Considerando el aumento de la población mundial y los escasos recursos hídricos y terrestres, es de mucho interés encontrar formas nuevas y sostenibles de producir alimentos. Los insectos comestibles se han convertido en un punto interesante de

estudio por su alto contenido en proteínas y su fácil crianza, llevando a favorecer menores impactos ambientales en comparación con la ganadería tradicional (Machado & Silveira, 2019). Las proteínas obtenidas a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*) tienen un alto valor nutricional y podrían ejercer actividades biológicas sobre el organismo humano, contribuyendo a la prevención de enfermedades cardiometabólicas en el mismo. Por esta razón, la presente investigación tiene como objetivo evaluar las actividades biológicas de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*), cuyos resultados permitiría establecer a las proteínas de este insecto comestible como una alternativa de aplicación en diferentes áreas de estudio: alimentaria, farmacéutica, nutracéutica, y otras.

1.3 Planteamiento del problema

El desconocimiento y la falta de información acerca de las potencialidades nutricionales que proporcionan las proteínas de grillo, las mismas que pueden servir como alternativa a la prevención de enfermedades cardiometabólicas sobre el organismo humano, ha conllevado a utilizar como materia prima en este estudio la harina de grillo (*Gryllus assimilis*), con la finalidad de identificar sus actividades biológicas *in vitro*.

Las proteínas y los péptidos bioactivos son moléculas que, además de su valor nutricional como fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer actividades biológicas específicas. Estas moléculas optimizan las funciones vitales del organismo humano y reducen el riesgo de enfermedades. Además, muchos de estos péptidos y proteínas presentan una marcada actividad antioxidante y antiinflamatoria (Gavilanes 2016).

Por otra parte, se debe considerar la problemática que hoy en día el país atraviesa con relación a la mala alimentación por lo que, se pretende buscar nuevas alternativas de nutrición. Se ha identificado que en países donde tradicionalmente se consumen

insectos las tasas de malnutrición han disminuido en comparación a países que no practican la entomafagia.

El uso de insectos para alimentación animal y humana tiene muchos beneficios de carácter ambiental, sanitario y para la vida. Los insectos están en todas partes, se reproducen rápidamente y son nutritivos con un alto contenido de proteína, grasa, vitaminas y minerales, pudiendo ser consumidos enteros o molidos, en polvo o en pasta y como ingrediente para la elaboración de otros alimentos (FAO, 2013).

El presente estudio ha fijado la necesidad de realizar una evaluación de las actividades biológicas de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*) los mismos que son criados en la Granja SARGRILLO en el sector de Llano Chico en la provincia de Pichincha-Ecuador. Estos análisis serán base fundamental para la posterior elaboración de alimentos que contengan como ingrediente funcional el aislado proteico.

Formulación del problema

¿Se obtendrán aislados proteicos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*) que presenten actividades biológicas?

1.4 Hipótesis

H₀= Los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*) poseen actividades biológicas y funcionales.

H_a= Los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*) no poseen actividades biológicas y funcionales.

1.5 Objetivos de la investigación

1.5.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

1.5.2 Objetivos específicos

- ❖ Obtener aislados proteicos de harina de grillo.
- ❖ Cuantificar el contenido de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo.
- ❖ Caracterizar las proteínas de harina de grillo por electroforesis.
- ❖ Evaluar las propiedades funcionales de los aislados proteicos de harina de grillo.
- ❖ Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de harina de grillo.

Tareas

A continuación, se detalla en la tabla 1 las actividades que permitieron la ejecución del cumplimiento de los objetivos propuestos en el trabajo de investigación.

Tabla 1. Actividades para el cumplimiento de los objetivos

| OBJETIVO | ACTIVIDAD |
|--|--|
| <p>Objetivo específico 1: Obtener aislados proteicos de harina de grillo.</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Extraer las proteínas de harina de grillo considerando su punto isoeléctrico |
| <p>Objetivo específico 2: Cuantificar el contenido de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Elaboración de las curvas de calibración para cada método de ensayo. - Cuantificación de proteína de por los métodos: Bradford, BCA y Dumas. - Análisis de resultados |
| <p>Objetivo específico 3: Caracterizar las proteínas de harina de grillo por electroforesis</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Preparación de las muestras - Separación electroforética - Lectura de geles |
| <p>Objetivo específico 4. Evaluar las propiedades funcionales de los aislados proteicos de harina de grillo.</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Solubilidad de proteína - Capacidad de absorción de agua - Capacidad de absorción de aceite |
| <p>Objetivo específico 5: Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos de harina de grillo.</p> | <p style="text-align: center;"><u>Actividad antioxidante</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Obtener los extractos metanólicos - Elaboración de curvas de calibración para cada método de ensayo. - Análisis de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por los métodos ABTS, DPPH y FRAP. <p style="text-align: center;"><u>Actividad antiinflamatoria</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Obtención de los eritrocitos - Preparación de la muestra - Análisis de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> - Análisis de resultados |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Etapas

En la tabla 2 se detallan las etapas críticas que el proceso de investigación ha atravesado.

Tabla 2. Etapas críticas que ha atravesado la investigación

| ETAPA | DESCRIPCIÓN |
|---|---|
| Obtención de los aislados proteicos de grillo. | - Estudio del punto isoelectrico de las proteínas de grillo. |
| Simulación de la digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> | - Control de parámetro como concentración de enzima. |
| Determinación de actividad antioxidante <i>in vitro</i> | - Elaboración de curvas de calibración. |
| Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los aislados proteicos | - Obtención de sangre humana para la extracción de los eritrocitos. |

Elaborado por: Quinteros (2021).

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Antecedentes

La comunidad científica tiene interés en estudios de insectos con perspectivas alimentarias, son beneficiosas para la salud humana, históricamente los insectos están involucrados con el hombre, existen reportes que Aristóteles eventualmente consumía insectos como las ninfas. Por otra parte, hay evidencia que la cultura islámica usaba insectos para su alimentación, consumían langostas, abejas, hormigas, piojos y termitas durante las cruzadas.

Durst et al (2010) mediante la FAO determinaron que los seres humanos han consumido insectos durante miles de años, en algunos casos como alimento de emergencia, en otras circunstancias como alimento básico y en otros casos como manjares, se ha registrado alrededor de 1400 especies de insectos que se utilizan como alimento humano. La entomofagia (la práctica de comer insectos) en los tiempos modernos, ha disminuido y a menudo, se ha rechazado como sucio o insalubre. Sin embargo, entre varias culturas diseminadas por todo el mundo, los insectos permanecen como un alimento vital y preferido constituyendo una fuente esencial de proteínas, grasas, minerales y vitaminas.

La seguridad alimentaria es un motivo de grave preocupación, especialmente para los países en desarrollo, el alto costo de los alimentos, las preocupaciones crecientes relacionados con el cambio climático y las grandes contribuciones del sector agrícola al efecto invernadero por las emisiones de gases están motivando a muchos expertos a reevaluar las dietas y diversos enfoques alimentarios (Durst et al., 2010; Florence et al., 2018).

Los expertos establecen aumentar nuevas investigaciones para encontrar fuentes alternativas de alimentación más baratas con el objetivo de superar el hambre y la desnutrición, sobre todo en los países en desarrollo. Diferentes estudios informan que

los insectos son ricos en proteínas y podrían ser fuentes alternativas de alimentos, esto ha llevado a una consideración más seria de la potencialidad de los insectos comestibles para contribuir a la seguridad alimentaria y las perspectivas de comercialización y cría de insectos para la alimentación.

Defoliart (2002) informa que los insectos comestibles son fuentes prometedoras de proteínas debido a que contienen mayores cantidades de proteínas en comparación con las fuentes tradicionales de proteínas como la carne, los productos lácteos y las semillas. Los insectos ofrecen un contenido de proteína (60 g/100 g porción) en comparación con dietas basadas en fuentes vegetales como la soya que proporciona alrededor del 37 g/100 g porción.

Además de las proteínas, los ácidos grasos son el segundo componente más alto en los insectos y su contenido varía dependiendo del tipo de insecto, su contenido de ácidos grasos oscila entre 13 % y 33 % en grillos y larvas de escarabajos, respectivamente. Sin embargo, es importante resaltar que el mayor contenido de ácidos grasos se encuentra en las etapas larvales en comparación con las etapas adultas del insecto (Florende et al., 2018).

En Ecuador existe la empresa SARGRILLO, que cultiva la especie de grillo tropical *G. assimilis* mediante un proceso exitoso que consiste en la fase de apareamiento, la incubación de los huevos y la producción de la harina. Debido al alto contenido proteico de la harina (>55 %) la empresa propone esta alternativa de alimentación. Además, porque es amigable con el medio ambiente.

Por otra parte, Pulido et al (2020) mencionan que los atributos sensoriales son factores importantes en la producción de insectos, además del contenido proteico se debe asegurar la calidad y el producto, lo que garantiza una mayor aceptación en el consumo. Como cualquier otro producto animal, variaciones en las condiciones de cría, procesamiento, así como su incorporación en nuevos alimentos y platos con base de insectos, puede afectar las propiedades sensoriales del producto final a ofertar; es pues,

donde el principal objetivo es trabajar en la mejora de sabores y texturas para despertar una actitud positiva hacia ese tipo de comida.

2.2 Fundamentación epistemológica

2.2.1 Los insectos

Los insectos constituyen el grupo animal más numeroso y diverso de la Tierra. Además, de ser el grupo más exitoso en términos de biomasa total, plasticidad, fenotípica y distribución mundial (Pulido et al., 2020). Poseen la mayor cantidad de masa estimada como grupo biológico sobre la tierra, sus tasas reproductivas son altas, son ubicuos y altamente nutricionales (Sancho et al., 2015). El registro de número de especies descritas ostenta cerca de 1000 000 de especies, con una cantidad de miembros muy abundantes. Se cree que aún quedan por describir unos 30 millones de especies más.

Los insectos pueden encontrarse en casi todos los lugares del planeta, aunque solo un pequeño número de especies ha conseguido adaptarse a la vida en los océanos, se caracterizan por tener dos antenas, seis patas y dos alas, a pesar de que en ocasiones no les sirven para volar. El cuerpo de los insectos tiene una cubierta exterior rígida llamada exoesqueleto que lo protege. Su cuerpo está dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen y en algún momento de su vida, por lo general cuando pasan a la etapa adulta, experimentan un cambio drástico llamado metamorfosis (National Geographic, 2016).

2.2.2 Grillo común (*Gryllus assimilis*)

El grillo común pertenece a la Clase: Insecta; Orden: Orthoptera; Familia: Gryllidae (grillos verdaderos). Es un insecto, con un tamaño promedio de 2 cm, en su edad adulta. Su tonalidad varía de marrón fuerte a negro. Posee tres pares de patas, siendo las traseras las más perceptibles, con las cuales puede saltar y apoyarse. Además, tienen dos pares de alas, que no están desarrolladas plenamente en los ejemplares jóvenes. En su cabeza se exhiben delgadas y largas antenas con ojos compuestos y piezas bucales

de trituración. Las hembras poseen en el abdomen una estructura similar a un tubo (ovopositor) que utilizan para colocar los huevos en la tierra. Éstas habitualmente ponen 30 huevos (Animales, 2018).

El ciclo de vida de los insectos está determinado por tres etapas: huevo, ninfa y adulto, pasando de un estadio a otro por la alimentación y la temperatura, entre más favorables son estas condiciones su crecimiento es más rápido. La temperatura deseada para ellos oscila entre 25 °C y 35 °C. El grillo se alimenta de materia vegetal, gusanos y otros insectos. Su tiempo de vida es muy corto, generalmente de dos a tres meses (Apolo-Arévalo & Iannacone, 1993).

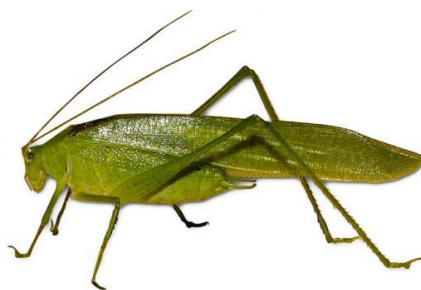


Figura 1.Grillo común (*Gryllus assimilis*)

Fuente: Alarcon (2020).

2.2.3 La entomafagia

FAO (2013), define a la entomofagia como el consumo de insectos por los seres humanos. Se practica en muchos países principalmente en Asia, África y América Latina. La ingesta de insectos complementa la dieta de 2.000 millones de personas. Las instituciones de investigación, los chefs, miembros de la industria alimentaria, legisladores y demás organismos junto con el Programa de Insectos Comestibles de la FAO estudian la contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente.

El consumo de insectos comestibles se remonta a épocas antiguas en la que muchas culturas integraron hábilmente a los insectos en sus variadas dietas. En Ecuador, existe

una herencia cultural de los indígenas sobre el consumo de insectos; las larvas de *Rhynchophorus palmarum*, el chontacuro, son comercializadas y consumidas en varias provincias de la Amazonía (Sancho et al., 2015).

Investigaciones realizadas sugieren que el consumo de los insectos puede tener un impacto positivo en la salud humana. Stull et al. (2018) afirman que pueden estimular el crecimiento de la microbiota intestinal y disminuir el nivel de TNF- α en el plasma. Además, los grillos poseen abundante quitina y quitosano, que son sustancias que permiten suprimir microorganismos patógenos que habitan en los intestinos (Liu et al., 2010).

Los grillos son catalogados por muchas personas como una plaga invernal, pero en realidad estos insectos son una alternativa alimentaria. Datos de la FAO indican que la población mundial aumentará en más de un tercio (2.300 millones de personas) hasta 2050 y que los grillos son una opción proteínica. La proyección también sostiene que para alimentar a una población mundial de 9.100 millones de personas se aumentará la producción de alimentos alrededor de un 70 %. Esta situación creará un impacto medioambiental, por ello la FAO indica la urgencia de buscar otras alternativas de proteínas sostenibles. Aquí se integra a los insectos como una buena opción, gracias a su alto valor nutricional (Telégrafo, 2020).

2.2.4 Grillo común (*Gryllus assimilis*) como alimento para el hombre

Teniendo en cuenta que se prevé que la población mundial alcance los 8.600 millones de personas en 2030 y 9.8 mil millones en 2050 (United Nations, 2017) y con el fin de proporcionar suficientes alimentos a la creciente población, la producción actual de alimentos tendrá que duplicarse; por el contrario, los recursos de tierra y agua son cada vez más escasos. Parece necesario, por tanto, encontrar alternativas y formas de cultivar alimentos (Machado & Silveira, 2019).

La cría y la recolección de insectos pueden ofrecer importantes estrategias de diversificación de los medios de vida, los insectos pueden recogerse directamente del

medio de manera sencilla. Se necesitan medios técnicos y, bajas inversiones para adquirir equipos básicos de cría y recolección (FAO, 2013).

Un ingrediente comestible de insectos, fácilmente accesible es la harina de grillo deshidratado, que contiene entre un 45 % y 70 % de proteína, así como 20 % a 30 % de lípidos, 5 % a 20 % de fibra y 5 % de cenizas (Montowska et al., 2019).

Los grillos son extremadamente valiosos en términos de valor nutricional. No contienen solo cantidades significativas de proteína o grasa, también tienen vitaminas y minerales (Montowska et al., 2019). Se ha utilizado harina de grillo para complementar o reemplazar componentes ricos en proteínas, complejos alimenticios, incluidas emulsiones de carne (Kim et al., 2017), pasta (Duda et al., 2019) pan y barritas proteicas que están disponibles comercialmente.

2.2.5 Proteínas

Las proteínas constituyen, junto con los ácidos nucleicos, las moléculas de información en los seres vivos, juegan un papel central en los sistemas biológicos abarcando todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas. Las unidades más simples de las proteínas son los aminoácidos, en el código genético se pueden encontrar codificados los veinte α -aminoácidos, estos constituyen los eslabones que conforman los péptidos, que cuando forman cadenas polipeptídicas y alcanzan altos pesos moleculares se denominan proteínas. Además, a las proteína se las define como proteínas alimentarias que son fácilmente digeribles, no tóxicas, nutricionalmente adecuadas, útiles en los alimentos, disponibles en abundancia y con un alto valor nutricional (Badui, 2006).

Dentro de las proteínas existen los aminoácidos esenciales y los no esenciales los mismos que son: esenciales (treonina, triptófano, valina, lisina, metionina, fenilalanina, histidina, isoleucina y leucina) y los no esenciales (alanina, arginina, ácido aspártico, asparragina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina).

Los insectos comestibles, incluidos los grillos, son ricos en proteínas las mismas que se consideran ser una fuente valiosa de péptidos bioactivos con actividad antioxidante (Badui, 2012; Zielinska et al., 2015).

Estudios realizados por Zielinska et al (2015) afirman que las proteínas representan el componente principal de la composición nutricional de los insectos, el mayor porcentaje de proteína encontrado fue de 76 % en grillo (*Gryllus sigillatus*). Además, se ha identificado que los insectos comestibles en especial los grillos proporcionan niveles satisfactorios de aminoácidos esenciales, de acuerdo al requerimiento de mg de aminoácidos por kg de masa corporal por día. La treonina, la valina y la histidina son aminoácidos predominantes en este tipo de especies.

2.2.6 Aislados y concentrados proteicos

Según Linden & Loriet (1994) los concentrados proteicos resultan de una separación paulatina de sus componentes no proteínicos (lípidos, fibra, carbohidratos, minerales, etc.), de tal manera que sus propiedades nutricionales no se modifiquen ni se pierdan. El proceso de concentrado proteico implica una serie de tratamientos, que aprovechando las propiedades fisicoquímicas de los solventes de extracción (solubilidad, polaridad, fuerza iónica, pH isoelectrico), permiten separar las proteínas.

Por otra parte, los aislados proteicos son la forma comercial más purificada, que se logran eliminando los polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes ya sea por: hidrólisis y posterior precipitación, por adición de ácidos, minerales, controlando los diferentes parámetros como: el pH, temperatura, solubilidad y otros, que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida (Bohinski, 1976). Además, se caracteriza por contener más de un 90 % de contenido de proteína.

Una amplia variedad de herramientas de extracción y fraccionamiento de proteínas y péptidos se disponen en base a sus características fisicoquímicas y estructurales, tales como la solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular, punto isoelectrico (pI) y así sucesivamente. Existe una visión integrada de técnicas de extracción, fraccionamiento

de proteínas y péptidos utilizados en los alimentos, estudios de proteína basados en diferentes tecnologías sobre la ruptura celular, precipitación y los sistemas de solubilización son necesarios para obtener la fracción de proteína de interés como es el caso del aislamiento de proteínas mediante hidrólisis ácida (Martínez et al., 2013).

2.2.7 Métodos para cuantificar proteína

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica, es una técnica básica cuando se trata de purificar una proteína concreta, conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas basados en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en la zona ultravioleta (UV), formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unirse a ciertos colorantes (Reyes & Galván, 2001).

2.2.7.1 Método Dumas

Este método de combustión desarrollado a principios del siglo XIX por Jean Baptiste Dumas. Consiste en la combustión de una muestra de masa conocida en una cámara de alta temperatura en presencia de oxígeno. Esto conduce a la liberación de dióxido de carbono, agua y nitrógeno. Los gases se pasan sobre columnas especiales que absorben el dióxido de carbono y agua. Una columna que contiene un detector de conductividad térmica a la final se utiliza entonces para separar el nitrógeno a partir de cualquier dióxido de carbono residual y el agua y el contenido de nitrógeno restante se mide (Ramírez, 2015)

2.2.7.2 Método Bradford

El método Bradford es un método colorimétrico que se usa para la cuantificación de proteínas totales. Cuando el colorante de coomassie se une a la proteína en un medio

ácido, se produce un cambio inmediato en el máximo de absorción de 465 nm a 595 nm con un cambio de color concomitante de marrón a azul (Rivera, 2020).

Cada uno de los métodos de ensayo de proteínas totales comúnmente usados, exhibe algún grado de respuesta variable hacia diferentes proteínas. Estas diferencias se relacionan con la secuencia de aminoácidos, el punto isoelectrico, la estructura y la presencia de ciertas cadenas laterales o grupos protésicos que pueden alterar drásticamente la respuesta de color de la proteína

2.2.7.3 Método BCA

El método de ácido bicinconínico (BCA) se basa en la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales, este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{+1} . El complejo hidrosoluble absorbe a 562 nm de manera lineal con el incremento de proteína en un rango de 20 $\mu\text{g/ml}$ - 2000 $\mu\text{g/ml}$. Este método reporta la estructura macromolecular, el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina), son los responsables de la dar inicio a la reacción. La concentración de proteínas se determina a partir de una curva de calibración construida con una proteína de referencia de concentración conocida (ej. albúmina de suero bovino). A partir de esta curva se determina la concentración de la muestra de proteína incógnita (Universidad de Quilmes, 2010).

2.2.8 Digestibilidad de las proteínas

El organismo humano ha desarrollado un sistema complejo para descomponer los alimentos y extraer los nutrientes que necesita para mantener la salud. Se ha desarrollado la aplicación de modelos in vitro que simulan condiciones que suceden en

los procesos *in vivo* en el organismo humano como es el caso de la digestibilidad gastrointestinal (Carrillo, 2014).

Los métodos *in vitro* que simulan procesos de digestión se utilizan ampliamente para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o productos farmacéuticos. Aunque los estudios nutricionales humanos todavía se están considerando el "estándar de oro", los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápido, menos costoso, menos laborioso y no tiene restricciones éticas (Minekus et al., 2014).

Los métodos de digestión simulada generalmente incluyen la digestión bucal, gástrica y duodenal gástrica. Estos métodos tratan de imitar condiciones fisiológicas del ser humano, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sal, entre otros factores (Ménard et al., 2014).

2.2.9 Caracterización de las proteínas por Electroforesis

La técnica de la electroforesis en gel de acrilamida permite la separación de una mezcla de proteínas según su peso molecular y es la técnica de entrada para la realización de la purificación de proteínas para su análisis por espectrometría de masas. Su fundamento físico tiene cierta complejidad, por lo que aquí mostraremos una versión (Menor, 2019).

Según el método desarrollado por Ulrich Laemmli en los años 1960 a 1970, la electroforesis se basa en la separación de proteínas por un campo eléctrico. Para ello se necesita dos fuerzas opuestas: el campo eléctrico que va a provocar la movilidad de la proteína en base a su carga, y un soporte sólido que va a retener la proteína en base a su interacción debido al tamaño. La base de la técnica (Electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio) SDS-PAGE es hacer que el movimiento de la proteína en el soporte sólido (gel) por acción del campo eléctrico sea exclusivamente proporcional a su peso molecular (Laemmli, 1970).

2.2.10 Actividades Biológicas

Las proteínas funcionales como los péptidos bioactivos, además de su papel nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema cardiovascular, el sistema inmune o el tracto gastrointestinal (Martínez & Martínez , 2006). Varios péptidos y proteínas han sido propuestos para el tratamiento de enfermedades dentales, la diarrea, mala absorción de minerales, la hipertensión, la trombosis, o de inmunodeficiencias (Rutherford & Moughan, 2005).

