



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos
Naturales y del Ambiente
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TEMA DE LA INVESTIGACIÓN:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS
PROTEICOS DE ALBUMEN DE HUEVOS DE GALLINA,
PROCEDENTES DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA VS.
PRODUCCIÓN COMERCIAL”**

**Tesis de grado previo a la obtención del título de Médica
Veterinaria Zootecnista; otorgado por la Universidad Estatal de
Bolívar a través de Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos
Naturales y del Ambiente, Escuela de Medicina Veterinaria y
Zootecnia**

AUTORA:

Stephanie Cristina Verdezoto Tapia

DIRECTORA:

Méd. Alejandra Elizabeth Barrionuevo Mayorga

Guaranda – Ecuador

Mayo , 2019

**CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL
TRIBUNAL**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS PROTEICOS DE
ALBUMEN DE HUEVOS DE GALLINA, PROCEDENTES DE
PRODUCCIÓN ECOLÓGICA VS. PRODUCCIÓN COMERCIAL”**

REVISADO Y PROBADO POR:

.....
Méd. Alejandra Elizabeth Barrionuevo Mayorga
DIRECTORA

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN DE TESIS:**

.....
Ing. Kléver Estuardo Espinoza Mora
BIOMETRISTA

.....
MVZ. Washington Fernando Carrasco Sangache
REDACCIÓN TÉCNICA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, STEPHANIE CRISTINA VERDEZOTO TAPIA, con C.I. No. 172178577-0 declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor (es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

.....
Stephanie Cristina Verdezoto Tapia
C.I. 172178577-0

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis abuelos por haberme criado con todos sus valores y consejos, por su infinito amor, bondad, amparo y sabiduría que siempre me han brindado.

A mi madre Elizabeth quien me dio la vida, ella es y será mi ejemplo a seguir por su amor incondicional, cuidado y sacrificio constante, a mi padre Fernando; siempre me han apoyado moral y económicamente para poder culminar mis estudios universitarios y conseguir ser una profesional de la Patria.

A mi familia, a querida hermana María José; y, finalmente a todas aquellas personas que directa e indirectamente me brindaron su apoyo incondicional, amor sincero y consejos verdaderos en los momentos decisivos de mi existencia y en particular de mi carrera universitaria. Son sin lugar a duda mi referencia para el presente y para el futuro.

A todos ellos, con amor fraterno e imperecedero.

Stephanie V.

AGRADECIMIENTO

Mi gratitud a la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Medicina Veterinaria; a los Laboratorios de la Dirección de Investigación y Vinculación, al Ing. Marcelo Vilcacundo, al proyecto AGROPROBIOPEP, al Programa de Canje de Deuda Ecuador-España y a los técnicos del laboratorio, por su valioso asesoramiento, esfuerzo y dedicación. Sus inestimables conocimientos, oportuna orientación, paciencia y motivación han sido fundamentales en mi formación como investigadora. A ellos mi gratitud y admiración.

De la misma manera por sus orientaciones y saberes obtenidos a lo largo de mi vida estudiantil, a todos los profesores de la Universidad Estatal de Bolívar quienes aportaron en mi formación, de manera muy especial a la Med. Alejandra Elizabeth Barrionuevo (Directora), al Ing. Kléver Espinoza Mora (Biometrista), y al MZV. Fernando Carrasco Sangache (Redacción Técnica), notables catedráticos de la presente investigación. Su visión, motivación y optimismo me han ayudado a concluir exitosamente la presente tesis.

Y finalmente a Guaranda, a todas aquellas personas que me acogieron como parte de su familia ayudándome, cuidándome y apoyándome en este periodo de madurez y crecimiento no solo profesional sino como persona, a la Dra. Andrea López Dávalos y a su familia, y, a la Sra. Alicia Veloz.

A todos ellos, mil gracias.

Stephanie V.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pág.
PORTADA	I
CERTIFICADO DE APROBACIÓN - MIEMBROS TRIBUNAL	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN Y SUMMARY	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA	2
III. MARCO TEÓRICO	3
3.1. Sistema de producción	3
3.1.1. Producción comercial	4
3.1.1.1. Galpón	4
3.1.1.2. Ubicación	5
3.1.1.3. Jaulas	6
3.1.1.4. Alimentación	7
3.1.1.5. Agua	8
3.1.1.6. Ventajas	8
3.1.1.7. Desventajas	9
3.1.2. Producción orgánica	9
3.1.2.1. Galpón	11
3.1.2.2. Ubicación	12
3.1.2.3. Nidos	12