2.2.10.1 Actividad antioxidante

La presencia de antioxidantes naturales en los alimentos se ve asociados con la salud, el consumo de una amplia variedad de vegetales y productos derivados de origen animal como harinas, proporcionan una amplia variedad de fitoquímicos y actividad antioxidante que han demostrado tener beneficios para la salud. Los antioxidantes naturales además, de proteger el sistema biológico del consumidor también protegen la calidad de los alimentos (Bingcan & Minwei, 2018).

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio en la producción de sustancias nocivas en el organismo y la producción de sustancias antioxidantes. El estrés oxidativo es reconocido como una causa importante de una variedad de enfermedades degenerativas como la enfermedad de parkinson y la artritis. Los radicales libres comunes producidos en el cuerpo se denominan sustancias reactivas de oxígeno (Carrillo et al., 2018).

Los compuestos fenólicos naturales se encuentran predominantemente en el reino vegetal, sin embargo, importantes estudios han determinado la presencia de estos compuestos en proteínas de origen animal como en el huevo y la leche. La vitamina E o α -tocoferol es un fenol necesario en la dieta de los seres humanos. Los compuestos fenólicos inhiben principalmente la oxidación de lípidos a través de la eliminación de

los radicales libres y transformación de radicales fenólicos resultantes en una forma de baja energía que no promueve la oxidación (Bingcan & Minwei, 2018).

Zielńska et al (2016) establecen que el consumo de insectos puede enriquecer la dieta humana en nutrientes, pero también en componentes bioactivos, por ejemplo, péptidos biológicamente activos obtenidos de productos alimenticios como resultado de la digestión de proteínas. Los compuestos antioxidantes en los alimentos juegan un papel importante como sustancias protectoras contra los radicales libres, por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS).

2.2.10.2 Actividad antiinflamatoria

Bouhlali et al (2016) define al proceso de la inflamación como una respuesta de protección del sistema inmunológico del cuerpo, que se da en los tejidos vasculares contra estímulos dañinos como patógenos, daño celular e irritantes. La inflamación crónica generalmente se asocia con el aumento en la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, provocando un estrés oxidativo iniciado por un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y la defensa del sistema biológico capaz de eliminar estos radicales libres.

La respuesta inflamatoria se compone por diferentes procesos como una serie compleja de activación enzimática, liberación de mediadores, migración celular, descomposición y reparación de tejidos. Estas respuestas están dirigidas a la defensa del huésped y generalmente se activan en la mayoría de las enfermedades (Jemal et al., 2017).

Las prostaglandinas y otros eicosanoides son metabolitos oxigenados de ciertos ácidos grasos poliinsaturados. Recientes trabajos han revelado la presencia y acciones biológicas de los eicosanoides en insectos y muchos otros animales invertebrados. En insectos, los eicosanoides median la inmunidad celular al desafío microbiano y metazoario, también actúan en la fase reproductiva de insectos, en fisiología del transporte de iones y en la respuesta febril a infección, así como en la exocitosis de proteínas en las glándulas salivales de las garrapatas (Stanley, 2006)

2.3 Fundamentación del estado del arte

Diversos estudios realizados acerca de la composición nutricional de los insectos como es el caso de grillo han permitido determinar que los insectos son nutritivos y seguros para el consumo humano pudiendo aliviar el miedo a la entomofagia y reduciendo la dependencia excesiva de las proteínas animales convencionales.

Estudios realizados por Montowska et al (2019) determinaron la composición nutricional de la harina de grillo, la misma que posee en proteínas (42,00 % a 45,80 % de materia seca) y grasas (23,60 % a 29,10 % de materia seca). En términos de contenido mineral establecieron que son ricos en Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn presentándose los 3 últimos minerales en mayor abundancia.

Por otra parte, estudios realizados por Vera (2020), determinó que la harina de grillo común (*Gryllus assimilis*) posee un porcentaje de grasa total del 20 %, constituyendo el 10 % de grasa saturada, resaltando el ácido palmítico; mientras que el otro 10 % constituyen grasas insaturadas como ácido oleico y linoleico. El porcentaje de proteína cuantificado fué de 50 %, permitiendo establecer su utilidad en la elaboración de formulaciones nutritivas para el ser humano. Soares et al (2018) en su estudio realizado acerca de la composición nutricional de los insectos *Gryllus assimilis* y *Zophobas morio*, determinaron para proteína 65,52 (g/100 g), lípidos 21,80 (g/100 g), carbohidratos 8,60 (g/100 g) y cenizas 4,08 (g/100 g),

Florence et al (2018) realizaron estudios *in vivo* de la calidad de la proteína de cuatro especies de insectos comestibles autóctonos en Nigeria, la especie de grillo (*Gryllus assimilis*), alcanzó valores de eficiencia proteica de 1,78, proteína neta 3,04, digestibilidad proteica 80,82 %, utilización neta de proteína 75,20 % y valor biológico 93,02 %. Resultados que permitieron destacar su alto valor nutricional y su seguridad alimentaria. Además, encontraron en los insectos analizados un contenido de 20 aminoácidos naturales, por lo que establecen ser fuentes de aminoácidos esenciales y no esenciales. El aminoácido esencial más abundante identificado fue la treonina en

grillo ($10,60 \pm 0,05$ g/100 g), y el aminoácido no esencial más abundante fue el ácido glutámico ($13,00 \pm 0,20$ g/100 g).

El índice de eficiencia proteica (IEP) es un reflejo de la digestibilidad de las proteínas y la biodisponibilidad de los aminoácidos de una proteína (Nielsen, 2002). Los resultados obtenidos para el IEP de los insectos mostraron que los grillos pueden tener un valor nutricional más alto en comparación con la oruga polilla y las termitas. El valor de IEP más alto para los grillos en comparación con la caseína es similar a los estudios realizados por Ekpo (2011) que también descubrió que *Rhynchophorus phoenicis* tenía un IEP más alto que la caseína. Esto sugiere que los grillos pueden ser una buena fuente de proteína de alta calidad.

Con lo que respecta a la relevancia industrial, se considera el aumento de la población mundial y los escasos recursos hídricos y terrestres por lo que es importante encontrar formas nuevas y sostenibles de producir alimentos. Los insectos comestibles son interesantes por su alto contenido en proteínas y menores impactos ambientales en comparación con la ganadería tradicional. Desde este punto de vista Machado & Silveira (2019) evaluaron el uso de polvo de grillo como fuente de proteína para la producción de pan sin gluten en comparación con otras dos fuentes de proteínas (trigo y lenteja), los resultados confirman que el enriquecimiento con polvo de grillo puede conducir a la producción de pan sin gluten con propiedades tecnológicas aceptables y alto contenido proteico contenido. El polvo de grillo (*Gryllus assimilis*) presentó alto contenido de agua y capacidad de retención de aceite.

Múltiples estudios informan sobre el valor nutricional y actividades biológicas que los insectos pueden proporcionar al organismo humano, especialmente moléculas bioactivas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Schmidt et al (2019), determinaron en su estudio el contenido de vitamina B₁₂ en cuatro especies de insectos comestibles por la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución, en grillo encontraron $0.84 \mu\text{g}/100$ g de Vitamina B₁₂ pudiendo ser ésta una de las moléculas responsable de la actividad antioxidante.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Metodología

3.1.1 Obtención de la materia prima

Se adquirieron grillos deshidratados en la Granja SARGRILLO ubicada en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. En el laboratorio de preparación de muestras de la Universidad Estatal de Bolívar se procedió a moler la muestra en un molino marca Retsch, modelo Cyclone Twister, obteniendo como producto final harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

3.1.2 Análisis proximal de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)

Se realizó el análisis proximal para la harina obtenida de grillo basándose en los métodos oficiales AOAC e INEN. Se determinó el contenido de proteína, grasa, fibra cruda, cenizas, humedad y carbohidratos, este último se obtuvo mediante cálculo matemático.

3.1.2.1 Determinación de Proteína (Método Dumas)

El contenido de proteína de la harina de grillo se determinó por la metodología Dumas, se empleó un equipo marca ELEMENTAR, modelo Vario Macro cube. Una vez encendido el equipo se verificó que cumpla con todos los Test de control para garantizar su correcto funcionamiento. Primero se realizó la calibración del equipo con estándar Sulfamida. Para la corrida de las muestras se procedió a elaborar pequeños pellets que contenían aproximadamente 20 mg de muestra seca en una cápsula de aluminio. Los pellets fueron colocados en el automuestreador y mediante la transformación de todas las formas de nitrógeno en N gaseoso por calcinación, con ayuda de Helio y Oxígeno y su determinación por conductividad térmica se obtuvo el porcentaje de nitrógeno (% N) de las muestras (Sweeney & Rexroad, 1987). El ensayo

se realizó por triplicado, se calculó el porcentaje de proteína (% Proteína) mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Proteína} = F * \% N$$

Ec. 1

Dónde:

F= Factor de conversión de proteína (6,25)

% N= Porcentaje de nitrógeno

3.1.2.2 Análisis de humedad (AOAC 925.10)

El análisis de humedad de la harina de grillo se realizó siguiendo el método oficial AOAC 925.10 (AOAC & Horwitz, 2005).

En una cápsula tarada se pesaron aproximadamente 3 g de muestra, se colocó la cápsula en la estufa durante 1 hora a 130 ± 3 °C. Terminado el tiempo de secado, se colocó la cápsula en el desecador y se realizó el pesado de la cápsula que contenía la muestra a temperatura ambiente. Se reportó la pérdida de peso como porcentaje de humedad (% Humedad). El ensayo se realizó por triplicado.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{((m_1 + m_2) - m_3)}{m_1} * 100$$

Ec. 2

Dónde:

m₁ = Masa muestra

m₂ = Peso recipiente vacío

m₃ = Peso recipiente + muestra seca

3.1.2.3 Análisis de cenizas (AOAC 923.03)

El análisis de cenizas de la harina de grillo se realizó siguiendo el método oficial AOAC 923.03 (AOAC & Horwitz, 2005).

Se pesó 1 g de muestra en un crisol previamente tarado, se colocó el crisol más la muestra a la mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener cenizas de un color gris claro o hasta que el peso sea constante. El crisol se enfrió en el desecador hasta que alcanzó una temperatura ambiente, se pesó y registró el valor. El ensayo se realizó por triplicado y se reportó el valor como % Cenizas.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(m_3 - m_2)}{m_1} * 100$$

Ec. 3

Dónde:

m₁ = Masa muestra

m₂ = Peso recipiente vacío

m₃ = Peso recipiente + muestra calcinada

3.1.2.4 Determinación de grasa (INEN 523)

La determinación del contenido de grasa de la harina de grillo se realizó utilizando el equipo de Soxhlet.

Se pesaron 5 g de muestra seca en un cartucho de extracción y se registró su peso, se colocaron 60 mL de hexano en un caso previamente tarado. Los cartuchos que contenían la muestra fueron colocados en el equipo Soxhlet al igual que los casos con hexano. Una vez preparado el equipo de extracción se procedió a colocar la temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un tiempo de extracción de 8 horas. Transcurrido este tiempo, se apagó el equipo Soxhlet y se sacó los cartuchos que contenían la muestra desengrasada, los casos

que contenía la grasa extraída fueron colocados en la estufa para que los residuos de hexano se evaporen. Finalmente se pesaron los casos que contenían el extracto de grasa.

El ensayo se realizó por triplicado y se reportó el valor como % Grasa.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100$$

Ec.4

Dónde:

m= Peso de la muestra seca (g)

m₁= Peso del caso vacío (g)

m₂= Peso del caso más la grasa extraída (g)

3.1.2.5 Determinación de fibra cruda (INEN 522)

Se pesaron aproximadamente 2 g de la muestra desengrasada en un crisol para extracción de fibra. Se colocó en el equipo extractor de fibra 200 ml de solución hirviendo de 0,25 N de ácido sulfúrico. Se dejó hervir el crisol con la muestra y la solución de ácido sulfúrico durante 30 min. A través del equipo extractor de fibra se filtró la solución de ácido sulfúrico, se colocaron 1000 ml de agua destilada caliente, para realizar el proceso de lavado de la muestra. Se agregaron 200 ml de solución 0,31 N de hidróxido de sodio hirviendo en el equipo extractor de fibra y se dejó en ebullición durante 30 min. Nuevamente se filtró el hidróxido de sodio y se fue lavando el residuo con 250 ml de la solución 0,25 N de ácido sulfúrico hirviendo y luego con agua destilada hirviendo, hasta que las aguas de lavado no den reacción alcalina.

El residuo fue transferido a un al crisol previamente pesado y se mantuvo en la estufa a 130 ± 2 °C por el tiempo de dos horas. Luego se transfirió al desecador y se dejó enfriar a temperatura ambiente y registró su peso, se colocó el crisol con la muestra seca en la mufla y se procedió a incinerar a una temperatura de 500 ± 50 °C, por el

tiempo de 30 min; se dejó enfriar en un desecador y se tomó su peso final. Finalmente, el porcentaje de fibra cruda se obtuvo mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m} \times 100$$

Ec 5

Dónde:

m= Masa de la muestra desengrasada y seca (g)

m₁= Masa del crisol conteniendo fibra seca (g)

m₂= Masa del crisol conteniendo muestra incinerada (g)

m₃= Masa del crisol de la muestra blanco (g)

m₄= Masa del crisol de la muestra blanco incinerado (g)

3.1.3 Obtención de aislados proteicos de harina de grillo (*Gryllus assimilis*)

La extracción de las proteínas de harina de grillo se realizó por su punto isoelectrico, siguiendo el método descrito por (Martínez & Añón, 1996).

La relación de trabajo harina: solvente fue 1:10 (P/V), la mezcla se agitó durante 30 min, 400 RPM y a temperatura ambiente. Durante la agitación se ajustó el pH a 10.00 con NaOH 2N. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro marca HANNA modelo H1 2221. Las proteínas solubilizadas se centrifugaron a 5 °C, 4500 RPM por 30 min, utilizando una centrifuga marca Eppendorf. Una vez centrifugada la muestra, se utilizó el sobrenadante para precipitar la parte proteica, empleando HCl 2N hasta alcanzar un pH de 3.0, se repitieron los procesos de agitación y centrifugación anteriormente descritos. Finalmente, el precipitado obtenido fue colocado en un frasco de liofilización y mantenido a temperatura de -80 °C durante 72 horas en un ultracongelador marca PANASONIC para su posterior liofilización en un equipo

CHRIST modelo Alpha 1- 4 LDplus. Los aislados proteicos liofilizados se conservaron a temperatura de -20 °C para su posterior análisis.

Para la determinación del punto isoeléctrico de las proteínas contenidas en la harina de grillo se aplicó un diseño experimental A*B. En donde se tuvo 2 factores de estudios: pH de solubilización y pH de precipitación de las proteínas.

*Tabla 3. Diseño factorial A*B completamente azar*

| Factor A: pH de solubilización | Factor B: pH de precipitación |
|--------------------------------|-------------------------------|
| a ₀ : 10.00 | b ₀ : 3.00 |
| a ₁ : 12.00 | b ₁ : 4.00 |
| | b ₂ : 5.00 |
| | b ₃ : 6.00 |

Fuente: Quinteros (2021).

Como resultado de la aplicación de este diseño experimental se obtuvo el porcentaje de rendimiento (% rendimiento) de los aislados proteicos de grillo de cada tratamiento.

3.1.4 Cuantificación de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo

El contenido de proteína de cada aislado proteico obtenido a partir de la harina de grillo se realizó mediante la aplicación de tres métodos: Dumas, BCA y Bradford.

3.1.4.1 Método de BCA

Para la cuantificación de proteína de los aislados proteicos se empleó un Kit de ensayo de BCA marca SIGMA-ALDRICH, utilizando como proteína estándar albúmina de suero bovino (BSA) para la elaboración de la curva de calibración, se trabajó en un rango de concentración de 200 ug/ml a 1000 ug/ml.

Se pesaron 10 mg de proteína liofilizada y se añadieron 1000 ul de agua destilada. Se tomaron 50 ul de la muestra diluida para ser mezcladas con 1000 ul de solución BCA, para el blanco se utilizó agua destilada. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 562 nm en un

espectrofotómetro UV-Vis NANODROP marca Thermo Scientific. Los resultados fueron expresados en mg proteína/g muestra.

3.1.4.2 Método Bradford

Se utilizó un Kit de ensayo Bradford Coomassie Plus marca Thermo Scientific, utilizando como estándar de proteína albúmina de suero bovino (BSA). La curva de calibración se trabajó en una concentración de 125 ug/ml a 1500 ug/ml, se trabajó por triplicado y los resultados fueron expresados en mg proteína/g muestra.

Se pesaron 10 mg de proteína liofilizada y se añadieron 1000 ul de agua destilada. Se tomaron 50 ul y se mezclaron con 1500 ul de solución Coomassie Blue, para el blanco se utilizó agua destilada. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Para la medida de la absorbancia se empleó una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro NANODROP UV-Vis.

3.1.5 Evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas

Las propiedades funcionales de las proteínas se evaluaron bajo el estudio de la solubilidad de proteína, capacidad de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite.

3.1.5.1 Solubilidad proteica

Para el análisis de solubilidad de proteína se empleó el kit de ensayo de BCA (ácido bicinconínico) SIGMA ALDRICH y se siguió el método descrito por (Jarpa-Parra, et al., 2014).

Las muestras fueron preparadas a una concentración de 5 mg/ml y el pH de las suspensiones fueron ajustadas a 3.0, 6.0, 9.0 y 12.0, usando soluciones de NaOH 2N y HCl 2N. Las suspensiones se agitaron durante 1 h y fueron centrifugadas a 10000 RPM por 10 min, el contenido de proteína en el sobrenadante fué determinado con el Kit de

ensayo de BCA, teniendo como estándar albúmina de suero bovino. Las absorbancias de las muestras se midieron a una longitud de onda de 562 nm y el contenido de proteína soluble se expresó como el porcentaje de proteína presente en la muestra.

3.1.5.2 Capacidad de absorción de agua

La determinación de la capacidad de absorción de agua en los aislados proteicos de harina de grillo se realizó mediante la metodología descrita por (Pazmiño et al., 2018).

Los aislados proteicos fueron disueltos en agua destilada en una relación 1:10 (P: V), las soluciones se homogeneizaron en un vortex por 30 s, cada 10 min por 5 tiempos, una vez homogeneizadas las muestras se centrifugaron a 4000 g por 20 min. Se drenó el sobrenadante de los tubos centrifugados considerando un ángulo de 45° durante 10 min, el precipitado retenido se pesó en una balanza analítica. La capacidad de absorción de agua se calculó como el contenido de agua absorbido por el peso de la muestra de proteína.

3.1.5.3 Capacidad de absorción de aceite

La capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos de grillo se determinó siguiendo la metodología descrita por Pazmiño et al (2018) con modificaciones.

Los aislados proteicos fueron preparados a una concentración de 1 mg/10 ml de aceite de oliva, las soluciones se mezclaron en un vortex por 1 min, cada 5 min durante un tiempo total de 30 min. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 g por 15 min. Se drenó el aceite de los tubos centrifugados considerando un ángulo de 45° durante 10 min, una vez retenido el precipitado éste se pesó en una balanza analítica. La capacidad de absorción de aceite se expresó como el contenido de aceite absorbido por gramo de muestra proteica.

3.1.6 Caracterización de las proteínas de grillo por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas se caracterizaron mediante la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes utilizando el método descrito por Laemmli (1970) con modificaciones. Los reactivos y equipos utilizados en esta técnica fueron de marca BIO-RAD, se utilizó como estándar una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos (2 kDa a 250 kDa).

Preparación de la muestra

Se preparó una solución de proteína a una concentración de 10 mg/ml y se centrifugó a 10000 RPM, 5 °C durante 1 min. Se tomaron 100 uL de la muestra centrifugada y se mezcló con 200 ul de buffer de muestra. La solución fue sometida a 90 °C por 5 min.

Separación electroforética

Se preparó un gel separador (12 % acrilamida) y un gel concentrador (4 % acrilamida) de 1 mm de espesor cada uno, utilizando los reactivos de electroforesis en las cantidades sugeridas por el método estándar. Primero se colocó el gel separador y una vez gelificado se colocó el gel concentrador al cual se le añadieron unos peines para formar los pocillos durante el proceso de gelificación. Los geles fueron trasladados a la cámara de electroforesis y se inyectó 20 ul de muestra y estándar en cada pocillo. La cámara se llenó con buffer running y se realizó la corrida a 200 V durante 40 min.

Tinción y análisis del gel

Una vez terminado el proceso de electroforesis, los geles obtenidos fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 durante 18 horas. Al transcurrir este tiempo se procedió a desteñir los geles con una solución metanólica. Los geles se colocaron en el equipo fotodocumentador GELTOWER marca Analytik Jena y mediante el Software Vision

Works se identificaron las bandas moleculares proteicas y se determinaron sus respectivos pesos moleculares.

3.1.7 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Para el proceso de simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* se siguió la metodología descrita por Vilcacundo et al (2018) con modificaciones.

3.1.7.1 Digestión gástrica *in vitro*

Se trabajó con una concentración de proteína de 10 mg/ml de agua destilada a la cual se la añadió 1 ml de simulador de fluido gastrointestinal (NaCl 0,35 M), conteniendo enzima pepsina de origen porcino marca SIGMA ALDRICH a una concentración de 2000 U, la solución fue ajustada a un pH de 2.0. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 2 h a 500 RPM en un termoagitador, una vez transcurrido el tiempo de simulación, se procedió a colocar 200 ul de NaHCO₃ 1 M en los tubos de reacción, estos se llevaron a 90 °C por 5 min con la finalidad de darle un STOP a la reacción. Los digeridos gástricos se congelaron a -20°C para su posterior análisis, las muestras se trabajaron por triplicado.

3.1.7.2 Digestión duodenal *in vitro*

Se tomó 1 ml del digerido gástrico y se mezcló con 1 ml de la solución de enzima pancreatina de origen porcino marca SIGMA ALDRICH preparada a una concentración de 100 U y ajustada el pH a 7.0. De la mezcla E:S se tomó 1 ml para ser mezclados con 1 ml de simulador de fluido intestinal, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 2 h a 500 RPM en un termoagitador. Finalmente, las muestras incubadas se llevaron a 80 °C por 10 min. Los digeridos duodenales se congelaron a -20 °C para su posterior análisis, las muestras se trabajaron por triplicado.

La evaluación del grado de digestibilidad de las proteínas de grillo se realizó mediante la aplicación de la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

3.1.8 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*).

La determinación de la actividad antioxidante se hizo mediante los métodos: ABTS, FRAP y DPPH, para lo cual se obtuvo extractos de cada una de las muestras.

3.1.8.1 Obtención de extractos

Se pesaron 200 mg de proteína liofilizada en tubos de centrifuga y se añadieron 5 ml de solución extractora de metanol al 70 % y 0.1 % de ácido fórmico. La mezcla se agitó durante 10 min y se ultrasonificó por 10 min. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a temperatura de 5 °C y 4500 RPM. Finalmente, el sobrenadante obtenido después de la centrifugación fué colocado en un balón de aforo de 25 ml. Se repitieron 3 veces más los procesos de extracción hasta que se logró obtener los respectivos extractos proteicos. Éstos fueron almacenados a 5 °C para su posterior análisis.

3.1.8.2 Actividad antioxidante por el método ABTS

El método usado fue el descrito por Carrillo et al (2019) con modificaciones. Se preparó la solución de trabajo ABTS mediante la mezcla de Buffer Tampón Fosfato de sodio ajustado a pH 7.0, ABTS y persulfato de potasio marca SIGMA ALDRICH. Se mezclaron 200 ul de extracto de muestra con 3800 ul de solución de trabajo. La muestra fue agitada y mantenida en reposo durante 45 min en un lugar oscuro. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 734 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis. Se usó como blanco el Buffer Tampón Fosfato de sodio.

La curva estándar de Trolox fue lineal entre 200 uM/ml a 500 uM/ml). Los resultados se expresaron como mmol ET/g muestra.

3.1.8.3 Actividad antioxidante por el método de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

La determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP se realizó bajo el procedimiento establecido por Benzie & Strain (1996) con modificaciones.

Se preparó el reactivo FRAP mediante la mezcla de Buffer tampón acetato de sodio 300 mM ajustado a pH 3.6, TPTZ (tripiridil-triazina) 10 mM diluido en HCl 40 mM y cloruro férrico hexahidratado 20 mM. Se mezclaron 900 µl de reactivo FRAP, 90 µl de agua destilada y 30 µl de extracto de muestra. Para el blanco se utilizó solución extractora. Las muestras fueron incubadas a una temperatura de 37 °C por 30 min a 500 RPM, posteriormente se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 593 nm utilizando el espectrofotómetro NANODROP. Se usó Trolox para hacer la curva estándar, empleando concentraciones de 100 µM/ml a 500 µM/ml. Los resultados se representaron como mmol ET/g de muestra.

3.1.8.4 Actividad antioxidante por el método de DPPH

Para el análisis de actividad antioxidante por el método DPPH se utilizó el procedimiento descrito por Brand et al (1995) con modificaciones.

Se preparó solución DPPH 0.06 mM en metanol. Se tomaron 100 µl de extracto con 3900 µl de solución de DPPH para su análisis. El blanco utilizado fue solución extractora. Se agitaron las muestras y se llevaron a reposo a un lugar oscuro durante 30 min, la absorbancia de las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 515 nm. Como estándar para elaboración de la curva de calibración se empleó Trolox en un rango de concentración de 200 µM/ml a 800 µM/ml. Los resultados de actividad antioxidante se expresaron en mmol ET/g muestra y también en porcentaje de actividad, para lo cual se empleó la siguiente expresión matemática.

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} * 100$$

Ec. 6

3.1.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*)

El método de evaluación de la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos de grillo se realizó mediante la consideración del potencial de estabilización de la membrana cuyo método ha sido descrito por Bouhlali et al (2016) con modificaciones.

3.1.9.1 Método del potencial de estabilización de la membrana

Se preparó una solución anticoagulante esterilizada que contenía ácido cítrico al 0.05 %, cloruro de sodio al 0,42 %, citrato de sodio al 0,80 % y dextrosa al 2 % en agua destilada estéril. Se mezcló en proporción 1:1 solución anticoagulante con la sangre extraída de voluntarios humanos sanos que no utilizaron ningún AINE durante quince días antes de la recogida de sangre. La mezcla fue centrifugada a 4000 RPM por 30 min a temperatura ambiente. La solución de sangre resultante se desechó y el sedimento celular se lavó con solución salina isotónica (9 g/L) que se usó luego para preparar una suspensión que contenía un sedimento celular al 10 %.

La mezcla de reacción contenía 1,0 ml de tampón fosfato, 1,0 ml de extracto de muestra (20 mg/ml), 0,5 ml de suspensión de sangre (10 %) y 2,0 ml de solución salina hipotónica (3,6 g/L). Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C y después centrifugadas a 10000 RPM por 10 min. El contenido de hemoglobina del sobrenadante se midió mediante un espectrofotómetro a 560 nm.

Los resultados se obtuvieron mediante la aplicación de la ecuación 7 y se expresaron como porcentaje de protección (% PP).

$$\% PP = 100 - \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control} * 100$$

Ec. 7

3.2 Investigación experimental

Se adquirieron grillos deshidratados en la Granja SARGRILLO ubicada en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. Se aplicó un diseño experimental A*B, teniendo para el factor A el pH de solubilización con 2 nivel de estudio: pH 10.0 y pH .120; y para el factor B el pH de precipitación con 4 niveles: pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0 y pH 6.0. Por lo tanto, se analizaron 8 tratamientos y los ensayos se trabajaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete de Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.03.

CAPÍTULO IV. APLICACIÓN Y/O VALIDACIÓN DE LA PROPUESTA

4.1 Resultados y discusión

4.1.1 Análisis proximal de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)

El ensayo proximal de la harina de grillo se realizó siguiendo los métodos oficiales de análisis AOAC (humedad y cenizas) y la normativa INEN para el caso de grasa y fibra cruda. Para la determinación de proteína se utilizó el método Dumas, en virtud de que es un método ampliamente utilizado en los laboratorios que garantiza resultados rápidos, facilidad de uso y seguridad. A menudo se considera una alternativa al método clásico de Kjeldahl puesto que está validado por organizaciones internacionales como AOAC, ISO, entre otras. En la tabla 4 se pueden observar los resultados obtenidos de cada parámetro.

*Tabla 4. Análisis proximal de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*).*

| Parámetro | % |
|---------------|--------------|
| Proteína | 65,40 ± 2,25 |
| Grasa | 20,00 ± 1,94 |
| Fibra | 5,01 ± 0,07 |
| Cenizas | 4,94 ± 0,18 |
| Humedad | 3,50 ± 0,05 |
| Carbohidratos | 1,15 ± 0,06 |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Los resultados muestran que la harina de grillo posee un alto contenido proteico con un valor de 65,40 %, el contenido de grasa también fue alto con un valor de 20 %. Por otro lado, el contenido de cenizas y humedad representan un valor bajo de 4,94 % y 3,50 % respectivamente.

Estos resultados son comparables con los obtenidos en un estudio realizado por Vera (2020) de harina de grillo obtenida en la granja SARGRILLO, cuyo valor encontrado fue de 50 % en proteína y 20 % en grasa. Así también, Soares et al (2018) en su estudio

realizado sobre la composición nutricional de *Gryllus assimilis* determinó un contenido de proteína del 65,52 %. Estudios realizados por Montowska et al (2019) describen a la harina de grillo como un ingrediente comestible de fácil acceso que contiene entre 45 % a 70 % de proteína, 20 % a 30 % de lípidos, 5 % a 20 % de fibra y 5 % de cenizas.

4.1.2 Obtención de aislados proteicos de harina de grillo (*Gryllus assimilis*)

Los aislados proteicos de harina de grillo (*Gryllus assimilis*) fueron obtenidos por precipitación isoelectrica, se determinó el porcentaje de rendimiento de cada tratamiento mostrándose en la tabla 5 los resultados de este parámetro.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento de los aislados y concentrados proteicos de grillo (Gryllus assimilis) a diferentes pHs.

| Tratamientos pH solubilización-pH de precipitación | % Rendimiento por cada 20 g muestra |
|---|--|
| 10.0-3.0 | 33,92 ± 1,53 ^b |
| 10.0-4.0 | 36,18 ± 2,68 ^b |
| 10.0-5.0 | 32,28 ± 6,05 ^b |
| 10.0-6.0 | 19,07 ± 4,90 ^c |
| 12.0-3.0 | 67,05 ± 3,32 ^a |
| 12.0-4.0 | 72,75 ± 6,18^a |
| 12.0-5.0 | 67,77 ± 2,39 ^a |
| 12.0-6.0 | 11,56 ± 4,90 ^c |

Elaborado por: Quinteros (2021).

En la tabla 5 se observa que el tratamiento 12.0-4.0 tiene un rendimiento del 72,75 % por cada 20 g de muestra, siendo superior a los porcentajes de rendimientos obtenidos con el pH de solubilización de 10.0. Mediante el análisis estadístico ANOVA se establece que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del % de rendimiento entre cada tratamiento y otro, con un nivel de confianza del 95,0 %. Mediante la aplicación de la prueba de comparación múltiple Tukey se identificó que los tratamientos 12.0-3.0, 12.0-4.0 y 12.0-5.0 poseen porcentajes de rendimientos altos

con valores similares, demostrando diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos.

Además, se aplicó un diseño factorial A*B que permitió identificar el mejor tratamiento en base al pH de solubilización y precipitación de la proteína de grillo. Los resultados de rendimiento indican que los pHs 10.0 y 12.0 influyen directamente sobre los pHs de precipitación 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0. Sin embargo, al denotar altos valores de rendimientos con el pH 12.0 se establece que las proteínas contenidas en harina de grillo tienden a solubilizar a pHs altamente alcalinos. Por otra parte, se pudo establecer que a pH 3.0, pH 5.0 y especialmente a pH 4.0 las proteínas de grillo no poseen carga eléctrica siendo incapaces de desplazarse en un campo eléctrico y por lo tanto tendiendo a precipitar.

La obtención de proteína extraída utilizando como solvente agua permite establecer la existencia de proteínas solubles en agua. Estudios realizados anteriormente han determinado que los grillos contienen una variedad compleja de proteínas de solubilidad muy variables, siendo el 20 % de las proteínas solubles en agua, ya que la fracción insoluble en agua incluye una gran cantidad de proteínas musculares (Y et al., 2013; Montowska et al., 2019). La solubilidad de las proteínas aumenta en condiciones de pH alcalino con una alta fuerza iónica que permite la extracción con rendimientos potencialmente mayores (Hirsch et al., 2019).

4.1.3 Cuantificación de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo

El contenido de proteína en las diferentes muestras de aislados proteicos de harina de grillo se determinó mediante tres métodos: Dumas, Bradford y BCA. Los resultados obtenidos por cada método de ensayo se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Contenido de proteína en los aislados y concentrados de grillo (*Gryllus assimilis*) mediante la aplicación del método Dumas, Bradford y BCA.

| Tratamientos pH solubilización- pH de precipitación | Método Dumas | Método Bradford | Método BCA |
|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | % Proteína | mg proteína/g muestra | mg proteína/g muestra |
| 10.0-3.0 | 74,62 ± 0,76 ^{b,c} | 91,07 ± 0,48 ^b | 521,97 ± 3,27^a |
| 10.0-4.0 | 77,42 ± 1,03 ^{a,b,c} | 83,32 ± 0,00 ^c | 202,41 ± 5,68 ^f |
| 10.0-5.0 | 77,13 ± 0,66 ^{b,c} | 80,02 ± 0,83 ^c | 149,47 ± 3,27 ^g |
| 10.0-6.0 | 73,38 ± 0,45 ^{b,c} | 99,37 ± 0,96^a | 225,1 ± 5,68 ^e |
| 12.0-3.0 | 75,96 ± 0,19 ^{c,d} | 72,55 ± 1,44 ^d | 264,81 ± 0,00 ^d |
| 12.0-4.0 | 79,02 ± 1,33 ^{a,b} | 80,83 ± 4,98 ^c | 334,77 ± 8,67 ^c |
| 12.0-5.0 | 79,42 ± 0,57^a | 34,68 ± 1,26 ^e | 105,98 ± 5,67 ^h |
| 12.0-6.0 | 70,98 ± 0,45 ^f | 91,35 ± 0,95 ^b | 368,81 ± 8,67 ^b |

Elaborado por: Quinteros (2021).

En la tabla 6 se reportan altos valores obtenidos del contenido de proteína de grillo mediante la aplicación de tres métodos de cuantificación. Por el método Dumas los tratamientos 12.0-4.0 y 12.0-5.0 presentan un valor aproximado de 80 % de contenido de proteína, mientras que por el método Bradford se pudo determinar 99,37 mg proteína/g muestra en el aislado a pH 10.0-6.0. Sin embargo, el aislado proteico que mayor contenido de proteína presentó por el método BCA fue el 10.0-3.0, teniendo como resultado 521,97 mg proteína/g muestra.

La diferencia de los valores de concentración de proteína obtenidos por diferentes métodos de cuantificación se debe a la sensibilidad que presenta cada uno de ellos frente a la capacidad que tienen las proteínas para formar derivados químicos en el caso del método BCA y Bradford, mientras que Dumas se basó en la combustión de la muestra para la determinación del porcentaje de nitrógeno.

En el análisis de ANOVA correspondiente al método Dumas, se pudo identificar al valor-P de la prueba-F menor que 0,05, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre la media del % de proteína entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. La prueba de comparación múltiple Tukey arrojó como resultado la existencia de diferencia significativa del tratamiento 12.0-6.0 con relación a los otros tratamientos. Mientras que, el resto de aislados proteicos no tienen diferencia significativa entre sí.

En el ensayo del método Bradford, se observó que el análisis estadístico mediante ANOVA presentó un valor-P de la prueba-F fue menor que 0,05, mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mg proteína/g muestra entre un nivel de tratamientos y otro, con un nivel del 95,00 % de confianza. Por otra parte, la aplicación de un procedimiento de comparación múltiple TUKEY determinó que el aislado proteico 10.0-6.0 presenta diferencia significativa en concentración de proteína con respecto a los 7 tratamientos realizados. También, se puede establecer que las medias son significativamente diferentes entre los aislados proteicos solubilizados a pH 10.0 y 12.0.

Además, se puede identificar los resultados obtenidos de concentración de proteína por el método BCA, mediante el análisis estadístico realizado y la aplicación de la prueba de comparación TUKEY se pudo identificar que entre los tratamientos existe diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,00 %, siendo el aislado proteico 10.0-3.0 con mayor contenido proteico (521,97 %) induciendo a establecer la presencia de cuatro aminoácidos específicos (triptófano, cistina, cisteína y tirosina) en este aislado proteico de grillo.

4.1.4 Evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas

4.1.4.1 Solubilidad de la proteína

Los resultados del porcentaje de solubilidad (%), obtenidos de los aislados proteicos de grillo se encuentran representados en el gráfico 1 y 2; y en las tablas 7 y 8.

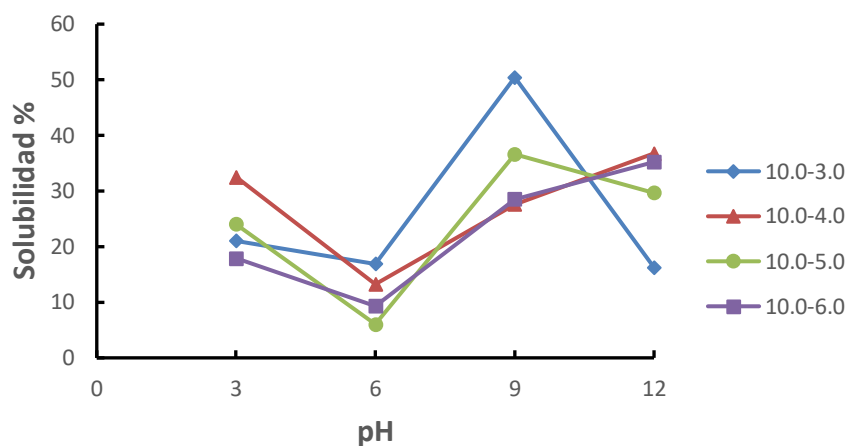


Gráfico 1. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 10.0 de solubilización.

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 7. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 10.0 de solubilización.

| Aislados Proteicos | pH | % Solubilidad |
|--------------------|-------|---------------------------|
| 10.0-3.0 | 3.00 | 21,02 ± 0,73 ^d |
| | 6.00 | 16,88 ± 0,81 ^e |
| | 9.00 | 50,43 ± 1,79 ^a |
| | 12.00 | 16,25 ± 1,73 ^e |
| 10.0-4.0 | 3.00 | 32,49 ± 1,12 ^b |
| | 6.00 | 13,24 ± 0,58 |
| | 9.00 | 27,60 ± 0,25 ^e |
| | 12.00 | 36,77 ± 2,05 ^b |
| 10.0-5.0 | 3.00 | 24,05 ± 1,52 ^c |
| | 6.00 | 6,05 ± 0,53 ^f |
| | 9.00 | 36,60 ± 1,73 ^b |
| | 12.00 | 29,68 ± 1,76 ^e |
| 10.0-6.0 | 3.00 | 17,89 ± 0,99 |
| | 6.00 | 9,31 ± 0,13 ^f |
| | 9.00 | 28,55 ± 0,43 ^c |
| | 12.00 | 35,21 ± 0,53 ^b |

Elaborado por: Quinteros (2021).

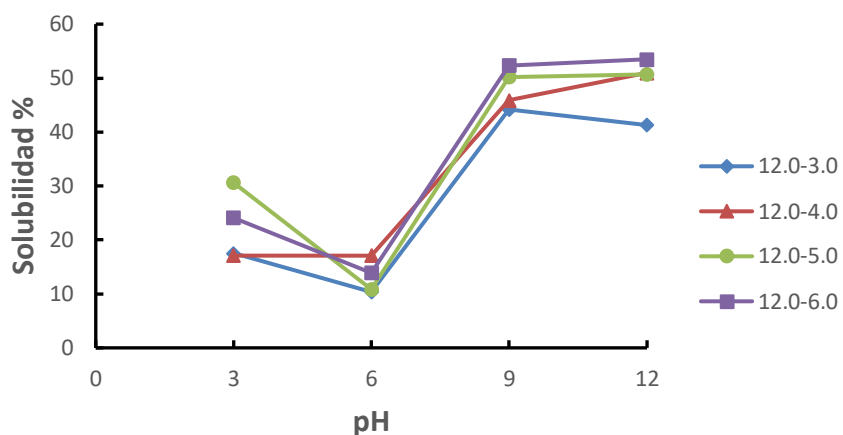


Gráfico 2. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 12.0 de solubilización.

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 8. Porcentaje de solubilidad de la proteína (%) de los aislados proteicos ensayados a pH 12.0 de solubilización.

| Aislados Proteicos | pH | % Solubilidad |
|--------------------|-------|---------------------------|
| 12.0-3.0 | 3.00 | 17,52 ± 0,76 ^d |
| | 6.00 | 10,37 ± 0,45 ^e |
| | 9.00 | 44,18 ± 0,94 ^b |
| | 12.00 | 41,30 ± 1,14 ^b |
| 12.0-4.0 | 3.00 | 17,10 ± 0,47 ^d |
| | 6.00 | 17,13 ± 0,37 ^d |
| | 9.00 | 45,88 ± 0,38 ^b |
| | 12.00 | 50,98 ± 1,76 ^a |
| 12.0-5.0 | 3.00 | 30,64 ± 3,49 ^c |
| | 6.00 | 10,87 ± 0,13 ^e |
| | 9.00 | 50,22 ± 0,38 ^a |
| | 12.00 | 50,68 ± 2,55 ^a |
| 12.0-6.0 | 3.00 | 24,11 ± 0,43 ^c |
| | 6.00 | 13,89 ± 0,92 ^e |
| | 9.00 | 52,35 ± 2,72 ^a |
| | 12.00 | 53,49 ± 1,75 ^a |

Elaborado por: Quinteros (2021).

En los gráficos 1 y 2 se observa que la solubilidad de los aislados proteicos fue mayor a pH ácidos y alcalinos, los porcentajes más bajos fueron obtenidos a pH 6.0 cercanos al pH neutro. Mediante el análisis estadístico realizado se pudo determinar que los pHs 9.0 y 12.0 permitieron obtener porcentajes más altos de solubilidad en cada tratamiento aproximadamente 50 %, mientras que a pH 6.0 las muestras tendieron a bajar su propiedad. Akposan et al (2015) establecen que la solubilidad de las harinas u aislados se atribuye al punto isoeléctrico de la proteína. Además, se puede establecer que a pHs bajos los grupos carboxilo tienden a desplazarse hacia formas sindicalizadas, reduciendo la afinidad de las proteínas por las moléculas de agua. Los cambios en el pH también afectan la carga neta general de hidrolizados que influye en las fuerzas repulsivas y atractivas.

Estadísticamente se puede identificar diferencia significativa en el porcentaje de solubilidad entre las medias de un tratamiento con otro. La solubilidad de las proteínas al verse afectada por el factor pH presentan distintos comportamientos en cada ensayo. Se debe considerar que las proteínas globulares son solubles en agua debido a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que están colocados en la superficie de la proteína y que establecen enlaces por puente de Hidrógeno con el agua haciendo que su solubilidad aumente cuanto mayor sea el contenido de aminoácidos polares como Glu, Asp, Lys, Arg, His, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Gln y Asn (Hirsch., 2019).

Recientes estudios han demostrado que las proteínas aisladas de grillo presentan excelente actividad emulsificante, capacidad de formación de espuma y solubilidad comparadas con las proteínas provenientes de las leguminosas (Zielńska et al., 2018; Stone et al., 2019), por lo que este producto de grillo se está utilizando para complementar o reemplazar componentes ricos en proteínas en varios alimentos como emulsiones de carne, pan y pasta (Kim et al., 2017; Osamani et al., 2017; Duda et al., 2019).

Hall et al (2016) mencionan que las interacciones de proteína-agua influyen en la funcionalidad de las proteínas de grillo, haciendo que la solubilidad sea un buen

indicador para las aplicaciones industriales. En su estudio muestran la solubilidad de las proteínas de cada ensayo en diferentes condiciones de pH, los ensayos fueron significativamente ($p < 0.05$) más solubles en un amplio rango de pH en comparación con el control, llegando alcanzar hasta 92 % de solubilidad.

4.1.4.2 Capacidad de absorción de agua

La determinación del porcentaje de absorción de agua fue otro parámetro considerado para la evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas. En la tabla 9 se pueden observar los resultados obtenidos de este ensayo.

Tabla 9. Porcentaje de capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos de harina de grillo (*Gryllus assimilis*) a diferentes pHs.

| Tratamientos pH solubilización-pH de precipitación | % Capacidad de absorción de agua |
|---|-------------------------------------|
| 10.0-3.0 | 29,76 ± 0,49 ^b |
| 10.0-4.0 | 25,11 ± 0,95 ^{b,c} |
| 10.0-5.0 | 25,29 ± 3,23 ^{b,c} |
| 10.0-6.0 | 23,40 ± 1,87 ^c |
| 12.0-3.0 | 41,25 ± 0,98 ^a |
| 12.0-4.0 | 28,92 ± 1,58 ^{b,c} |
| 12.0-5.0 | 28,18 ± 3,73 ^{b,c} |
| 12.0-6.0 | 27,66 ± 0,28 ^{b,c} |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Mediante la obtención de los resultados se puede identificar que el tratamiento 12.0-3.0 posee 41,25 % de capacidad de absorción de agua, mostrando un alto valor de esta propiedad funcional frente a los demás tratamientos. Mediante el empleo de la prueba de comparación de Tukey se pudo identificar que los aislados proteicos 10.0-3.0 y 10.0-6.0 presentan diferencia significativa con respecto a los otros aislados. Sin embargo, se pudo notar que no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos 10.0-4.0, 10.0-5.0, 12.0-4.0, 12.0-5.0 y 12.0-6.0.