3.2. El huevo	13
3.2.1. Frescura del huevo	16
3.2.2. Proteínas	17
3.2.2.1. Ovoalbúmina	18
3.2.2.2. Ovomucina	19
3.2.2.3. Canalbúmina	20
3.2.2.4. Ovomucoide	21
3.2.2.5. Lisozima	21
3.2.2.6. Ovotransferrina	23
3.2.2.7. Acidina	24
3.2.2.8. Flavoproteína	24
3.2.2.9. Cistatina	25
3.3. Métodos de extracción de proteínas	26
3.3.1. Extracción proteica con diferentes tampones de lisis con o sin cordón paliza	26
3.3.2. Aislamiento de proteínas de clara de huevo	27
3.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos de proteínas ESM	27
3.4. Cuantificación proteica	27
3.4.1. Análisis elemental	28
3.5. Electroforesis	28
3.5.1. Electroforesis método NATIVE	30
3.5.2. Electroforesis método SDS – PAGE	30
3.6. Caracterización molecular	32
IV. MARCO METODOLÓGICO	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
VI. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	51
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Descripción	Pág.
Cuadro No. 1	Factores y niveles de estudio	36
Cuadro No. 2	Tratamientos	36
Cuadro No. 3	Peso inicial (PAH) de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial (gr.).	43
Cuadro No. 4	Peso final (PF) de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial (gr.).	44
Cuadro No. 5	Porcentaje de Nitrógeno (%N), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	45
Cuadro No. 6	Porcentaje de Proteína (%P), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	46
Cuadro No. 7	Porcentaje de Rendimiento (%R), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No.	Descripción	Pág.
Gráfico No. 1	Peso inicial (PAH) de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial (gr.).	43
Gráfico No. 2	Peso final (PF) de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial (gr.).	44
Gráfico No. 3	Porcentaje de Nitrógeno (%N), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	45
Gráfico No. 4	Porcentaje de Proteína (%P), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	46
Gráfico No. 5	Porcentaje de Rendimiento (%R), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.	47
Gráfico No. 6	Gel electroforético SDS-PAGE de albumen de huevo procedentes de Producción Ecológica, vs. Producción Comercial.	48
Gráfico No. 7	Gel electroforético SDS-PAGE de albumen de huevo procedentes de Producción Ecológica, vs. Producción Comercial.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Descripción	Pág.
Figura No. 1	Producción comercial de gallinas ponedoras.	4
Figura No. 2	Galpón para gallinas ponedoras.	5
Figura No. 3	Ubicación correcta del galpón de producción comercial de huevos.	6
Figura No. 4	Jaulas tecnificadas de un galpón para gallinas ponedoras.	7
Figura No. 5	Producción orgánica de gallinas ponedoras.	11
Figura No. 6	Galpón para gallinas ponedoras.	11
Figura No. 7	Ubicación correcta del galpón de producción orgánica de huevos.	12
Figura No. 8	Galpón y nidos para gallinas ponedoras de huevos orgánicos.	13
Figura No. 9	Estructura del huevo de gallina.	14
Figura No. 10	Composición química del huevo.	15
Figura No. 11	Prueba para determinar la frescura del huevo.	17
Figura No. 12	Estructura tridimensional de la Ovoalbúmina.	19
Figura No. 13	Estructura tridimensional de la Ovomucina.	20
Figura No. 14	Estructura tridimensional de la Canalbúmina.	20
Figura No. 15	Estructura tridimensional de la proteína Ovomucoide.	21
Figura No. 16	Estructura tridimensional de la Lisozima.	23
Figura No. 17	Estructura tridimensional de la Ovotransferina.	23
Figura No. 18	Estructura tridimensional de la Acidina.	24
Figura No. 19	Estructura tridimensional de la Flavoproteína.	25
Figura No. 20	Estructura tridimensional de la Cistatina.	25
Figura No. 21	Electroforesis.	29
Figura No. 22	Electroforesis Sds – Page.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo No.	Descripción	Pág.
Anexo No. 1	Tabla de los pesos iniciales de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.	60
Anexo No. 2	Tabla de los pesos finales de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.	60
Anexo No. 3	Porcentaje de Nitrógeno obtenido del analizador elemental de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.	61
Anexo No. 4	Obtención del Porcentaje de Proteína (%P) de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.	62
Anexo No. 5	Obtención del Porcentaje de Rendimiento (%R) de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.	62
Anexo No. 6	Obtención de datos de las proteínas del gel SDS-PAGE tabulados.	62
Anexo No. 7	Fotografías del trabajo de campo en el laboratorio.	63
Anexo No. 8	Glosario de términos.	68