4.1.4.3 Capacidad de absorción de aceite

Los resultados obtenidos del porcentaje de capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos de grillo a diferentes pHs se encuentran descritos en la tabla 10.

Tabla 10. Porcentaje de capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*) a diferentes pHs.

| Tratamientos pH solubilización-pH de precipitación | % Capacidad de absorción de aceite |
|---|---------------------------------------|
| 10.0-3.0 | 67,55 ± 2,28 ^d |
| 10.0-4.0 | 51,70 ± 1,62 ^b |
| 10.0-5.0 | 51,90 ± 1,72 ^b |
| 10.0-6.0 | 27,10 ± 0,09 ^a |
| 12.0-3.0 | 59,03 ± 1,83 ^c |
| 12.0-4.0 | 56,67 ± 2,57 ^{bc} |
| 12.0-5.0 | 59,36 ± 2,04 ^c |
| 12.0-6.0 | 72,93 ± 2,04^d |

Elaborado por: Quinteros (2021)

El tratamiento 12.0-6.0 presenta un % de capacidad de absorción de aceite aproximado del 73 %, siendo el mejor tratamiento con respecto a esta propiedad funcional. Mediante el análisis de varianza aplicado al ensayo realizado, se puede establecer que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de porcentaje de capacidad de absorción de aceite entre un nivel de tratamientos y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Por otra parte, se realizó un procedimiento de comparación múltiple denominado Tukey, con esta prueba se determinó que los tratamientos 12.0-3.0, 12.0-4.0 y 12.0-5.0 presentan valores de % de capacidad de absorción de aceite similares, al igual que los tratamientos 10.0-3.0 y 12.0-6.0. Mientras que la media obtenida del el aislado proteicos 10.0-6.0 es significativamente diferente a las otras muestras.

4.1.5 Caracterización de las proteínas de grillo por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE

La caracterización de las proteínas de grillo se realizó mediante una separación molecular empleando la técnica de electroforesis en presencia de ducocil sulfato de sodio en condiciones desnaturizantes. En el gráfico 3 se observan las bandas de proteína de cada tratamiento ensayado, conjunto con un estándar de proteínas de un rango de peso de 2 kDa a 250 kDa.

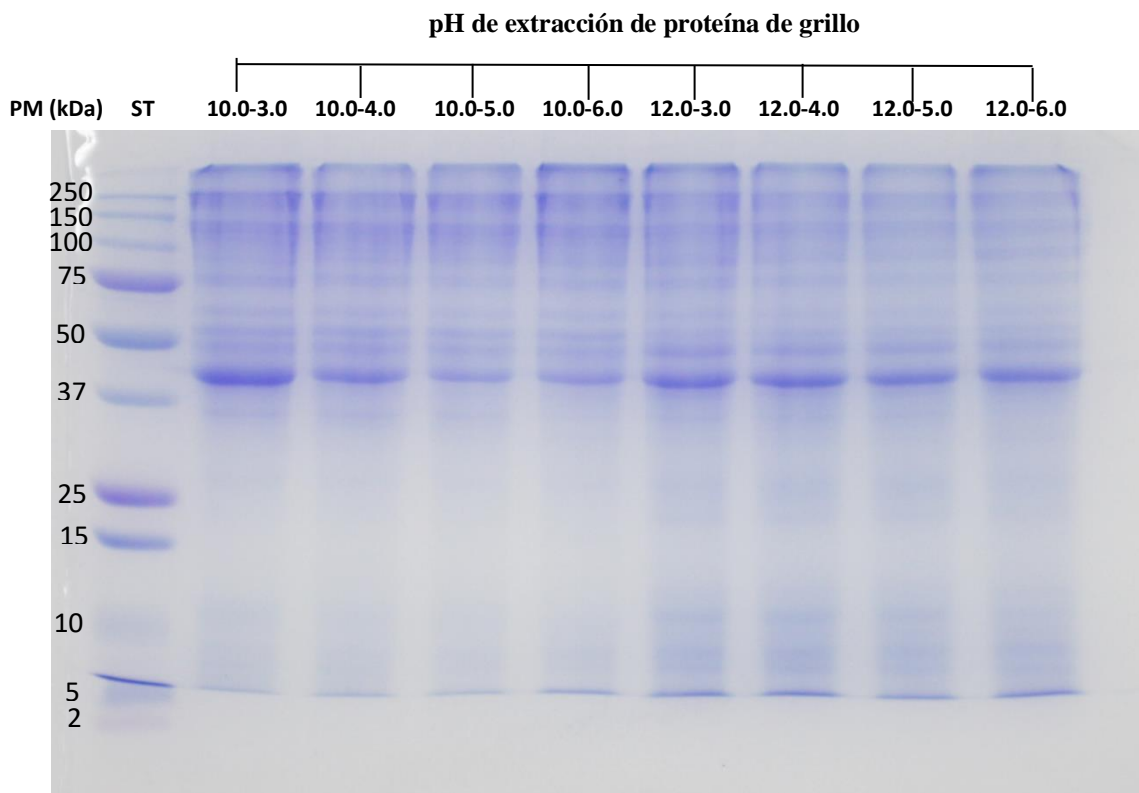


Gráfico 3. Caracterización proteica de grillo (*Gryllus assimilis*) por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE. Pocillo 1 (estándar de proteínas), pocillo 2 (10-3), pocillo 3 (10-4), pocillo 4 (10-5), pocillo 5 (10-6), pocillo 6 (12-3), pocillo 7 (12-4), pocillo 8 (12-5) y pocillo 9 (12-6).

Elaborado por: Quinteros (2021)

Las bandas de proteína de grillo fueron analizadas mediante el uso del fotodocumentador y el software Vision Work. En el análisis de caracterización de las

proteínas de grillo se identificaron bandas proteicas de 250 kDa, 150 kDa, 75 kDa, 50 kDa y 37 kDa. Sin embargo, la banda de proteína correspondiente a un peso aproximado de 45 kDa presenta mayor pronunciamiento con respecto a las demás, lo que significa que esta proteína se puede encontrar en mayor cantidad en las muestras de estudio. Por otro lado, la banda proteica correspondiente a 37 kDa no se puede identificar en los tratamientos 10.0-6.0 y 12.0-6.0, debido a que el pH de precipitación utilizado no permite obtener proteínas con este peso molecular.

Además, se puede observar que los aislados proteicos de grillo extraídos a un pH de solubilización de 12.0 y a pHs de precipitación de 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 poseen proteínas de bajo peso molecular que comprenden pesos moleculares entre 5 kDa a 10 kDa. Este tipo de proteínas pertenecen al grupo de las albúminas.

Los grillos contienen una variedad compleja de proteínas de peso molecular muy variable, proteínas de 20 kDa-35 kDa que aumentan en condiciones de pH alcalino con alta fuerza iónica (Kim y col., 2017). Estudios realizados por Hall et al (2016) realizaron geles en poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y observaron varias bandas que van desde menos de 212 kDa a 14,4 kDa en la proteína de grillo aislada.

4.1.6 Simulación de digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

Las proteínas extraídas de la harina de grillo fueron sometidas a un proceso de hidrólisis enzimática simulando las condiciones fisiológicas del estómago humano. Para el ensayo de simulación gastrointestinal se utilizó enzima pepsina y pancreatina. En el gráfico 4 y 5 se pueden observar los resultados obtenidos de la caracterización proteica de los digeridos gástricos (DG) y digeridos duodenales (DD) de los aislado proteico obtenidos con un pH de solubilización de 10.0 y 12.0 con sus pHs de precipitación de 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0.

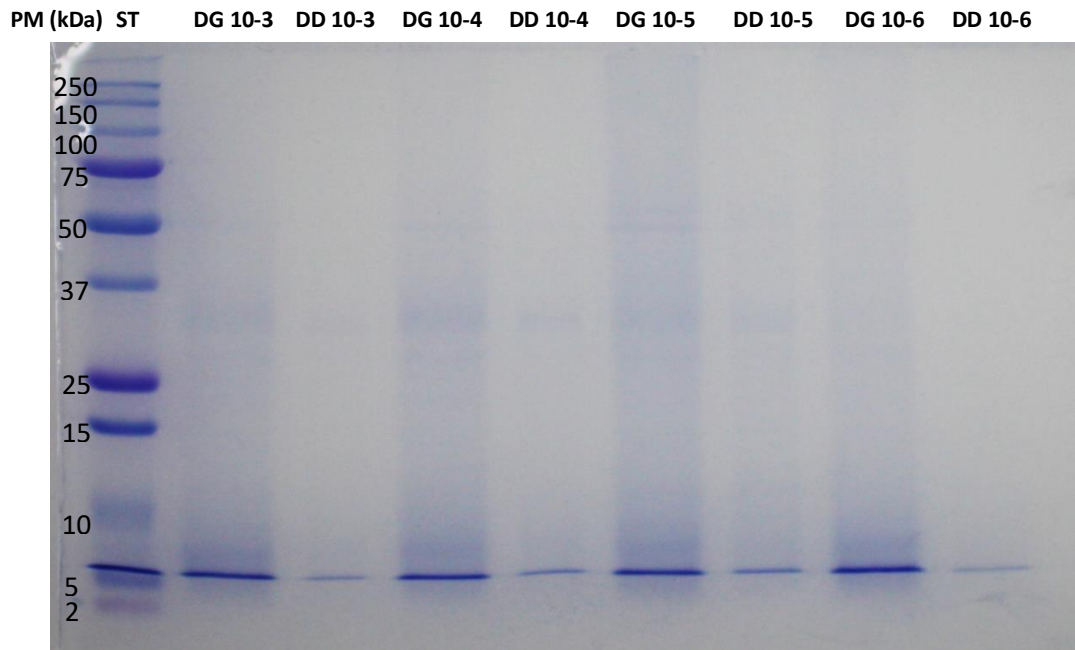


Gráfico 4. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*) solubilizados a pH 10.0 y precipitados a pHs 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0.
Elaborado por: Quinteros (2021)

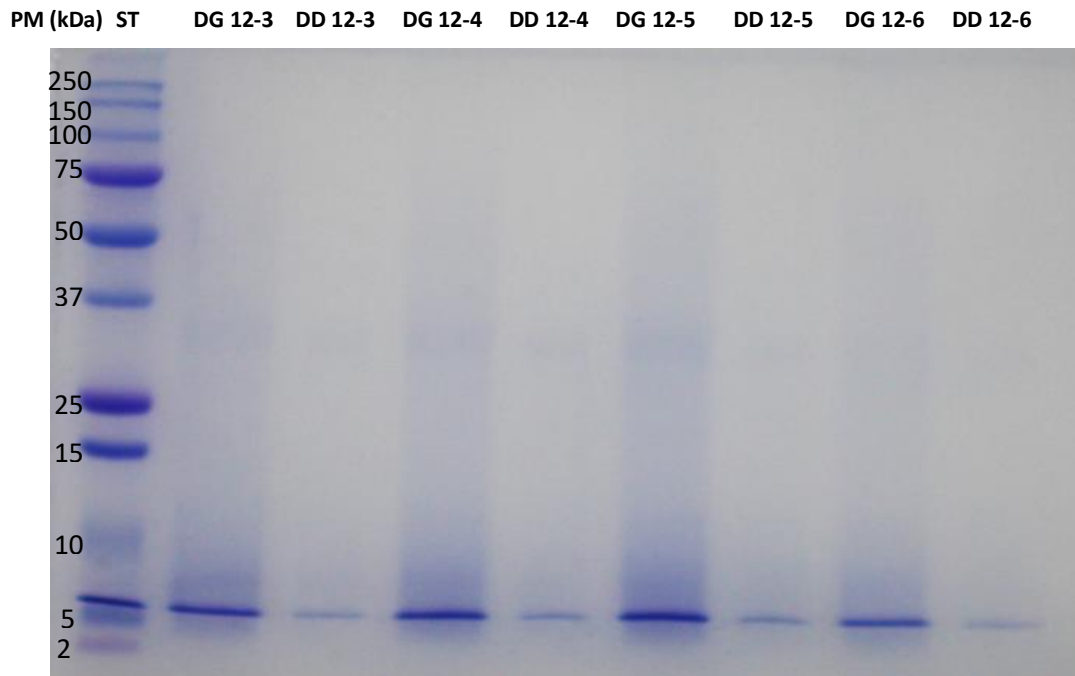


Gráfico 5. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*) solubilizados a pH 12.0 y precipitados a pHs 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0.
Elaborado por: Quinteros (2021)

En los geles obtenidos se observa que no existe presencia de bandas de proteínas, determinado una digestibilidad total. Por lo tanto, se puede establecer que las proteínas de las muestras analizadas fueron hidrolizadas completamente por las enzimas utilizadas. Estos resultados obtenidos son comparables con los obtenidos por Hall et al (2016), en su investigación demostraron que la mayoría de los ensayos de hidrolizados de proteína de grillo no predominaban bandas de proteínas. Sin embargo, mostraron una única banda predominante de bajo peso molecular de 14,40 kDa.

La digestibilidad de las proteínas está directamente relacionada con la hidrólisis que estas sufren, la hidrólisis controlada utilizando enzimas comerciales, concentración de enzima adecuada, pH y temperatura son parámetros fundamentales para su completa degradación. Hall et al (2016) en su estudio demostraron que la hidrólisis enzimática controlada de grillos enteros puede crear con éxito hidrolizados de proteínas con una funcionalidad proteica mejorada. Además, mencionan que los insectos son una alternativa viable por su alto valor nutritivo y sostenibilidad.

4.1.7 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*).

En la tabla 11 se observan los valores de actividad antioxidante *in vitro*, expresados en mmol de trolox contenidos por gramo de aislado proteico de harina de grillo obtenidos a diferentes pHs de precipitación.

Tabla 11. Determinación de la actividad antioxidante in vitro de los aislados proteicos de harina de grillo (Gryllus assimilis) a diferentes pHs.

| Tratamientos pH solubilización- pH de precipitación | ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | | |
|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | Método FRAP | Método ABTS | Método DPPH |
| | mmol ET/g muestra | mmol ET/g muestra | mmol ET/g muestra |
| 10.0-3.0 | 65,15 ± 0,86 ^d | 100,34 ± 3,67 ^f | 68,01 ± 1,98^c |
| 10.0-4.0 | 70,03 ± 2,59^e | 85,53 ± 1,02 ^e | 63,91 ± 2,62 ^c |
| 10.0-5.0 | 39,83 ± 0,43 ^c | 61,35 ± 0,51 ^b | 27,45 ± 5,94 ^a |
| 10.0-6.0 | 39,78 ± 1,79 ^c | 58,06 ± 0,00 ^a | 21,70 ± 7,11 ^a |
| 12.0-3.0 | 31,25 ± 0,75 ^{ab} | 68,49 ± 0,51 ^c | 22,23 ± 1,7 ^a |
| 12.0-4.0 | 34,22 ± 0,75 ^b | 69,04 ± 0,51 ^c | 31,91 ± 3,56 ^a |
| 12.0-5.0 | 28,06 ± 0,43 ^a | 63,61 ± 1,76 ^b | 31,40 ± 2,62 ^a |
| 12.0-6.0 | 35,06 ± 1,54 ^b | 124,30 ± 1,82^g | 46,99 ± 1,77 ^b |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Se determinó mediante el método de FRAP, que la muestra 10.0–4.0 presentó mayor actividad antioxidante de 70,03 mmol ET/g muestra, mientras que con el método ABTS el tratamiento que mayor actividad antioxidante tuvo fue el 12.0–6.0 con un valor de 124,30 mmol ET/g muestra. Por otro lado, con el método DPPH se obtuvo 68,01 mmol ET/g muestra para el tratamiento 10.0–3.0 y un porcentaje de actividad de 59,20 %. El análisis de varianza obtenido mediante el paquete estadístico Statgraphics mostró que la combinación del pH de solubilización vs el pH de precipitación son factores que influyen en la actividad antioxidante de los aislados proteicos de grillo, mostrando diferencia significativa entre los tratamientos.

Los altos valores obtenidos de actividad antioxidante de las proteínas de grillo se deben a que los insectos poseen un sistema de enzimas antioxidantes y moléculas antioxidantes de bajo peso molecular que de forma concatenada responden al ataque de oxidantes dietéticos y producidos de forma endógena. Enzimas antioxidantes como

superóxido dismutasa, catalasa, glutatión transferasa y glutatión reductasa han sido caracterizados en insectos (Felton & Summers, 1995).

Estudios realizados en harina proveniente de larvas de insectos como *Hermetia illucens* han permitido obtener con éxito proteínas y/o hidrolizados con una mayor capacidad antioxidante, se determinaron valores de 60 % a 85 % de actividad (Kumah et al., 2019). Zielínska et al (2016) mediante su investigación determinaron el potencial antioxidante de los hidrolizados de insectos comestibles representados como la actividad de eliminación de radicales libres, la actividad quelante de iones y el poder reductor. Por otro lado, Flores et al (2020) en su estudio publicado acerca de la actividad antioxidante y antimicrobiana de insectos comestibles como la familia de los (*Tenebrionidae*) comúnmente conocidos como escarabajos, determinaron que las proteínas extraídas presentan una alta actividad antioxidante.

4.1.8 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de grillo (*Gryllus assimilis*)

Mediante la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*, se determinó que los tratamientos con pH de precipitación de 6.0 fueron los que alcanzaron un porcentaje de protección más alto, comparado con el obtenido por el patrón diclofenaco monosódico.

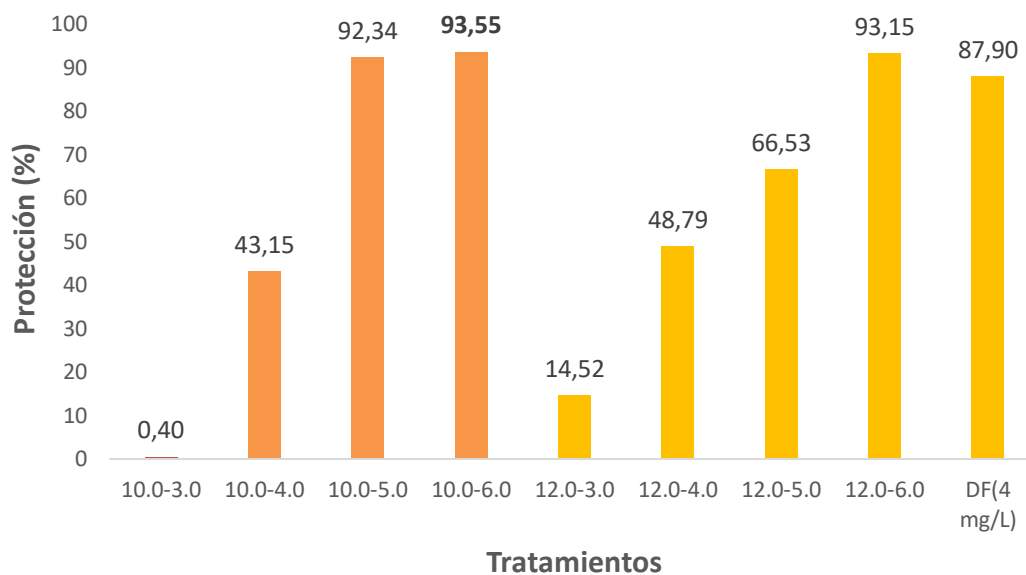


Gráfico 6. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de harina de grillo (*Gryllus assimilis*) a diferentes pHs de solubilización y precipitación.

Elaborado por: Quinteros (2021)

El aislado proteico 10.0–6.0 presentó 93,55 % de protección, mientras que el tratamiento 12.0–6.0 presentó 93,15 % de protección, estos valores al ser comparados con el obtenido por el patrón (87,90 %) permiten establecer que las proteínas extraídas de grillo tienen un porcentaje alto de protección frente al proceso de inflamación al igual que un fármaco antiinflamatorio estándar. Mediante el análisis de varianza aplicado al ensayo realizado, se puede establecer que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de protección entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza.

4.2 Evaluación de expertos

AVAL DEL EXPERTO

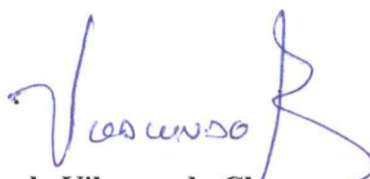
En calidad de Experto del Trabajo de Titulación “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)” propuesto por Quinteros Meneses María Fernanda, como autora para optar por el título magíster en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos.

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación cumple con los objetivos, metodologías y resultados relacionados al tema propuesto, siendo una investigación de buena calidad ya que se logró obtener aislados proteicos de harina de grillo que presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Ambato, 28 de octubre de 2021.

Atentamente,



Edgar Marcelo Vilcacundo Chamorro PhD.c

CC: 1803015484

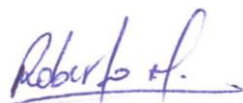
4.3 Evaluación de usuarios

AVAL DEL USUARIO

Yo, Roberto Carlos Morán en calidad de Ingeniero en Alimentos y como colaborador del grupo de investigación AGROBIOPROPEP, certifico que el Proyecto de Titulación con el “Evaluación de las actividades biológicas *in vitro* de los aislados proteicos obtenidos a partir de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*)” propuesto por Quinteros Meneses María Fernanda, estudiante del programa de Maestría en Agroindustria mención Tecnología de Alimentos, paralelo “Único”, cohorte 2020 de la Universidad Técnica de Cotopaxi, asevero que dicho trabajo de investigación ha sido realizado en base a métodos estandarizados en los laboratorios de biología molecular y preparación de muestras de la Universidad Estatal de Bolívar. Además, que cumple con los objetivos, metodologías y resultados relacionados al tema propuesto, logrando obtener aislados proteicos de harina de grillo que presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Guaranda, 28 de octubre de 2021.

Atentamente,



Ing. Roberto Carlos Morán Reascos
Técnico de laboratorio de la DIVIUEB
CC: 1725581175
0993204292

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- ❖ Con la aplicación de pHs alcalinos para la solubilización de las proteínas y pHs ácidos para su precipitación se pudo obtener aislados proteicos de harina de grillo, determinando que el tratamiento con mayor porcentaje de rendimiento fue el 12.0-4.0 con un valor del 72,75 %.
- ❖ Se aplicaron tres métodos de cuantificación para la determinación del contenido de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo, obteniendo valores altos en los siguientes tratamientos: 12.0-5.0 presentó 79,42 % de proteína (Dumas), con el tratamiento 10.0-6.0 se obtuvo un valor de 99,37 mg de proteína/g muestra (Bradford). Finalmente, con el tratamiento 10.0-3.0 se determinó un contenido de proteína de 521,97 mg de proteína/g muestra (BCA).
- ❖ Se caracterizaron las proteínas de harina de grillo por electroforesis SDS – PAGE, encontrando bandas de proteína de pesos moleculares entre 250 kDa a 37 kDa. Sin embargo, la banda de proteína correspondiente a un peso aproximado de 45 kDa presentó mayor pronunciamiento.
- ❖ La determinación del porcentaje de solubilidad proteica, capacidad de absorción de agua y aceite permitieron evaluar las propiedades funcionales de los aislados proteicos de harina de grillo. Los aislados proteicos 10.0-3.0 y 12.0-4.0 permitieron obtener 50,43 % y 53,49 % de solubilidad respectivamente, mientras que el tratamiento 12.0-3.0 presentó un % de capacidad de absorción de agua del 41,25 % y el tratamiento 12.0-6.0 mostró un % de capacidad de absorción de aceite del 72,93 %.

- ❖ Los aislados proteicos que presentaron un mayor porcentaje de actividad antioxidante fueron los tratamientos 10.0-4.0, 12.0-6.0 y 10.0-3.0 con valores 70.03 mmol ET/g muestra (FRAP), 124,30 mmol ET/g muestra (ABTS) y 68.01 mmol ET/g muestra (DPPH) respectivamente. Por otro lado, en la determinación de la actividad antiinflamatoria el aislado proteico 10.0–6.0 presentó 93,55 % de protección, resultado que permite establecer que las proteínas extraídas de grillo tienen un porcentaje alto de protección frente al proceso de inflamación.
- ❖ Las proteínas de grillo (*Gryllus assimilis*) presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria lo que indica que se pueden emplear como ingrediente funcional en la elaboración de productos o a su vez podrían ser comercializados como producto terminado.

5.2 Recomendaciones

- ❖ Se recomienda realizar un perfil de proteínas de harina de grillo mediante la aplicación de técnicas de separación molecular como HPLC y UPLC-MSD. Además, estudiar los aminoácidos que conforman estas proteínas.
- ❖ Para sustentar los resultados obtenidos de la actividad antioxidante y antiinflamatoria en aislados proteicos de harina de grillo se recomienda aplicar modelos *in vivo*.
- ❖ Se recomienda ampliar la investigación con el estudio de actividad antioxidante y antiinflamatoria en los hidrolizados obtenidos a partir de los aislados proteicos de harina de grillo, con la finalidad de identificar cuál de los dos ingredientes funcionales sería el más adecuado para incorporarlo en un alimento, mejorando su valor nutricional y funcional.

- ❖ Si los grillos en estudio no son provenientes de granjas, se recomienda realizar un estudio de citotoxicidad de las proteínas debido a que su alimentación no controlada podría ejercer compuestos tóxicos en su organismo.

- ❖ Debido a los diferentes análisis realizados en la presente investigación, se recomienda considerar el tipo de uso que se requiere dar a los aislados proteicos de grillo, por ejemplo: si se desea elaborar un producto de panificación se debe considerar los resultados obtenidos de las propiedades funcionales de las proteínas de grillo. Por otra parte, si se requiere fabricar un producto con beneficios farmacéuticos, se debería tomar en cuenta los resultados obtenidos de las actividades biológicas, como antioxidante y antiinflamatoria aplicada en este estudio, con el objetivo de obtener el principio activo de la muestra.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akpossan, R., Digbeu, Y., Koffi, M., Kouadio, J., Dué, E., & Kouamé, P. (2015). Protein Fractions and Functional Properties of Dried *Imbrasia oyemensis* Larvae Full-Fat and Defatted Flours. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 5(2), 116-126
- Alarcón, I. (21 de Agosto de 2020). La investigación sobre los saltamontes crece en el país. *El comercio*. <https://www.elcomercio.com/tendencias/investigacion-saltamontes-ecuador-biologia-animales.html>
- Animales. (14 de enero de 2018). *Grillo*. <https://www.animales.website/grillo/>
- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis, 19th Edition*. Association of official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.
- AOAC. & Horwitz, W. (2005). *Official methods of Analysis of AOAC International*. Maryland, USA: A. International, Ed.
- Apolo-Arévalo, L. & Iannacone, J. (1993). Crianza del grillo (*Acheta domesticus*) como fuente alternativa de proteínas para el consumo humano. *Scientia ISSN XVII*, 161-173.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Editorial Pearson Educación .
- Badui., S. (2012). *Química de los alimentos*. Editorial Pearson Educacion.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bingcan, C., & Minwei, X. (2018). *Natural Antioxidants in foods*. Elsevier Inc.
- Bohinski, R. (1976). *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano S.A.

- Bouhlali, E., Sellam, K., Bammou, M., Alem, C., & Filali-Zehzouti, Y. (2016). In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 156-162.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*, 18(1), 25-30.
- Carrillo, W., Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, A., Morales, D., Pinto, A., Samaniego, I. (2019). Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(8), 1-14.
- Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 13(2), 109-122.
- Carrillo, W., Barrio, D., Welbaum, J., Carpio, C., Vilcacundo, R., Morales, D., & Ortiz, J. (2018). *Antimicrobial and antioxidant peptides obtained from food proteins*. Ch. 2. In "Bioactive Peptides: Types, Roles and Research". K. Powell (Ed.), p. 37. Novinka Science Publishers, Inc., New York, NY. New York: Nova Science Publisher.
- Carvajal, V. (2016). *¡Bichos mmm, qué rico!*. <https://biologia.epn.edu.ec/index.php/bichos-querico>
- Defoliart, G. (2002). *The Human Use of Insects as a Food Resource: A Bibliographic Account in Progress*. <https://insectsasfood.russell.wisc.edu/the-human-use-of-insects-as-a-food-resource/>
- Delgado, R., & Camilema, C. (2010). *Validación del método de macrodilución para la actividad antimicrobiana en extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva)*

olorosa). Universidad de Cuenca.
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2421>

- Dossey, A., Morales, J., & Guadalupe, M. (2016). *Insects as sustainable food ingredients*. Elsevier.
- Dua, A., Adamczak, J., Chelmińska, P., Juskiewicz, J., & Kowalczewski, P. (2019). Quality and Nutritional/Textural Properties of Durum Wheat Pasta Enriched with Cricket Powder. *Foods*, 46.
- Duda, A., Adamczak, J., Chelmiriska, P., Juskiewicz, P., & Kowalczewski, P. (2019). Quality and nutritional/textural properties of durum wheat pasta enriched with cricket powder. *Foods*, 8(2), 1-10.
- Durst, P., Johnson, D., Leslie, R., & Shono, K. (2010). Forest insects as food: humans bite back. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1-73.
- Ekpo, K. (2011). Nutritional and biochemical evaluation of the protein quality of four popular insects consumed in Southern Nigeria. *Arch. Appl. Sci. Res*, 3(5), 428-444.
- Elhassan, M., Wendin, K., Olsson, V., & Langton, M. (2019). Quality Aspects of Insects as Food nutritional, Sensory, and Related Concepts. *Foods*, 8(3), 1-14.
- EMD Millipore Corporation. (2019). *Proteínas (según el método de Biuret)*. <file:///C:/Users/BIOLOG%20MOLECULAR/Downloads/110307s.pdf>
- FAO. (2013). *La contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente*. <https://www.fao.org/3/i3264s/i3264s.pdf>
- FAO. (2020). *Transformación de los sistemas alimentarios para que promuevan dietas asequibles y saludables. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo*. <https://www.fao.org/3/ca9692es/ca9692es.pdf>

- Felton, G., & Summers, C. (1995). Antioxidants systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29, 187-197.
- Florence, O., Helmina, A., Ali, J., Abubakar, S., & Evans, E. (2018). Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. *Food Science and Human Wellness*, 7(2), 175–183.
- Gavilanes, P. (22 de Junio de 2016). La malnutrición y el sobrepeso también amenazan al Ecuador. *El comercio*.
<https://www.elcomercio.com/tendencias/malnutricion-sobrepeso-salud-ecuador-sociedad.html>
- Hall, F., Jones, O., O’Haire, M., & Liceaga, A. (2016). Functional properties of tropical banded cricket (*Grylloides sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 1(224), 4414-422.
- Hirsch, A., Cho, Y., Brad, Y., & Jones, O. (2019). Contributions of protein and milled chitin extracted from domestic cricket powder to emulsion stabilization. *Journal Pre-proof*, 28(1), 17-23.
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han Jay, & Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT- Food Science and Technology*, 57(2), 461-469.
- Jemal, K., Sandeep, B., & Pola, S. (2017). IN VITRO ANTI INFLAMMATORY AND ANTI MICROBIAL PROPERTIES OF ALLOPHYLUS SERRATUS LEAF EXTRACTS. *International Journal of Advanced Research* , 5(3), 71-80.
- Kim, H. W., Setyabrata, D., Lee, Y., Jones, O. G., & Kim, Y. H. (2017). Effect of house cricket (*Acheta domesticus*) flour addition on physicochemical and textural properties of meat emulsion under various formulations . *J. Food*, 82(12), 2787-2793.

- Kumah, B., He, R., Dabbour, M., Xiang, J., Akomeah, A., & Ma, H. (2019). Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 58, 1-8.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the heat bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Linden, G., & Loriet, D. (1994). *Bioquímica Agroindustrial*.
- Liu, P., Piao, X., Tracker, P., Zeng, Z., Li, P., Wang, D., & Kim, S. (2010). Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K881 . *Journal of Animal Science*, 88(12), 3871-3879.
- Machado, C., & Silveira, R. (2019). Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56, 1-7.
- Martínez, D., Hernández , B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez, J. (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion . *Proteomics in Foods: Principles and Applications, Food Microbiology and Food Safety*, 21-50.
- Martínez, E., & Añón, M. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530.
- Martínez, O., & Martínez , E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1-14.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamics system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, 15(145), 1039-1045.

- Menor, C. (Febrero de 2019). *SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Chemevol. <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>
- Minekus, M., Almiger, M., Alvito, P., Ballance, T., Bohn, C., Bourlieu, F., Boutrou, M. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 6, 1113-1124.
- Montowska, M., Kowalczewski, P., Rybicka, L., Fornal, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry*, 15(289),130-138.
- National Geographic. (2016). *Animales. Insectos*. <https://www.nationalgeographic.com.es/animales/insectos>
- Nielsen, S. (2002). *Introduction to Chemical Analysis of Food*. CBS Publishers. New Delhi 110 032.
- Nollet, L. (1996). *Handbook of Food Analysis*. Dekker.
- Osimani, A., Milanovic, V., Cardinali, F., Roncolini, A., Garofalo , C., Clementi, F., Aquilanti, L. (2018). Bread enriched with cricket powder (*Acheta domesticus*): A technological, microbiological and nutritional evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 150-163.
- Pazmiño, A., Vasquez, G., & Carrillo, W. (2018). PIGEON PEA PROTEIN CONCENTRATE (CAJANUS CAJAN) SEEDS GROWN IN ECUADOR. *Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research*, 11(6), 430-435.
- Pulido, V., González, C., Tapia, Y., & Celis, X. (2020). Insects: Resources from the Past that Could Be a Nutrition Solution for The Future. *Avances en investigación agropecuaria*, 24(2), 81-100.
- Ramírez, L. (2015). *Comparación de los métodos Kjeldahl y Dumas para análisis de proteína cruda en materias primas y productos terminados en una planta de*

alimentos balanceados. [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador] .
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9985>

Rivera, O. (Agosto de 2020). La pandemia amenaza con aumentar la desnutrición infantil. *Primicias*. <https://www.primicias.ec/noticias/sociedad/ninos-riesgo-desnutricion-cronica-pandemia/>

Rutherford, K., & Moughan, P. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal AOAC*, 88(3), 955-966.

Sancho, D., Fernández, L., & Alvarez, M. (2015). Insectos y alimentación. Larvas de *Rhynchophorus palmarum* L, un alimento de los pobladores de la Amazonía Ecuatoriana. *Entomotropica*, 30(14), 135-149.

Shinde, P., & Jo Chae, B. (4 de Agosto de 2018). *Proteínas y péptidos antimicrobianos como alternativa a los antibióticos*.
https://www.3tres3.com/articulos/proteinas-y-peptidos-antimicrobianos-alternativa-a-los-antibioticos_2361/

Soares, R., Ribeiro, T., Ferraz, V., & Moreira, E. (2018). NUTRITIONAL COMPOSITION OF INSECTS *GRYLLUS ASSIMILIS* AND *ZOPHOBAS MORIO*: POTENTIAL FOODS HARVESTED IN BRAZIL. *Food composition and analysis*, 1-24.

Stanley, D. (2006). Prostaglandins and other eicosanoids in insects: Biological Significance. *Annu. Rev. Entomol*, 51, 25-44.

Stone, A., Tanaka, T., & Nickerson, M. (2019). Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3355-3363.

Stull, V., Finer, E., Bergmans, R., Febvre, H., Longhurst, C., Manter, D., . . . Weir, T. (2018). Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Nature*, 1-13.

- Sweeney, R., & Rexroad, P. (1987). Nitrogen Determinator. *J Assoc Off Anal Chem*, 70(6), 1028-1030.
- Telégrafo, E. (Enero de 2020). *Los grillos, una opción alimentaria para la humanidad*. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/guayaquil/1/los-grillos-opcion-alimentaria-para-la-humanidad>
- United Nations. (2017). World population prospects: The 2017 revision, key findings and advance tables. 248.
- Universidad de Quilmes. (2010). *qPROTEIN (BCA)*. <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>
- Vera, H. (2020). *Caracterización de la composición nutricional de la harina de grillo común (Gryllus assimilis)*. [Tesis de pregrado. Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/21797>
- Vilcacundo, R., Miralles, B., Carrillo, W., & Hernández-Ledesma, B. (2018). In vitro chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 105, 403-411.
- Viñeta, J. (Octubre de 2017). *Diseño y acondicionamiento de una nave para la producción de insectos como piensos alimentarios*. Universitat Jaume I. http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/174558/Vi%C3%B1eta%20Valdelvira_TFG%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Y, L., Lakemond, C., Sagis, L., Eisner-Schadler, V., Huis, A., & Boekel, M. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, 141(4), 8- 3341.
- Zielinska, E., Baraniak, B., Karas, M., Rybczynska, K., & Jakubczyk, A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, 1-7.

Zielńska, E., Karás, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT-Food Science and Technology*, 91, 168-1674.

Zielńska, E., Karás, M., & Jakubczyk, A. (2016). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and Technology*, 7.

CAPÍTULO VII. ANEXOS

Anexo A. Fotografías de la parte experimental realizada durante el estudio



Fotografía 1. Grillos deshidratados obtenidos de la granja SARGRILLO.



Fotografía 2. Proteína liofilizada de harina de grillo (*Gryllus assimilis*).



Fotografía 3. Cuantificación del contenido de proteína en harina de grillo por el método Dumas.



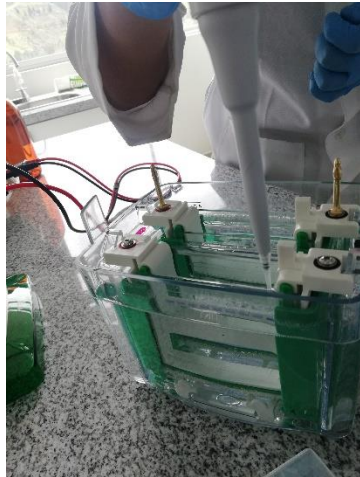
Fotografía 4. Determinación del contenido de grasa en harina de grillo. INEN 523.



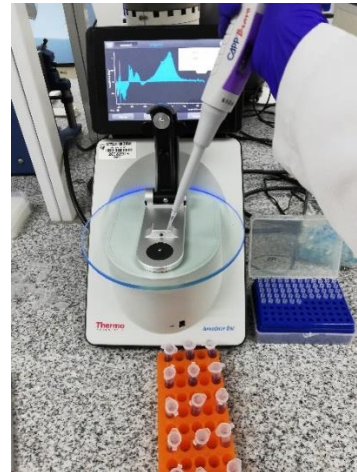
Fotografía 5. Cuantificación del contenido de proteína por métodos colorimétricos. Método Bradford.



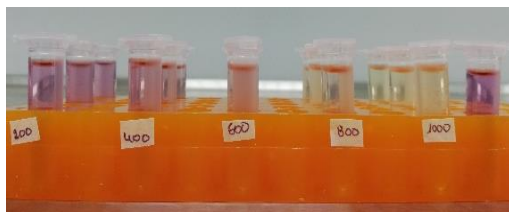
Fotografía 6. Evaluación de las propiedades funcionales de las proteínas. Capacidad de absorción de aceite.



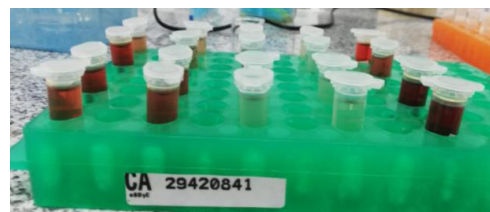
Fotografía 7. Caracterización de la proteína de la harina de grillo por la Técnica SDS-PAGE.



Fotografía 8. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*. Equipo espectrofotómetro UV/Vis-NANODROP.



Fotografía 9. Preparación de estándares para elaboración de la curva de calibración. Estándar utilizado Trolox- Método DPPH.



Fotografía 10. Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de harina de grillo.

Anexo B. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales del análisis proximal y rendimiento de proteína de la harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

*Tabla 12. Resultados obtenidos del ensayo proximal realizado en la harina de grillo (*Gryllus assimilis*).*

| Ensayo | R1 | R2 | R3 | \bar{x} | σ^2 |
|----------------------------|-------|--------|--------|-----------|------------|
| Proteína | 66,44 | 66,938 | 62,813 | 65,40 | 2,25 |
| Grasa | 18,78 | 18,98 | 22,23 | 20,00 | 1,94 |
| Fibra | 5,08 | 4,94 | 5,02 | 5,01 | 0,07 |
| Cenizas | 4,73 | 5,03 | 5,05 | 4,94 | 0,18 |
| Humedad | 3,56 | 3,48 | 3,47 | 3,50 | 0,05 |
| Carbohidratos (Cálculo) | 1,41 | 0,63 | 1,42 | 1,15 | 0,45 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

*Tabla 13. Resultados obtenidos del % de rendimiento de la proteína extraída de harina de grillo (*Gryllus assimilis*).*

| Muestras | Peso inicial (g) | Peso Final (g) | Rendimiento (%) | % Rendimiento por cada 20 g muestra |
|-----------------|------------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|
| 10.0-3.0 | 5,0014 | 0,4243 | 8,48 | 33,92 |
| | 5,0038 | 0,4251 | 8,50 | 33,96 |
| | 5,0069 | 0,3922 | 7,83 | 31,29 |
| 10.0-4.0 | 5,0013 | 0,4832 | 9,66 | 38,64 |
| | 5,0015 | 0,4575 | 9,15 | 36,58 |
| | 5,0050 | 0,4174 | 8,34 | 33,33 |
| 10.0-5.0 | 5,0070 | 0,4125 | 8,24 | 32,91 |
| | 5,0004 | 0,3244 | 6,49 | 25,95 |
| | 5,0001 | 0,4750 | 9,50 | 38,00 |
| 10.0-6.0 | 5,0000 | 0,2774 | 5,55 | 22,19 |
| | 5,0006 | 0,1678 | 3,36 | 13,42 |
| | 5,0024 | 0,2703 | 5,40 | 21,60 |
| 12.0-3.0 | 5,0010 | 0,7911 | 15,82 | 63,26 |
| | 5,0060 | 0,8573 | 17,13 | 68,42 |
| | 5,0015 | 0,8689 | 17,37 | 69,47 |
| 12.0-4.0 | 5,0007 | 0,8936 | 17,87 | 71,47 |
| | 5,0015 | 0,8420 | 16,83 | 67,32 |
| | 5,0023 | 0,9943 | 19,88 | 79,47 |
| 12.0-5.0 | 5,0013 | 0,8726 | 17,45 | 69,77 |
| | 5,0000 | 0,8140 | 16,28 | 65,12 |
| | 5,0073 | 0,8577 | 17,13 | 68,42 |
| 12.0-6.0 | 5,0012 | 0,2153 | 4,30 | 17,22 |
| | 5,0050 | 0,1113 | 2,22 | 8,89 |
| | 5,0010 | 0,1074 | 2,15 | 8,59 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 14. Resumen Estadístico para % Rendimiento de proteína por cada 20 g de muestra.

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 33,0567 | 1,53011 | 4,62875% | 31,29 | 33,96 |
| 10.0-4.0 | 3 | 36,1833 | 2,67713 | 7,39888% | 33,33 | 38,64 |
| 10.0-5.0 | 3 | 32,2867 | 6,04913 | 18,7357% | 25,95 | 38,0 |
| 10.0-6.0 | 3 | 19,07 | 4,90193 | 25,7049% | 13,42 | 22,19 |
| 12.0-3.0 | 3 | 67,05 | 3,32396 | 4,95743% | 63,26 | 69,47 |
| 12.0-4.0 | 3 | 72,7533 | 6,17583 | 8,48872% | 67,32 | 79,47 |
| 12.0-5.0 | 3 | 67,77 | 2,39217 | 3,52984% | 65,12 | 69,77 |
| 12.0-6.0 | 3 | 11,5667 | 4,89823 | 42,3478% | 8,59 | 17,22 |
| Total | 24 | 42,4671 | 22,8276 | 53,7537% | 8,59 | 79,47 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 15. ANOVA para % Rendimiento por Tratamientos

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|--------------|---------------|
| Entre grupos | 11687,3 | 7 | 1669,61 | 89,62 | 0,0000 |
| Intra grupos | 298,068 | 16 | 18,6292 | | |
| Total (Corr.) | 11985,3 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 16. Prueba de Múltiple Rangos Tukey para % Rendimiento por Tratamientos

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 12.0-6.0 | 3 | 11,5667 | x |
| 10.0-6.0 | 3 | 19,07 | x |
| 10.0-5.0 | 3 | 32,2867 | x |
| 10.0-3.0 | 3 | 33,0567 | x |
| 10.0-4.0 | 3 | 36,1833 | x |
| 12.0-3.0 | 3 | 67,05 | x |
| 12.0-5.0 | 3 | 67,77 | x |
| 12.0-4.0 | 3 | 72,7533 | x |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Anexo C. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la cuantificación de proteína de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*) por diferentes métodos.

Tabla 17. Datos obtenidos del % de nitrógeno y % de proteína por el método Dumas de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Muestras | Réplicas | N (%) | % P= F * %N |
|-----------------|-----------------|--------------|--------------------|
| 10.0-3.0 | 1 | 11,92 | 74,50 |
| | 2 | 12,07 | 75,44 |
| | 3 | 11,83 | 73,94 |
| 10.0-4.0 | 1 | 12,55 | 78,44 |
| | 2 | 12,39 | 77,44 |
| | 3 | 12,22 | 76,38 |
| 10.0-5.0 | 1 | 12,46 | 77,88 |
| | 2 | 12,26 | 76,63 |
| | 3 | 12,30 | 76,88 |
| 10.0-6.0 | 1 | 11,77 | 73,56 |
| | 2 | 11,75 | 73,44 |
| | 3 | 11,70 | 73,13 |
| 12.0-3.0 | 1 | 12,12 | 75,75 |
| | 2 | 12,18 | 76,13 |
| | 3 | 12,16 | 76,00 |
| 12.0-4.0 | 1 | 12,79 | 79,94 |
| | 2 | 12,74 | 79,63 |
| | 3 | 12,40 | 77,50 |
| 12.0-5.0 | 1 | 12,81 | 80,06 |
| | 2 | 12,64 | 79,00 |
| | 3 | 12,67 | 79,19 |
| 12.0-6.0 | 1 | 11,28 | 70,50 |
| | 2 | 11,42 | 71,38 |
| | 3 | 11,37 | 71,06 |

*F (factor de conversión) = 6,25

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 18. Resumen Estadístico para el % de Proteína obtenido por el método Dumas.

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|-------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 74,6267 | 0,75798 | 1,0157% | 73,94 | 75,44 |
| 10.0-4.0 | 3 | 77,42 | 1,03015 | 1,33059% | 76,38 | 78,44 |
| 10.0-5.0 | 3 | 77,13 | 0,661438 | 0,857562% | 76,63 | 77,88 |
| 10.0-6.0 | 3 | 73,3767 | 0,221886 | 0,302393% | 73,13 | 73,56 |
| 12.0-3.0 | 3 | 75,96 | 0,193132 | 0,254255% | 75,75 | 76,13 |
| 12.0-4.0 | 3 | 79,0233 | 1,32832 | 1,68092% | 77,5 | 79,94 |
| 12.0-5.0 | 3 | 79,4167 | 0,565184 | 0,71167% | 79,0 | 80,06 |
| 12.0-6.0 | 3 | 70,98 | 0,445421 | 0,627531% | 70,5 | 71,38 |
| Total | 24 | 75,9917 | 2,82161 | 3,71306% | 70,5 | 80,06 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 19. ANOVA para el % de Proteína por Tratamientos – Método Dumas.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|--------------|---------------|
| Entre grupos | 174,23 | 7 | 24,8901 | 44,83 | 0,0000 |
| Intra grupos | 8,88407 | 16 | 0,555254 | | |
| Total (Corr.) | 183,115 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 20. Prueba de Múltiple Rangos Tukey para % de Proteína por Tratamientos- Método Dumas.

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 12.0-6.0 | 3 | 70,98 | X |
| 10.0-6.0 | 3 | 73,3767 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 74,6267 | XX |
| 12.0-3.0 | 3 | 75,96 | XX |
| 10.0-5.0 | 3 | 77,13 | XX |
| 10.0-4.0 | 3 | 77,42 | XXX |
| 12.0-4.0 | 3 | 79,0233 | XX |
| 12.0-5.0 | 3 | 79,4167 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021).

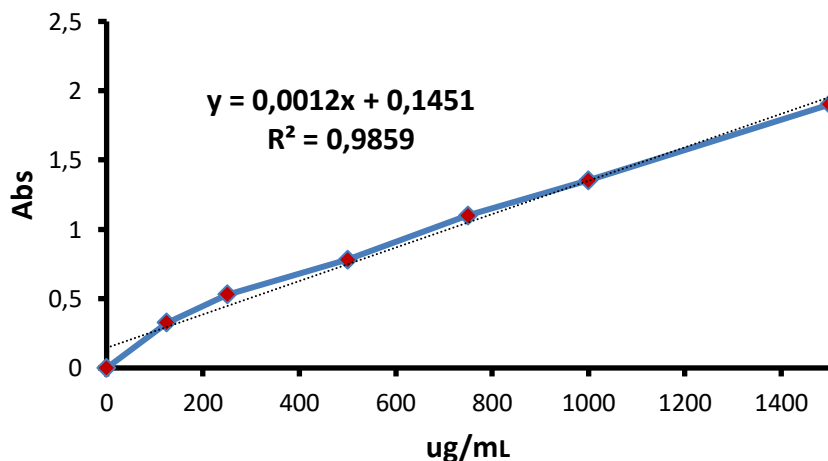


Gráfico 7. Curva de calibrado de BSA (0 ug/mL a 1500 ug/mL) para cuantificación del contenido de proteína de aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo por el método Bradford.

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 21. Datos obtenidos del análisis de proteína por el método Bradford de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados proteicos | Réplicas | Abs $\lambda=595$ nm | Abs NETA $\lambda=595$ nm | ug/mL | Peso muestra (g) | Vol. Diluido (mL) | FD | ug proteína/g muestra | mg proteína/g muestra |
|--------------------|----------|----------------------|---------------------------|--------|------------------|-------------------|----|-----------------------|-----------------------|
| 10.0-3.0 | 1 | 1,70 | 1,24 | 907,96 | 0,01 | 1 | | 90796,14 | 90,80 |
| | 2 | 1,71 | 1,25 | 916,25 | 0,01 | 1 | | 91625,41 | 91,63 |
| | 3 | 1,70 | 1,24 | 907,96 | 0,01 | 1 | | 90796,14 | 90,80 |
| 10.0-4.0 | 1 | 0,94 | 0,48 | 277,72 | 0,01 | 1 | 3 | 83315,41 | 83,32 |
| | 2 | 0,94 | 0,48 | 277,72 | 0,01 | 1 | 3 | 83315,41 | 83,32 |
| | 3 | 0,94 | 0,48 | 277,72 | 0,01 | 1 | 3 | 83315,41 | 83,32 |
| 10.0-5.0 | 1 | 1,56 | 1,10 | 791,86 | 0,01 | 1 | | 79186,39 | 79,19 |
| | 2 | 1,58 | 1,12 | 808,45 | 0,01 | 1 | | 80844,93 | 80,84 |
| | 3 | 1,57 | 1,11 | 800,16 | 0,01 | 1 | | 80015,66 | 80,02 |
| 10.0-6.0 | 1 | 1,81 | 1,35 | 999,18 | 0,01 | 1 | | 99918,08 | 99,92 |
| | 2 | 1,79 | 1,33 | 982,60 | 0,01 | 1 | | 98259,55 | 98,26 |
| | 3 | 1,81 | 1,35 | 999,18 | 0,01 | 1 | | 99918,08 | 99,92 |
| 12.0-3.0 | 1 | 1,49 | 1,03 | 733,82 | 0,01 | 1 | | 73381,52 | 73,38 |
| | 2 | 1,46 | 1,00 | 708,94 | 0,01 | 1 | | 70893,72 | 70,89 |
| | 3 | 1,49 | 1,03 | 733,82 | 0,01 | 1 | | 73381,52 | 73,38 |
| 12.0-4.0 | 1 | 0,91 | 0,45 | 252,84 | 0,01 | 1 | 3 | 75852,00 | 75,85 |
| | 2 | 0,93 | 0,47 | 269,43 | 0,01 | 1 | 3 | 80827,61 | 80,83 |
| | 3 | 0,95 | 0,49 | 286,01 | 0,01 | 1 | 3 | 85803,21 | 85,80 |
| 12.0-5.0 | 1 | 1,01 | 0,55 | 335,77 | 0,01 | 1 | | 33576,68 | 33,58 |
| | 2 | 1,04 | 0,58 | 360,64 | 0,01 | 1 | | 36064,48 | 36,06 |
| | 3 | 1,02 | 0,56 | 344,06 | 0,01 | 1 | | 34405,94 | 34,41 |
| 12.0-6.0 | 1 | 1,70 | 1,24 | 907,96 | 0,01 | 1 | | 90796,14 | 90,80 |
| | 2 | 1,70 | 1,24 | 907,96 | 0,01 | 1 | | 90796,14 | 90,80 |
| | 3 | 1,72 | 1,26 | 924,55 | 0,01 | 1 | | 92454,68 | 92,45 |
| Harina | 1 | 1,48 | 1,02 | 725,52 | 0,01 | 1 | | 72552,25 | 72,55 |
| | 2 | 1,53 | 1,07 | 766,99 | 0,01 | 1 | | 76698,59 | 76,70 |
| | 3 | 1,48 | 1,02 | 725,52 | 0,01 | 1 | | 72552,25 | 72,55 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 22. Resumen estadístico de la cuantificación de proteína (mg Proteína/ g muestra) por el método Bradford de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 91,0767 | 0,479201 | 0,526151% | 90,8 | 91,63 |
| 10.0-4.0 | 3 | 83,32 | 0 | 0% | 83,32 | 83,32 |
| 10.0-5.0 | 3 | 80,0167 | 0,825005 | 1,03104% | 79,19 | 80,84 |
| 10.0-6.0 | 3 | 99,3667 | 0,958401 | 0,96451% | 98,26 | 99,92 |
| 12.0-3.0 | 3 | 72,55 | 1,4376 | 1,98153% | 70,89 | 73,38 |
| 12.0-4.0 | 3 | 80,8267 | 4,975 | 6,15515% | 75,85 | 85,8 |
| 12.0-5.0 | 3 | 34,6833 | 1,26239 | 3,63977% | 33,58 | 36,06 |
| 12.0-6.0 | 3 | 91,35 | 0,952628 | 1,04283% | 90,8 | 92,45 |
| Total | 24 | 79,1487 | 18,9818 | 23,9824% | 33,58 | 99,92 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 23. ANOVA de la cuantificación de proteína (mg Proteína/ g muestra) por Tratamientos- Método Bradford.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------------|---------------|
| Entre grupos | 8224,78 | 7 | 1174,97 | 301,78 | 0,0000 |
| Intra grupos | 62,2945 | 16 | 3,89341 | | |
| Total (Corr.) | 8287,08 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 24. Prueba de Múltiple Rangos Tukey para mg Proteína/ g muestra por Tratamientos- Método Bradford.

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 12.0-5.0 | 3 | 34,6833 | x |
| 12.0-3.0 | 3 | 72,55 | x |
| 10.0-5.0 | 3 | 80,0167 | x |
| 12.0-4.0 | 3 | 80,8267 | x |
| 10.0-4.0 | 3 | 83,32 | x |
| 10.0-3.0 | 3 | 91,0767 | x |
| 12.0-6.0 | 3 | 91,35 | x |
| 10.0-6.0 | 3 | 99,3667 | x |

Elaborado por: Quinteros (2021).

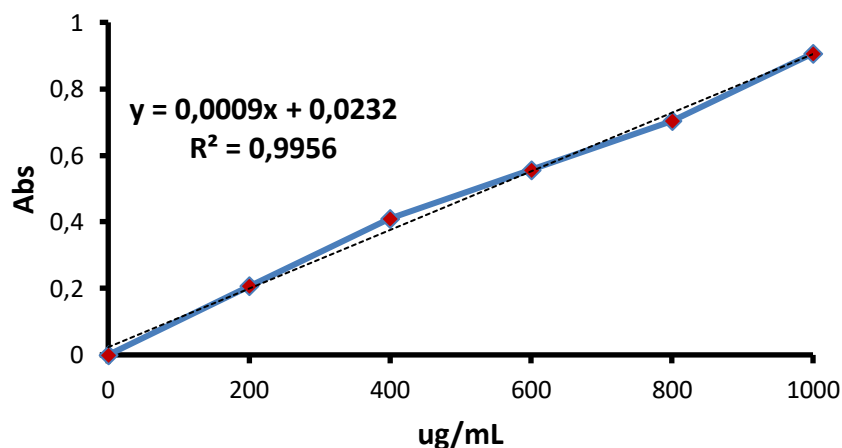


Gráfico 8. Curva de calibrado de BSA (0 ug/mL a 1500 ug/mL) para cuantificación del contenido de proteína de aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo por el método BCA

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 25. Datos obtenidos del análisis de proteína por el método BCA de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados Proteicos | Abs $\lambda=562\text{nm}$ | Abs $\lambda=562\text{nm}$ (NETA) | ug/mL | Peso muestras (g) | Vol diluido (mL) | FD | ug proteína/g muestra | mg proteína/ g muestra |
|--------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|----|--------------------------|---------------------------|
| 10.0-3.0 | 1,06 | 0,94 | 1040,16 | 0,01 | 1 | 5 | 520079,24 | 520,08 |
| | 1,06 | 0,94 | 1040,16 | 0,01 | 1 | 5 | 520079,24 | 520,08 |
| | 1,07 | 0,95 | 1051,50 | 0,01 | 1 | 5 | 525751,85 | 525,75 |
| 10.0-4.0 | 0,49 | 0,37 | 393,48 | 0,01 | 1 | 5 | 196740,50 | 196,74 |
| | 0,51 | 0,39 | 416,17 | 0,01 | 1 | 5 | 208085,72 | 208,09 |
| | 0,50 | 0,38 | 404,83 | 0,01 | 1 | 5 | 202413,11 | 202,41 |
| 10.0-5.0 | 0,41 | 0,29 | 302,72 | 0,01 | 1 | 5 | 151359,63 | 151,36 |
| | 0,41 | 0,29 | 302,72 | 0,01 | 1 | 5 | 151359,63 | 151,36 |
| | 0,40 | 0,28 | 291,37 | 0,01 | 1 | 5 | 145687,02 | 145,69 |
| 10.0-6.0 | 0,54 | 0,42 | 450,21 | 0,01 | 1 | 5 | 225103,55 | 225,10 |
| | 0,55 | 0,43 | 461,55 | 0,01 | 1 | 5 | 230776,16 | 230,78 |
| | 0,53 | 0,41 | 438,86 | 0,01 | 1 | 5 | 219430,94 | 219,43 |
| 12.0-3.0 | 0,61 | 0,49 | 529,62 | 0,01 | 1 | 5 | 264811,81 | 264,81 |
| | 0,61 | 0,49 | 529,62 | 0,01 | 1 | 5 | 264811,81 | 264,81 |
| | 0,61 | 0,49 | 529,62 | 0,01 | 1 | 5 | 264811,81 | 264,81 |
| 12.0-4.0 | 0,73 | 0,61 | 665,77 | 0,01 | 1 | 5 | 332883,13 | 332,88 |
| | 0,72 | 0,60 | 654,42 | 0,01 | 1 | 5 | 327210,52 | 327,21 |
| | 0,75 | 0,63 | 688,46 | 0,01 | 1 | 5 | 344228,35 | 344,23 |
| 12.0-5.0 | 0,34 | 0,22 | 223,30 | 0,01 | 1 | 5 | 111651,36 | 111,65 |
| | 0,32 | 0,20 | 200,61 | 0,01 | 1 | 5 | 100306,14 | 100,31 |
| | 0,33 | 0,21 | 211,96 | 0,01 | 1 | 5 | 105978,75 | 105,98 |
| 12.0-6.0 | 0,78 | 0,66 | 722,49 | 0,01 | 1 | 5 | 361246,17 | 361,25 |
| | 0,81 | 0,69 | 756,53 | 0,01 | 1 | 5 | 378264,00 | 378,26 |
| | 0,79 | 0,67 | 733,84 | 0,01 | 1 | 5 | 366918,78 | 366,92 |
| Harina | 0,31 | 0,19 | 189,27 | 0,01 | 1 | 5 | 94633,53 | 94,63 |
| | 0,33 | 0,21 | 211,96 | 0,01 | 1 | 5 | 105978,75 | 105,98 |
| | 0,32 | 0,20 | 200,61 | 0,01 | 1 | 5 | 100306,14 | 100,31 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 26. Resumen estadístico de la cuantificación de proteína (mg Proteína/ g muestra) por el método BCA de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 521,97 | 3,27358 | 0,627158% | 520,08 | 525,75 |
| 10.0-4.0 | 3 | 202,413 | 5,675 | 2,80367% | 196,74 | 208,09 |
| 10.0-5.0 | 3 | 149,47 | 3,27358 | 2,19012% | 145,69 | 151,36 |
| 10.0-6.0 | 3 | 225,103 | 5,675 | 2,52106% | 219,43 | 230,78 |
| 12.0-3.0 | 3 | 264,81 | 0 | 0% | 264,81 | 264,81 |
| 12.0-4.0 | 3 | 334,773 | 8,66652 | 2,58877% | 327,21 | 344,23 |
| 12.0-5.0 | 3 | 105,98 | 5,67 | 5,35007% | 100,31 | 111,65 |
| 12.0-6.0 | 3 | 368,81 | 8,66107 | 2,34838% | 361,25 | 378,26 |
| Total | 24 | 271,666 | 128,018 | 47,1231% | 100,31 | 525,75 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 27. Tabla ANOVA para mg Proteína/ g muestra por Tratamientos – Método BCA.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|----------------|---------------|
| Entre grupos | 376399, | 7 | 53771,3 | 1604,42 | 0,0000 |
| Intra grupos | 536,231 | 16 | 33,5144 | | |
| Total (Corr.) | 376935, | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 28. Prueba de Múltiple Rangos Tukey para mg Proteína/ g muestra por Tratamientos – Método BCA.

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 12.0-5.0 | 3 | 105,98 | X |
| 10.0-5.0 | 3 | 149,47 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 202,413 | X |
| 10.0-6.0 | 3 | 225,103 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 264,81 | X |
| 12.0-4.0 | 3 | 334,773 | X |
| 12.0-6.0 | 3 | 368,81 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 521,97 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Anexo D. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la evaluación de las propiedades funcionales de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

Tabla 29. Datos y resultados obtenidos del % de capacidad de absorción de agua de lo aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados proteicos | Peso tubo vacío (g) | Peso muestra (g) | Peso tubo + muestra (g) | Peso muestra + agua (g) | Peso agua retenida (g) | Peso agua retenida (g)/ g muestra | % CAAGUA |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|-----------------|
| 10.0-3.0 | 0,8420 | 0,0500 | 1,0422 | 0,2002 | 0,1502 | 3,0040 | 30,04 |
| | 0,8565 | 0,0530 | 1,0597 | 0,2032 | 0,1502 | 2,8340 | 30,04 |
| | 0,8600 | 0,0510 | 1,0570 | 0,1970 | 0,1460 | 2,8627 | 29,20 |
| 10.0-4.0 | 0,8430 | 0,0490 | 1,0215 | 0,1785 | 0,1295 | 2,6429 | 25,90 |
| | 0,8724 | 0,0504 | 1,0431 | 0,1707 | 0,1203 | 2,3869 | 24,06 |
| | 0,8690 | 0,0501 | 1,0460 | 0,1770 | 0,1269 | 2,5329 | 25,38 |
| 10.0-5.0 | 0,8244 | 0,0501 | 0,9930 | 0,1686 | 0,1185 | 2,3653 | 23,70 |
| | 0,8720 | 0,0498 | 1,0376 | 0,1656 | 0,1158 | 2,3253 | 23,16 |
| | 0,8300 | 0,0490 | 1,0240 | 0,1940 | 0,1450 | 2,9592 | 29,00 |
| 10.0-6.0 | 0,8829 | 0,0501 | 1,0598 | 0,1769 | 0,1268 | 2,5309 | 25,36 |
| | 0,8375 | 0,0500 | 0,9957 | 0,1582 | 0,1082 | 2,1640 | 21,64 |
| | 0,8810 | 0,0500 | 1,0470 | 0,1660 | 0,1160 | 2,3200 | 23,20 |
| 12.0-3.0 | 0,8702 | 0,0498 | 1,1318 | 0,2616 | 0,2118 | 4,2530 | 42,36 |
| | 0,8827 | 0,0503 | 1,1355 | 0,2528 | 0,2025 | 4,0258 | 40,50 |
| | 0,8400 | 0,0500 | 1,0945 | 0,2545 | 0,2045 | 4,0900 | 40,90 |
| 12.0-4.0 | 0,8349 | 0,0499 | 1,0317 | 0,1968 | 0,1469 | 2,9439 | 29,38 |
| | 0,8410 | 0,0499 | 1,0420 | 0,2010 | 0,1511 | 3,0281 | 30,22 |
| | 0,8355 | 0,0500 | 1,0213 | 0,1858 | 0,1358 | 2,7160 | 27,16 |
| 12.0-5.0 | 0,8690 | 0,0507 | 1,0457 | 0,1767 | 0,1260 | 2,4852 | 25,20 |
| | 0,8673 | 0,0505 | 1,0527 | 0,1854 | 0,1349 | 2,6713 | 26,98 |
| | 0,8670 | 0,0505 | 1,0793 | 0,2123 | 0,1618 | 3,2040 | 32,36 |
| 12.0-6.0 | 0,8695 | 0,0501 | 1,0594 | 0,1899 | 0,1398 | 2,7904 | 27,96 |
| | 0,8601 | 0,0500 | 1,0482 | 0,1881 | 0,1381 | 2,7620 | 27,62 |
| | 0,8670 | 0,0530 | 1,0570 | 0,1900 | 0,1370 | 2,5849 | 27,40 |
| Harina | 0,8342 | 0,0500 | 1,0061 | 0,1719 | 0,1219 | 2,4380 | 24,38 |
| | 0,8346 | 0,0500 | 1,0257 | 0,1911 | 0,1411 | 2,8220 | 28,22 |
| | 0,8711 | 0,0501 | 1,0673 | 0,1962 | 0,1461 | 2,9162 | 29,22 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 30. Resumen estadístico para el % de capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Tratamiento | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|-------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 29,76 | 0,484974 | 1,62962% | 29,2 | 30,04 |
| 10.0-4.0 | 3 | 25,1133 | 0,948543 | 3,77705% | 24,06 | 25,9 |
| 10.0-5.0 | 3 | 25,2867 | 3,22716 | 12,7623% | 23,16 | 29,0 |
| 10.0-6.0 | 3 | 23,4 | 1,86805 | 7,98311% | 21,64 | 25,36 |
| 12.0-3.0 | 3 | 41,2533 | 0,979047 | 2,37326% | 40,5 | 42,36 |
| 12.0-4.0 | 3 | 28,92 | 1,58101 | 5,46685% | 27,16 | 30,22 |
| 12.0-5.0 | 3 | 28,18 | 3,72779 | 13,2285% | 25,2 | 32,36 |
| 12.0-6.0 | 3 | 27,66 | 0,282135 | 1,02001% | 27,4 | 27,96 |
| Total | 24 | 28,6967 | 5,52894 | 19,2668% | 21,64 | 42,36 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 31. ANOVA para el % de capacidad de absorción de agua por tratamientos.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|--------------|---------------|
| Entre grupos | 638,145 | 7 | 91,1636 | 22,46 | 0,0000 |
| Intra grupos | 64,9464 | 16 | 4,05915 | | |
| Total (Corr.) | 703,092 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 32. Pruebas de múltiples rangos Tukey para el % de capacidad de absorción de agua por tratamientos.

| Tratamiento | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| 10.0-6.0 | 3 | 23,4 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 25,1133 | XX |
| 10.0-5.0 | 3 | 25,2867 | XX |
| 12.0-6.0 | 3 | 27,66 | XX |
| 12.0-5.0 | 3 | 28,18 | XX |
| 12.0-4.0 | 3 | 28,92 | XX |
| 10.0-3.0 | 3 | 29,76 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 41,2533 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 33. Datos y resultados obtenidos del % de capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados proteicos | Peso tubo vacío (g) | Peso muestra (g) | Peso tubo + muestra (g) | Peso muestra+ Aceite (g) | Peso aceite retenido (g) | Peso aceite retenido (g)/ g muestra | % CAACEITE |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|-------------------|
| 10.0-3.0 | 0,8753 | 0,0500 | 1,2067 | 0,3314 | 0,2814 | 5,6280 | 66,28 |
| | 0,8380 | 0,0499 | 1,1889 | 0,3509 | 0,3010 | 6,0321 | 70,18 |
| | 0,8670 | 0,0500 | 1,1980 | 0,3310 | 0,2810 | 5,6200 | 66,20 |
| 10.0-4.0 | 0,8830 | 0,0498 | 1,1377 | 0,2547 | 0,2049 | 4,1145 | 50,94 |
| | 0,8406 | 0,0505 | 1,1084 | 0,2678 | 0,2173 | 4,3030 | 53,56 |
| | 0,8560 | 0,0500 | 1,1090 | 0,2530 | 0,2030 | 4,0600 | 50,60 |
| 10.0-5.0 | 0,8425 | 0,0499 | 1,1083 | 0,2658 | 0,2159 | 4,3267 | 53,16 |
| | 0,8400 | 0,0503 | 1,0897 | 0,2497 | 0,1994 | 3,9642 | 49,94 |
| | 0,8450 | 0,0501 | 1,1080 | 0,2630 | 0,2129 | 4,2495 | 52,60 |
| 10.0-6.0 | 0,8720 | 0,0505 | 1,0078 | 0,1358 | 0,0853 | 1,6891 | 27,16 |
| | 0,8710 | 0,0500 | 1,0067 | 0,1357 | 0,0857 | 1,7140 | 27,14 |
| | 0,8740 | 0,0499 | 1,0090 | 0,1350 | 0,0851 | 1,7054 | 27,00 |
| 12.0-3.0 | 0,8345 | 0,0504 | 1,1402 | 0,3057 | 0,2553 | 5,0655 | 61,14 |
| | 0,8646 | 0,0506 | 1,1548 | 0,2902 | 0,2396 | 4,7352 | 58,04 |
| | 0,8416 | 0,0497 | 1,1311 | 0,2895 | 0,2398 | 4,8249 | 57,90 |
| 12.0-4.0 | 0,8410 | 0,0499 | 1,1221 | 0,2811 | 0,2312 | 4,6333 | 56,22 |
| | 0,8369 | 0,0500 | 1,1341 | 0,2972 | 0,2472 | 4,9440 | 59,44 |
| | 0,8562 | 0,0500 | 1,1280 | 0,2718 | 0,2218 | 4,4360 | 54,36 |
| 12.0-5.0 | 0,8760 | 0,0497 | 1,1612 | 0,2852 | 0,2355 | 4,7384 | 57,04 |
| | 0,8407 | 0,0500 | 1,1452 | 0,3045 | 0,2545 | 5,0900 | 60,90 |
| | 0,8681 | 0,0499 | 1,1688 | 0,3007 | 0,2508 | 5,0261 | 60,14 |
| 12.0-6.0 | 0,8390 | 0,0510 | 1,2149 | 0,3759 | 0,3249 | 6,3706 | 75,18 |
| | 0,8450 | 0,0490 | 1,2070 | 0,3620 | 0,3130 | 6,3878 | 72,40 |
| | 0,8420 | 0,0502 | 1,1980 | 0,3560 | 0,3058 | 6,0916 | 71,20 |
| Harina | 0,8494 | 0,0502 | 1,0551 | 0,2057 | 0,1555 | 3,0976 | 41,14 |
| | 0,8577 | 0,0506 | 1,0247 | 0,1670 | 0,1164 | 2,3004 | 33,40 |
| | 0,8507 | 0,0498 | 1,0240 | 0,1733 | 0,1235 | 2,4799 | 34,66 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 34. Resumen estadístico para el % de capacidad de absorción de aceite de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 67,5533 | 2,27511 | 3,36787% | 66,2 | 70,18 |
| 10.0-4.0 | 3 | 51,7 | 1,61975 | 3,13298% | 50,6 | 53,56 |
| 10.0-5.0 | 3 | 51,9 | 1,72035 | 3,31474% | 49,94 | 53,16 |
| 10.0-6.0 | 3 | 27,1 | 0,087178 | 0,32169% | 27,0 | 27,16 |
| 12.0-3.0 | 3 | 59,0267 | 1,83154 | 3,1029% | 57,9 | 61,14 |
| 12.0-4.0 | 3 | 56,6733 | 2,57016 | 4,53505% | 54,36 | 59,44 |
| 12.0-5.0 | 3 | 59,36 | 2,0448 | 3,44474% | 57,04 | 60,9 |
| 12.0-6.0 | 3 | 72,9267 | 2,0416 | 2,79953% | 71,2 | 75,18 |
| Total | 24 | 55,78 | 13,1731 | 23,6162% | 27,0 | 75,18 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 35. ANOVA para el % de capacidad de absorción de aceite por tratamientos.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------------|---------------|
| Entre grupos | 3933,05 | 7 | 561,865 | 154,59 | 0,0000 |
| Intra grupos | 58,1531 | 16 | 3,63457 | | |
| Total (Corr.) | 3991,21 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 36. Pruebas de múltiples rangos Tukey para el % de capacidad de absorción de aceite por tratamientos.

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 10.0-6.0 | 3 | 27,1 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 51,7 | X |
| 10.0-5.0 | 3 | 51,9 | X |
| 12.0-4.0 | 3 | 56,6733 | XX |
| 12.0-3.0 | 3 | 59,0267 | X |
| 12.0-5.0 | 3 | 59,36 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 67,5533 | X |
| 12.0-6.0 | 3 | 72,9267 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 37. Datos y resultados obtenidos del % de solubilidad de los aislados proteicos precipitados a pH 10.0 obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados Proteicos | pH | Peso muestra (g) | Abs $\lambda=562\text{nm}$ | [$\mu\text{g}/\text{mL}$] | Vol. Aforo (mL) | FD | μg proteína/g muestra | mg proteína/g muestra | g proteína/g muestra | % Solubilidad |
|--------------------|-------|------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| 10.0-3.0 | 3.00 | 0,0251 | 0,94 | 1040,16 | 5,00 | | 207202,88 | 207,20 | 0,21 | 20,72 |
| | | 0,0251 | 0,99 | 1096,88 | 5,00 | | 218502,90 | 218,50 | 0,22 | 21,85 |
| | | 0,0251 | 0,93 | 1028,81 | 5,00 | | 204942,88 | 204,94 | 0,20 | 20,49 |
| | 6.00 | 0,0251 | 0,74 | 813,25 | 5,00 | | 162002,81 | 162,00 | 0,16 | 16,20 |
| | | 0,0251 | 0,76 | 835,94 | 5,00 | | 166522,82 | 166,52 | 0,17 | 16,65 |
| | | 0,0251 | 0,81 | 892,67 | 5,00 | | 177822,83 | 177,82 | 0,18 | 17,78 |
| | 9.00 | 0,0252 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | 3,00 | 524598,46 | 524,60 | 0,52 | 52,46 |
| | | 0,0252 | 0,76 | 835,94 | 5,00 | 3,00 | 497586,03 | 497,59 | 0,50 | 49,76 |
| | | 0,0252 | 0,75 | 824,60 | 5,00 | 3,00 | 490832,93 | 490,83 | 0,49 | 49,08 |
| | 12.00 | 0,0262 | 0,27 | 280,03 | 5,00 | 3,00 | 160321,84 | 160,32 | 0,16 | 16,03 |
| | | 0,0262 | 0,25 | 257,34 | 5,00 | 3,00 | 147331,13 | 147,33 | 0,15 | 14,73 |
| | | 0,0262 | 0,30 | 314,06 | 5,00 | 3,00 | 179807,90 | 179,81 | 0,18 | 17,98 |
| 10.0-4.0 | 3.00 | 0,0255 | 0,75 | 824,60 | 5,00 | 2,00 | 323372,28 | 323,37 | 0,32 | 32,34 |
| | | 0,0255 | 0,73 | 801,91 | 5,00 | 2,00 | 314474,07 | 314,47 | 0,31 | 31,45 |
| | | 0,0255 | 0,78 | 858,63 | 5,00 | 2,00 | 336719,60 | 336,72 | 0,34 | 33,67 |
| | 6.00 | 0,0260 | 0,60 | 654,42 | 5,00 | | 125850,20 | 125,85 | 0,13 | 12,59 |
| | | 0,0260 | 0,64 | 699,80 | 5,00 | | 134577,29 | 134,58 | 0,13 | 13,46 |
| | | 0,0260 | 0,65 | 711,15 | 5,00 | | 136759,06 | 136,76 | 0,14 | 13,68 |
| | 9.00 | 0,0259 | 0,65 | 711,15 | 5,00 | 2,00 | 274574,18 | 274,57 | 0,27 | 27,46 |
| | | 0,0259 | 0,66 | 722,49 | 5,00 | 2,00 | 278954,57 | 278,95 | 0,28 | 27,90 |
| | | 0,0259 | 0,65 | 711,15 | 5,00 | 2,00 | 274574,18 | 274,57 | 0,27 | 27,46 |
| | 12.00 | 0,0250 | 0,79 | 869,98 | 5,00 | 2,00 | 347992,08 | 347,99 | 0,35 | 34,80 |
| | | 0,0250 | 0,88 | 972,09 | 5,00 | 2,00 | 388834,86 | 388,83 | 0,39 | 38,88 |
| | | 0,0250 | 0,83 | 915,36 | 5,00 | 2,00 | 366144,43 | 366,14 | 0,37 | 36,61 |

| | | | | | | | | | | |
|----------|-------|--------|------|--------|------|------|-----------|--------|------|-------|
| 10.0-5.0 | 3.00 | 0,0258 | 0,55 | 597,69 | 5,00 | 2,00 | 231664,71 | 231,66 | 0,23 | 23,17 |
| | | 0,0258 | 0,61 | 665,77 | 5,00 | 2,00 | 258048,94 | 258,05 | 0,26 | 25,80 |
| | | 0,0258 | 0,55 | 597,69 | 5,00 | 2,00 | 231664,71 | 231,66 | 0,23 | 23,17 |
| | 6.00 | 0,0247 | 0,30 | 314,06 | 5,00 | | 63575,80 | 63,58 | 0,06 | 6,36 |
| | | 0,0247 | 0,26 | 268,68 | 5,00 | | 54389,39 | 54,39 | 0,05 | 5,44 |
| | | 0,0247 | 0,30 | 314,06 | 5,00 | | 63575,80 | 63,58 | 0,06 | 6,36 |
| | 9.00 | 0,0248 | 0,78 | 858,63 | 5,00 | 2,00 | 346223,78 | 346,22 | 0,35 | 34,62 |
| | | 0,0248 | 0,84 | 926,71 | 5,00 | 2,00 | 373671,89 | 373,67 | 0,37 | 37,37 |
| | | 0,0248 | 0,85 | 938,05 | 5,00 | 2,00 | 378246,57 | 378,25 | 0,38 | 37,82 |
| | 12.00 | 0,0260 | 0,66 | 722,49 | 5,00 | 2,00 | 277881,67 | 277,88 | 0,28 | 27,79 |
| | | 0,0260 | 0,71 | 779,22 | 5,00 | 2,00 | 299699,40 | 299,70 | 0,30 | 29,97 |
| | | 0,0260 | 0,74 | 813,25 | 5,00 | 2,00 | 312790,04 | 312,79 | 0,31 | 31,28 |
| 10.0-6.0 | 3.00 | 0,0258 | 0,88 | 972,09 | 5,00 | | 188388,98 | 188,39 | 0,19 | 18,84 |
| | | 0,0258 | 0,84 | 926,71 | 5,00 | | 179594,24 | 179,59 | 0,18 | 17,96 |
| | | 0,0258 | 0,79 | 869,98 | 5,00 | | 168600,81 | 168,60 | 0,17 | 16,86 |
| | 6.00 | 0,0252 | 0,43 | 461,55 | 5,00 | | 91577,84 | 91,58 | 0,09 | 9,16 |
| | | 0,0252 | 0,44 | 472,90 | 5,00 | | 93828,88 | 93,83 | 0,09 | 9,38 |
| | | 0,0252 | 0,44 | 472,90 | 5,00 | | 93828,88 | 93,83 | 0,09 | 9,38 |
| | 9.00 | 0,0265 | 0,70 | 767,87 | 5,00 | 2,00 | 289763,48 | 289,76 | 0,29 | 28,98 |
| | | 0,0265 | 0,68 | 745,18 | 5,00 | 2,00 | 281201,05 | 281,20 | 0,28 | 28,12 |
| | | 0,0265 | 0,69 | 756,53 | 5,00 | 2,00 | 285482,27 | 285,48 | 0,29 | 28,55 |
| | 12.00 | 0,0246 | 0,78 | 858,63 | 5,00 | 2,00 | 349038,61 | 349,04 | 0,35 | 34,90 |
| | | 0,0246 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | 2,00 | 358262,36 | 358,26 | 0,36 | 35,83 |
| | | 0,0246 | 0,78 | 858,63 | 5,00 | 2,00 | 349038,61 | 349,04 | 0,35 | 34,90 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 38. Datos y resultados obtenidos del % de solubilidad de los aislados proteicos precipitados a pH 12.0 obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislados Proteicos | pH | Peso muestra (g) | Abs $\lambda=562\text{nm}$ | [$\mu\text{g}/\text{mL}$] | Vol. Aforo (mL) | FD | μg proteína/g muestra | mg proteína/g muestra | g proteína/g muestra | % Solubilidad |
|--------------------|-------|------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| 12.0-3.0 | 3.00 | 0,0258 | 0,84 | 926,71 | 5,00 | | 179594,24 | 179,59 | 0,18 | 17,96 |
| | | 0,0258 | 0,84 | 926,71 | 5,00 | | 179594,24 | 179,59 | 0,18 | 17,96 |
| | | 0,0258 | 0,78 | 858,63 | 5,00 | | 166402,13 | 166,40 | 0,17 | 16,64 |
| | 6.00 | 0,0250 | 0,46 | 495,59 | 5,00 | | 99117,59 | 99,12 | 0,10 | 9,91 |
| | | 0,0250 | 0,50 | 540,97 | 5,00 | | 108193,77 | 108,19 | 0,11 | 10,82 |
| | | 0,0250 | 0,48 | 518,28 | 5,00 | | 103655,68 | 103,66 | 0,10 | 10,37 |
| | 9.00 | 0,0250 | 0,98 | 1085,54 | 5,00 | 2,00 | 434215,74 | 434,22 | 0,43 | 43,42 |
| | | 0,0250 | 1,02 | 1130,92 | 5,00 | 2,00 | 452368,09 | 452,37 | 0,45 | 45,24 |
| | | 0,0250 | 0,99 | 1096,88 | 5,00 | 2,00 | 438753,83 | 438,75 | 0,44 | 43,88 |
| | 12.00 | 0,0250 | 0,91 | 1006,12 | 5,00 | 2,00 | 402449,13 | 402,45 | 0,40 | 40,24 |
| | | 0,0250 | 0,93 | 1028,81 | 5,00 | 2,00 | 411525,30 | 411,53 | 0,41 | 41,15 |
| | | 0,0250 | 0,96 | 1062,85 | 5,00 | 2,00 | 425139,56 | 425,14 | 0,43 | 42,51 |
| 12.0-4.0 | 3.00 | 0,0250 | 0,76 | 835,94 | 5,00 | | 167188,91 | 167,19 | 0,17 | 16,72 |
| | | 0,0250 | 0,77 | 847,29 | 5,00 | | 169457,95 | 169,46 | 0,17 | 16,95 |
| | | 0,0250 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | | 176265,08 | 176,27 | 0,18 | 17,63 |
| | 6.00 | 0,0254 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | | 173489,25 | 173,49 | 0,17 | 17,35 |
| | | 0,0254 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | | 173489,25 | 173,49 | 0,17 | 17,35 |
| | | 0,0254 | 0,77 | 847,29 | 5,00 | | 166789,32 | 166,79 | 0,17 | 16,68 |
| | 9.00 | 0,0256 | 0,71 | 779,22 | 5,00 | 3,00 | 456573,30 | 456,57 | 0,46 | 45,66 |
| | | 0,0256 | 0,72 | 790,56 | 5,00 | 3,00 | 463220,89 | 463,22 | 0,46 | 46,32 |
| | | 0,0256 | 0,71 | 779,22 | 5,00 | 3,00 | 456573,30 | 456,57 | 0,46 | 45,66 |
| | 12.00 | 0,0256 | 0,76 | 835,94 | 5,00 | 3,00 | 489811,25 | 489,81 | 0,49 | 48,98 |
| | | 0,0256 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | 3,00 | 516401,61 | 516,40 | 0,52 | 51,64 |
| | | 0,0256 | 0,81 | 892,67 | 5,00 | 3,00 | 523049,20 | 523,05 | 0,52 | 52,30 |

| | | | | | | | | | | |
|----------|-------|--------|------|--------|------|------|-----------|--------|------|-------|
| 12.0-5.0 | 3.00 | 0,0250 | 0,46 | 495,59 | 5,00 | 3,00 | 297352,78 | 297,35 | 0,30 | 29,74 |
| | | 0,0250 | 0,53 | 575,00 | 5,00 | 3,00 | 345002,70 | 345,00 | 0,35 | 34,50 |
| | | 0,0250 | 0,43 | 461,55 | 5,00 | 3,00 | 276931,39 | 276,93 | 0,28 | 27,69 |
| | 6.00 | 0,0256 | 0,51 | 552,31 | 5,00 | | 107873,84 | 107,87 | 0,11 | 10,79 |
| | | 0,0256 | 0,51 | 552,31 | 5,00 | | 107873,84 | 107,87 | 0,11 | 10,79 |
| | | 0,0256 | 0,52 | 563,66 | 5,00 | | 110089,70 | 110,09 | 0,11 | 11,01 |
| | 9.00 | 0,0261 | 0,79 | 869,98 | 5,00 | 3,00 | 499988,62 | 499,99 | 0,50 | 50,00 |
| | | 0,0261 | 0,80 | 881,33 | 5,00 | 3,00 | 506508,86 | 506,51 | 0,51 | 50,65 |
| | | 0,0261 | 0,79 | 869,98 | 5,00 | 3,00 | 499988,62 | 499,99 | 0,50 | 50,00 |
| | 12.00 | 0,0253 | 0,75 | 824,60 | 5,00 | 3,00 | 488892,87 | 488,89 | 0,49 | 48,89 |
| | | 0,0253 | 0,76 | 835,94 | 5,00 | 3,00 | 495619,29 | 495,62 | 0,50 | 49,56 |
| | | 0,0253 | 0,82 | 904,02 | 5,00 | 3,00 | 535977,78 | 535,98 | 0,54 | 53,60 |
| 12.0-6.0 | 3.00 | 0,0200 | 0,86 | 949,40 | 5,00 | | 237349,18 | 237,35 | 0,24 | 23,73 |
| | | 0,0200 | 0,89 | 983,43 | 5,00 | | 245858,09 | 245,86 | 0,25 | 24,59 |
| | | 0,0200 | 0,87 | 960,74 | 5,00 | | 240185,49 | 240,19 | 0,24 | 24,02 |
| | 6.00 | 0,0128 | 0,33 | 348,10 | 5,00 | | 135976,61 | 135,98 | 0,14 | 13,60 |
| | | 0,0128 | 0,36 | 382,14 | 5,00 | | 149271,79 | 149,27 | 0,15 | 14,93 |
| | | 0,0128 | 0,32 | 336,75 | 5,00 | | 131544,89 | 131,54 | 0,13 | 13,15 |
| | 9.00 | 0,0125 | 0,63 | 688,46 | 5,00 | 2,00 | 550765,35 | 550,77 | 0,55 | 55,08 |
| | | 0,0125 | 0,57 | 620,39 | 5,00 | 2,00 | 496308,30 | 496,31 | 0,50 | 49,63 |
| | | 0,0125 | 0,60 | 654,42 | 5,00 | 2,00 | 523536,83 | 523,54 | 0,52 | 52,35 |
| | 12.00 | 0,0128 | 0,63 | 688,46 | 5,00 | 2,00 | 537856,79 | 537,86 | 0,54 | 53,79 |
| | | 0,0128 | 0,64 | 699,80 | 5,00 | 2,00 | 546720,24 | 546,72 | 0,55 | 54,67 |
| | | 0,0128 | 0,61 | 665,77 | 5,00 | 2,00 | 520129,88 | 520,13 | 0,52 | 52,01 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Anexo E. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la determinación de la actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

Tabla 39. Datos y resultados obtenidos de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método ABTS

| Aislados proteicos | Abs $\lambda=734\text{nm}$ | Abs NETA $\lambda=734\text{nm}$ | $\mu\text{M/mL}$ | Peso muestra (g) | Vol Aforo (mL) | FD | $\mu\text{mol ET/g}$ muestra |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|----------------|----|------------------------------|
| 10.0-3.0 | 0,29 | 0,81 | 418,20 | 0,2002 | 25 | 2 | 104445,34 |
| | 0,32 | 0,78 | 397,05 | 0,2002 | 25 | 2 | 99162,39 |
| | 0,33 | 0,77 | 390,00 | 0,2002 | 25 | 2 | 97401,41 |
| 10.0-4.0 | 0,39 | 0,71 | 347,69 | 0,2005 | 25 | 2 | 86705,58 |
| | 0,40 | 0,70 | 340,64 | 0,2005 | 25 | 2 | 84947,23 |
| | 0,40 | 0,70 | 340,64 | 0,2005 | 25 | 2 | 84947,23 |
| 10.0-5.0 | 0,19 | 0,91 | 488,71 | 0,2001 | 25 | | 61058,08 |
| | 0,19 | 0,91 | 488,71 | 0,2001 | 25 | | 61058,08 |
| | 0,18 | 0,92 | 495,76 | 0,2001 | 25 | | 61939,02 |
| 10.0-6.0 | 0,31 | 0,79 | 404,10 | 0,1740 | 25 | | 58059,94 |
| | 0,31 | 0,79 | 404,10 | 0,1740 | 25 | | 58059,94 |
| | 0,31 | 0,79 | 404,10 | 0,1740 | 25 | | 58059,94 |
| 12.0-3.0 | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,2007 | 25 | | 68780,23 |
| | 0,11 | 0,99 | 545,12 | 0,2007 | 25 | | 67901,93 |
| | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,2007 | 25 | | 68780,23 |
| 12.0-4.0 | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,2008 | 25 | | 68745,98 |
| | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,2008 | 25 | | 68745,98 |
| | 0,09 | 1,01 | 559,22 | 0,2008 | 25 | | 69623,84 |
| 12.0-5.0 | 0,18 | 0,92 | 495,76 | 0,2004 | 25 | | 61846,29 |
| | 0,14 | 0,96 | 523,96 | 0,2004 | 25 | | 65364,74 |
| | 0,16 | 0,94 | 509,86 | 0,2004 | 25 | | 63605,52 |
| 12.0-6.0 | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,1120 | 25 | | 123251,72 |
| | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,1120 | 25 | | 123251,72 |
| | 0,08 | 1,02 | 566,27 | 0,1120 | 25 | | 126399,48 |
| Harina | 0,09 | 1,01 | 559,22 | 0,2000 | 25 | | 69902,33 |
| | 0,10 | 1,00 | 552,17 | 0,2000 | 25 | | 69020,96 |
| | 0,11 | 0,99 | 545,12 | 0,2000 | 25 | | 68139,59 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

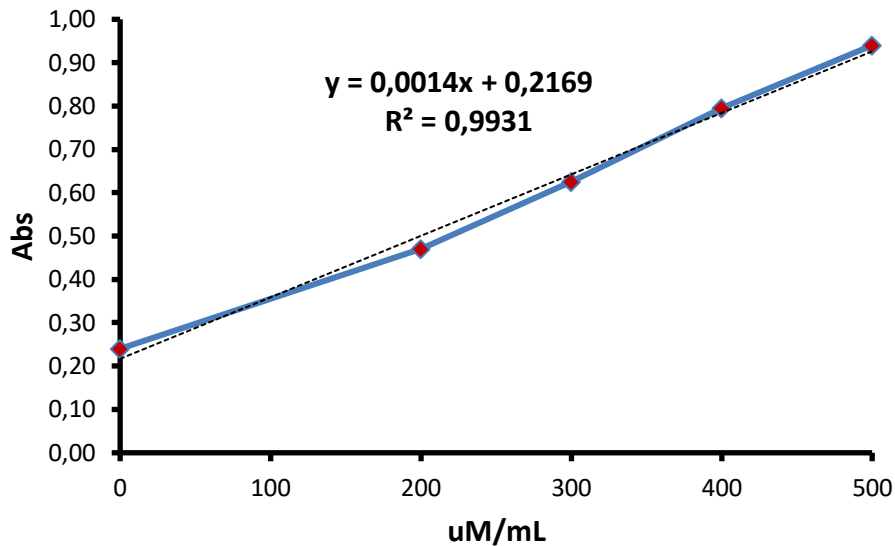


Gráfico 9. Curva de calibrado de Trolox (0 uM/mL a 500 uM/mL) para la determinación de actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo por el método ABTS.

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 40. Resumen estadístico de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método ABTS

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|---------|---------|
| 10.0-3.0 | 3 | 100336, | 3665,78 | 3,65349% | 97401,4 | 104445, |
| 10.0-4.0 | 3 | 85533,3 | 1015,18 | 1,18689% | 84947,2 | 86705,6 |
| 10.0-5.0 | 3 | 61351,7 | 508,611 | 0,829008% | 61058,1 | 61939,0 |
| 10.0-6.0 | 3 | 58059,9 | 0 | 0% | 58059,9 | 58059,9 |
| 12.0-3.0 | 3 | 68487,5 | 507,087 | 0,740408% | 67901,9 | 68780,2 |
| 12.0-4.0 | 3 | 69038,6 | 506,833 | 0,734129% | 68746,0 | 69623,8 |
| 12.0-5.0 | 3 | 63605,5 | 1759,23 | 2,76584% | 61846,3 | 65364,7 |
| 12.0-6.0 | 3 | 124301, | 1817,36 | 1,46206% | 123252, | 126399, |
| Total | 24 | 78839,2 | 22148,7 | 28,0935% | 58059,9 | 126399, |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 41. ANOVA para la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método ABTS

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 1,12397E10 | 7 | 1,60568E9 | 593,63 | 0,0000 |
| Intra grupos | 4,32778E7 | 16 | 2,70486E6 | | |
| Total (Corr.) | 1,1283E10 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 42. Pruebas de Múltiple Rangos Tukey para la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método ABTS

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 10.0-6.0 | 3 | 58059,9 | X |
| 10.0-5.0 | 3 | 61351,7 | XX |
| 12.0-5.0 | 3 | 63605,5 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 68487,5 | X |
| 12.0-4.0 | 3 | 69038,6 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 85533,3 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 100336, | X |
| 12.0-6.0 | 3 | 124301, | X |

Elaborado por: Quinteros (2021).

Tabla 43. Datos y resultados obtenidos de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método FRAP.

| Aislados proteicos | Abs $\lambda=593\text{nm}$ | $\mu\text{M/mL}$ | Peso muestra (g) | Vol Aforo (mL) | FD | $\mu\text{mol ET/g}$ muestra |
|--------------------|----------------------------|------------------|------------------|----------------|----|------------------------------|
| 10.0-3.0 | 0,29 | 262,87 | 0,2002 | 25 | 2 | 65652,91 |
| | 0,29 | 262,87 | 0,2002 | 25 | 2 | 65652,91 |
| | 0,28 | 256,89 | 0,2002 | 25 | 2 | 64157,40 |
| 10.0-4.0 | 0,30 | 268,86 | 0,2005 | 25 | 2 | 67047,95 |
| | 0,33 | 286,83 | 0,2005 | 25 | 2 | 71527,77 |
| | 0,33 | 286,83 | 0,2005 | 25 | 2 | 71527,77 |
| 10.0-5.0 | 0,38 | 316,77 | 0,2001 | 25 | | 39576,02 |
| | 0,38 | 316,77 | 0,2001 | 25 | | 39576,02 |
| | 0,39 | 322,75 | 0,2001 | 25 | | 40324,15 |
| 10.0-6.0 | 0,32 | 280,84 | 0,1740 | 25 | | 40350,33 |
| | 0,33 | 286,83 | 0,1740 | 25 | | 41210,68 |
| | 0,29 | 262,87 | 0,1740 | 25 | | 37769,29 |
| 12.0-3.0 | 0,28 | 256,89 | 0,2007 | 25 | | 31998,78 |
| | 0,26 | 244,91 | 0,2007 | 25 | | 30507,00 |
| | 0,27 | 250,90 | 0,2007 | 25 | | 31252,89 |
| 12.0-4.0 | 0,30 | 268,86 | 0,2008 | 25 | | 33473,89 |
| | 0,32 | 280,84 | 0,2008 | 25 | | 34964,93 |
| | 0,31 | 274,85 | 0,2008 | 25 | | 34219,41 |
| 12.0-5.0 | 0,23 | 226,95 | 0,2004 | 25 | | 28311,64 |
| | 0,22 | 220,96 | 0,2004 | 25 | | 27564,63 |
| | 0,23 | 226,95 | 0,2004 | 25 | | 28311,64 |
| 12.0-6.0 | 0,12 | 161,08 | 0,1120 | 25 | | 35954,88 |
| | 0,12 | 161,08 | 0,1120 | 25 | | 35954,88 |
| | 0,10 | 149,10 | 0,1120 | 25 | | 33281,65 |
| Harina | 0,33 | 286,83 | 0,2000 | 25 | | 35853,29 |
| | 0,33 | 286,83 | 0,2000 | 25 | | 35853,29 |
| | 0,32 | 280,84 | 0,2000 | 25 | | 35104,79 |

Elaborado por: Quinteros (2021).

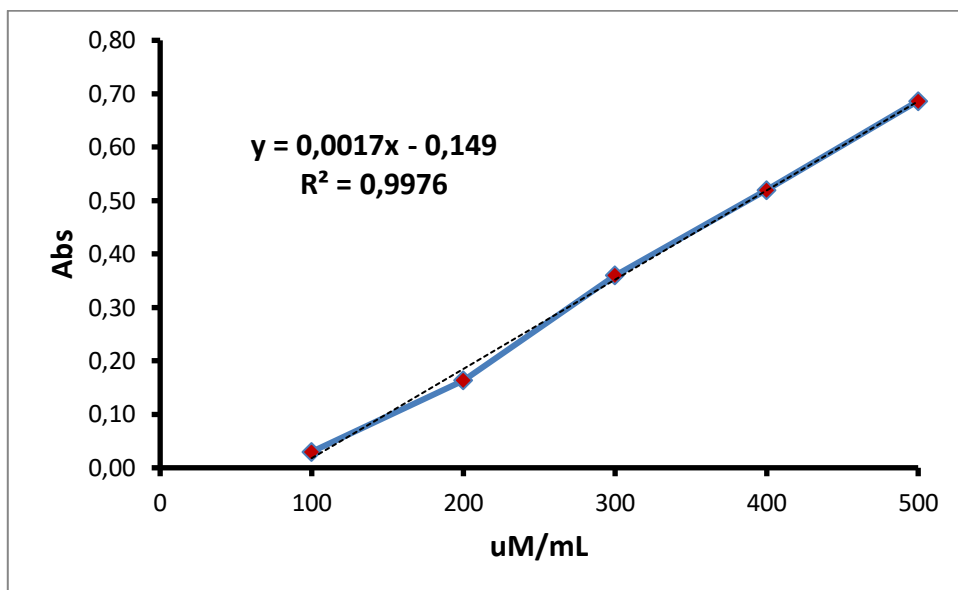


Gráfico 10. Curva de calibrado de Trolox (100 uM/mL a 500 uM/mL) para la determinación de actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo por el método FRAP.

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 44. Resumen estadístico de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método FRAP

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|---------|---------|
| 10.0-3.0 | 3 | 65154,4 | 863,433 | 1,32521% | 64157,4 | 65652,9 |
| 10.0-4.0 | 3 | 70034,5 | 2586,43 | 3,69307% | 67047,9 | 71527,8 |
| 10.0-5.0 | 3 | 39825,4 | 431,933 | 1,08457% | 39576,0 | 40324,2 |
| 10.0-6.0 | 3 | 39776,8 | 1790,96 | 4,50252% | 37769,3 | 41210,7 |
| 12.0-3.0 | 3 | 31252,9 | 745,89 | 2,38663% | 30507,0 | 31998,8 |
| 12.0-4.0 | 3 | 34219,4 | 745,52 | 2,17865% | 33473,9 | 34964,9 |
| 12.0-5.0 | 3 | 28062,6 | 431,286 | 1,53687% | 27564,6 | 28311,6 |
| 12.0-6.0 | 3 | 35063,8 | 1543,39 | 4,40166% | 33281,7 | 35954,9 |
| Total | 24 | 42923,7 | 15121,1 | 35,228% | 27564,6 | 71527,8 |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 45. ANOVA para la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método FRAP

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 5,22991E9 | 7 | 7,4713E8 | 411,94 | 0,0000 |
| Intra grupos | 2,90188E7 | 16 | 1,81368E6 | | |
| Total (Corr.) | 5,25893E9 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 46. Pruebas de Múltiple Rangos Tukey para la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método FRAP

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 12.0-5.0 | 3 | 28062,6 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 31252,9 | XX |
| 12.0-4.0 | 3 | 34219,4 | X |
| 12.0-6.0 | 3 | 35063,8 | X |
| 10.0-6.0 | 3 | 39776,8 | X |
| 10.0-5.0 | 3 | 39825,4 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 65154,4 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 70034,5 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 47. Datos y resultados obtenidos de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método DPPH

| Aislados proteicos | Abs $\lambda=515\text{nm}$ | Abs NETA $\lambda=515\text{nm}$ | $\mu\text{M/mL}$ | Peso muestra (g) | Vol Aforo (mL) | $\mu\text{mol ET/g}$ muestra |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|----------------|------------------------------|
| 10.0-3.0 | 0,28 | 0,39 | 535,47 | 0,2002 | 25 | 66866,77 |
| | 0,28 | 0,39 | 535,47 | 0,2002 | 25 | 66866,77 |
| | 0,26 | 0,41 | 562,93 | 0,2002 | 25 | 70295,84 |
| 10.0-4.0 | 0,28 | 0,39 | 535,47 | 0,2005 | 25 | 66766,72 |
| | 0,31 | 0,36 | 494,28 | 0,2005 | 25 | 61630,82 |
| | 0,30 | 0,37 | 508,01 | 0,2005 | 25 | 63342,79 |
| 10.0-5.0 | 0,55 | 0,12 | 164,76 | 0,2001 | 25 | 20584,67 |
| | 0,49 | 0,18 | 247,14 | 0,2001 | 25 | 30877,01 |
| | 0,49 | 0,18 | 247,14 | 0,2001 | 25 | 30877,01 |
| 10.0-6.0 | 0,57 | 0,10 | 137,30 | 0,1740 | 25 | 19726,98 |
| | 0,59 | 0,08 | 109,84 | 0,1740 | 25 | 15781,58 |
| | 0,52 | 0,15 | 205,95 | 0,1740 | 25 | 29590,47 |
| 12.0-3.0 | 0,54 | 0,13 | 178,49 | 0,2007 | 25 | 22233,40 |
| | 0,53 | 0,14 | 192,22 | 0,2007 | 25 | 23943,66 |
| | 0,55 | 0,12 | 164,76 | 0,2007 | 25 | 20523,13 |
| 12.0-4.0 | 0,50 | 0,17 | 233,41 | 0,2008 | 25 | 29059,96 |
| | 0,49 | 0,18 | 247,14 | 0,2008 | 25 | 30769,37 |
| | 0,46 | 0,21 | 288,33 | 0,2008 | 25 | 35897,60 |
| 12.0-5.0 | 0,50 | 0,17 | 233,41 | 0,2004 | 25 | 29117,97 |
| | 0,47 | 0,20 | 274,60 | 0,2004 | 25 | 34256,43 |
| | 0,49 | 0,18 | 247,14 | 0,2004 | 25 | 30830,79 |
| 12.0-6.0 | 0,51 | 0,16 | 219,68 | 0,1120 | 25 | 49035,63 |
| | 0,52 | 0,15 | 205,95 | 0,1120 | 25 | 45970,91 |
| | 0,52 | 0,15 | 205,95 | 0,1120 | 25 | 45970,91 |
| Harina | 0,46 | 0,21 | 288,33 | 0,2000 | 25 | 36041,19 |
| | 0,47 | 0,20 | 274,60 | 0,2000 | 25 | 34324,94 |
| | 0,47 | 0,20 | 274,60 | 0,2000 | 25 | 34324,94 |

Elaborado por: Quinteros (2021)

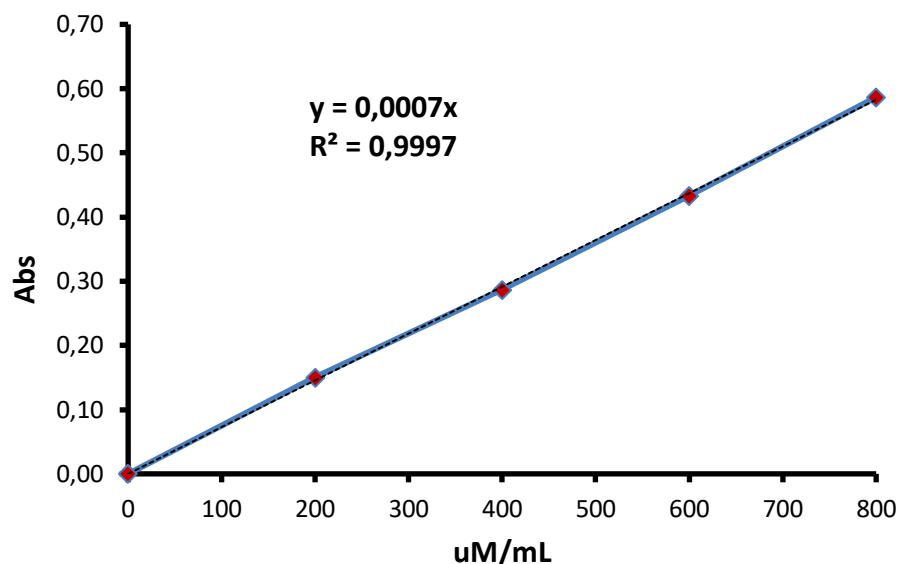


Gráfico 11. Curva de calibrado de Trolox (0 uM/mL a 800 uM/mL) para la determinación de actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo por el método DPPH.

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 48. Resumen estadístico de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método DPPH

| Tratamientos | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación | Mínimo | Máximo |
|--------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|--------|--------|
| 10.0-3.0 | 3 | 59,2033 | 1,7205 | 2,90609% | 58,21 | 61,19 |
| 10.0-4.0 | 3 | 55,72 | 2,28147 | 4,09452% | 53,73 | 58,21 |
| 10.0-5.0 | 3 | 23,8833 | 5,17306 | 21,6597% | 17,91 | 26,87 |
| 10.0-6.0 | 3 | 16,42 | 5,38198 | 32,777% | 11,94 | 22,39 |
| 12.0-3.0 | 3 | 19,4033 | 1,495 | 7,70488% | 17,91 | 20,9 |
| 12.0-4.0 | 3 | 27,86 | 3,10569 | 11,1475% | 25,37 | 31,34 |
| 12.0-5.0 | 3 | 27,3633 | 2,28038 | 8,33371% | 25,37 | 29,85 |
| 12.0-6.0 | 3 | 22,8867 | 0,860252 | 3,75875% | 22,39 | 23,88 |
| Total | 24 | 31,5925 | 15,927 | 50,4138% | 11,94 | 61,19 |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 49. ANOVA para la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método DPPH

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 5670,95 | 7 | 810,135 | 79,32 | 0,0000 |
| Intra grupos | 163,424 | 16 | 10,214 | | |
| Total (Corr.) | 5834,37 | 23 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 50. Pruebas de Múltiple Rangos Tukey para la actividad antioxidante expresa en $\mu\text{mol ET/g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método DPPH

| Tratamientos | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|--------------|-------|---------|-------------------|
| 10.0-6.0 | 3 | 16,42 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 19,4033 | XX |
| 12.0-6.0 | 3 | 22,8867 | XX |
| 10.0-5.0 | 3 | 23,8833 | XX |
| 12.0-5.0 | 3 | 27,3633 | X |
| 12.0-4.0 | 3 | 27,86 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 55,72 | X |
| 10.0-3.0 | 3 | 59,2033 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 51. Actividad antioxidante expresa en porcentaje (%) de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo. Método DPPH

| Aislados proteicos | Abs $\lambda=515\text{nm}$ | % Actividad | \bar{x} |
|--------------------|----------------------------|-------------|-----------|
| 10.0-3.0 | 0,28 | 58,21 | 59,20 |
| | 0,28 | 58,21 | |
| | 0,26 | 61,19 | |
| 10.0-4.0 | 0,28 | 58,21 | 55,72 |
| | 0,31 | 53,73 | |
| | 0,30 | 55,22 | |
| 10.0-5.0 | 0,55 | 17,91 | 23,88 |
| | 0,49 | 26,87 | |
| | 0,49 | 26,87 | |
| 10.0-6.0 | 0,57 | 14,93 | 16,42 |
| | 0,59 | 11,94 | |
| | 0,52 | 22,39 | |
| 12.0-3.0 | 0,54 | 19,40 | 19,40 |
| | 0,53 | 20,90 | |
| | 0,55 | 17,91 | |
| 12.0-4.0 | 0,50 | 25,37 | 27,86 |
| | 0,49 | 26,87 | |
| | 0,46 | 31,34 | |
| 12.0-5.0 | 0,50 | 25,37 | 27,36 |
| | 0,47 | 29,85 | |
| | 0,49 | 26,87 | |
| 12.0-6.0 | 0,51 | 23,88 | 22,89 |
| | 0,52 | 22,39 | |
| | 0,52 | 22,39 | |
| Harina | 0,46 | 31,34 | 30,35 |
| | 0,47 | 29,85 | |
| | 0,47 | 29,85 | |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Anexo F. Datos obtenidos, análisis estadístico y respuestas experimentales de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo (*Gryllus assimilis*).

Tabla 52. Datos y resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria expresa porcentaje (%) de protección de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Aislado proteicos | Ab 1 $\lambda=560\text{nm}$ | % Protección | Promedio |
|-----------------------------|---|---------------------|-----------------|
| 10.0-3.0 | 0,83 | -0,40 | 0,40 |
| | 0,81 | 2,02 | |
| | 0,83 | -0,40 | |
| 10.0-4.0 | 0,46 | 44,35 | 43,15 |
| | 0,47 | 43,15 | |
| | 0,48 | 41,94 | |
| 10.0-5.0 | 0,05 | 93,95 | 92,34 |
| | 0,07 | 91,53 | |
| | 0,07 | 91,53 | |
| 10.0-6.0 | 0,06 | 92,74 | 93,55 |
| | 0,06 | 92,74 | |
| | 0,04 | 95,16 | |
| 12.0-3.0 | 0,72 | 12,90 | 14,52 |
| | 0,70 | 15,32 | |
| | 0,70 | 15,32 | |
| 12.0-4.0 | 0,44 | 46,77 | 48,79 |
| | 0,43 | 47,98 | |
| | 0,40 | 51,61 | |
| 12.0-5.0 | 0,28 | 66,13 | 66,53 |
| | 0,28 | 66,13 | |
| | 0,27 | 67,34 | |
| 12.0-6.0 | 0,06 | 92,74 | 93,15 |
| | 0,06 | 92,74 | |
| | 0,05 | 93,95 | |
| Diclofenaco (4 mg/L) | 0,11 | 86,69 | 87,90 |
| | 0,09 | 89,11 | |
| | 0,10 | 87,90 | |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 53. Resumen estadístico para la actividad antiinflamatoria expresada porcentaje (%) de protección de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Muestras | Recuento | Promedio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación |
|-----------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|
| 10.0-3.0 | 3 | 0,406667 | 1,39719 | 343,571% |
| 10.0-4.0 | 3 | 43,1467 | 1,205 | 2,79281% |
| 10.0-5.0 | 3 | 92,3367 | 1,39719 | 1,51314% |
| 10.0-6.0 | 3 | 93,5467 | 1,39719 | 1,49357% |
| 12.0-3.0 | 3 | 14,5133 | 1,39719 | 9,62692% |
| 12.0-4.0 | 3 | 48,7867 | 2,51882 | 5,16292% |
| 12.0-5.0 | 3 | 66,5333 | 0,698594 | 1,04999% |
| 12.0-6.0 | 3 | 93,1433 | 0,698594 | 0,75002% |
| Diclofenaco sódico (4 mg/L) | 3 | 87,9 | 1,21 | 1,37656% |
| Total | 27 | 60,0348 | 34,1931 | 56,9555% |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 54. ANOVA para la actividad antiinflamatoria expresada porcentaje (%) de protección de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 30362,3 | 8 | 3795,29 | 1892,90 | 0,0000 |
| Intra grupos | 36,0903 | 18 | 2,00502 | | |
| Total (Corr.) | 30398,4 | 26 | | | |

Elaborado por: Quinteros (2021)

Tabla 54. Pruebas de Múltiple Rangos Tukey para la actividad antiinflamatoria expresada porcentaje (%) de protección de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de grillo.

| Muestras | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|-----------------------------|-------|----------|-------------------|
| 10.0-3.0 | 3 | 0,406667 | X |
| 12.0-3.0 | 3 | 14,5133 | X |
| 10.0-4.0 | 3 | 43,1467 | X |
| 12.0-4.0 | 3 | 48,7867 | X |
| 12.0-5.0 | 3 | 66,5333 | X |
| Diclofenaco sódico (4 mg/L) | 3 | 87,9 | X |
| 10.0-5.0 | 3 | 92,3367 | X |
| 12.0-6.0 | 3 | 93,1433 | X |
| 10.0-6.0 | 3 | 93,5467 | X |

Elaborado por: Quinteros (2021)