RESUMEN

La industria avícola ha centrado su interés en el huevo y su calidad alimenticia en la dieta humana porque desde hace décadas se ha comprobado que es posible enriquecer la composición del mismo en nutrientes y compuestos específicos mediante la manipulación de la dieta y formas de crianza de las gallinas ponedoras, derivándose así en producciones ecológicas y producciones comerciales. La presente investigación científica planteó como objetivo general: “Caracterizar molecularmente aislados proteicos de albumen de huevos de gallina, procedentes de producción ecológica vs. producción comercial”; y como objetivos específicos: 1) Estandarizar la metodología de extracción de proteína de huevos de gallina; 2) Determinar el contenido proteico de las muestras; 3) Caracterizar mediante la técnica de electroforesis; y, 4) Establecer diferencias y relaciones entre las diferentes muestras de acuerdo con su proceso de obtención o tipo de producción. La formulación del problema fue: ¿La caracterización molecular de aislados proteicos de albumen de huevos de gallina, procedentes de producción ecológica vs. producción comercial nos permitirá encontrar diferencias y parámetros de calidad que incidan en la nutrición y el equilibrio medioambiental?. Se aplicó un diseño experimental AxB, la investigación se centró en una estadística descriptiva ADEBA (Statgraphics). Los resultados obtenidos fueron analizados e interpretados, concluyéndose que no existen diferencias significativas en el contenido proteico entre los huevos de producción comercial y los de producción ecológica.

Palabras clave: caracterización, molecular, aislados, proteicos, ecológica, comercial.

SUMMARY

The poultry industry has focused its interest on the egg and its nutritional quality in the human diet because for decades it has been proven that it is possible to enrich the composition of the same in specific nutrients and compounds through the manipulation of the diet and ways of raising the laying hens, thus deriving in ecological productions and commercial productions. The present scientific research proposed as a general objective: "Characterize molecularly protein isolates of albumen from chicken eggs, coming from ecological production. commercial production"; and as specific objectives: 1) Standardize the protein extraction methodology of chicken eggs; 2) Determine the protein content of the samples; 3) Characterize using the electrophoresis technique; and, 4) Establish differences and relationships between the different samples according to their process of obtaining or type of production. The formulation of the problem was: ¿The molecular characterization of protein isolates of albumen from chicken eggs, coming from ecological production vs. commercial production will allow us to find differences and quality parameters that affect nutrition and environmental balance? An experimental AxB design was applied, the research focused on a descriptive statistics ADEBA (Statgraphics). The results obtained were analyzed and interpreted, concluding that there are no significant differences in the protein content between the eggs of commercial production and those of organic production.

Key words: characterization, molecular, isolated, proteic, ecological, commercial

I. INTRODUCCIÓN

La avicultura a nivel mundial y nacional, gracias a los avances en genética, nutrición y manejo de animales, presenta en la actualidad un crecimiento rápido, mejorando la oferta y facilitando el acceso al consumo del huevo como uno de los alimentos más completos en la alimentación humana. (Sena, 2013).

Biológicamente el huevo o cigoto es la célula resultante de la unión del gameto masculino con el femenino en la reproducción sexual de los animales como también de las plantas y tiene como finalidad la perpetuación de la especie.

El huevo ha sido y es un producto de consumo masivo debido a su alto valor nutritivo y bajo coste relativo, por ello en el Ecuador ha subido su consumo per cápita y registra un consumo de entre 160 y 165 unidades anuales, mientras que antes no superaba los 130, pero esta cifra sigue siendo baja con relación al promedio de otros países. (Telégrafo, 2017).

La industria avícola ha centrado su interés en el huevo y su calidad alimenticia en la dieta humana, porque hace décadas se ha comprobado que es posible enriquecer la composición del mismo en nutrientes y compuestos específicos mediante la manipulación de la dieta y formas de crianza de las gallinas ponedoras, derivándose así en producciones ecológicas y producciones comerciales. (Divyendu Singh 2014).

La producción de huevos se ha convertido en una actividad productiva y económica que se desarrolla en prácticamente todos los países del mundo. Su importancia es enorme también en la medida que el crecimiento de la población en la zona y su desarrollo económico va acompañado de un mayor consumo de alimentos de origen animal. (Barroeta 2014).

II. PROBLEMA

Existen controversias en cuanto a los problemas presentados en las explotaciones con criterio ecológico y comercial, una de ellas es el control sanitario (plagas, enfermedades y depredadores) de las gallinas criadas en libertad y de las criadas en forma convencional de tipo comercial.

Se considera que un animal enfermo o estresado por la presencia de depredadores también es un animal que sufre, por otro lado, las explotaciones comerciales libres del peligro de los depredadores tienen otro tipo de problemas ya que, su estrés está dado por el manejo intensivo y las condiciones que se requieren para lograr altos rendimientos en su producción.

A nivel mundial, se está dando prioridad a la producción orgánica y la avicultura no es la excepción, sin embargo; no existe contundencia en la información científica respecto al contenido nutricional de las explotaciones ecológicas y/u orgánicas vs. las explotaciones convencionales y/o comerciales. Bajo estas consideraciones, no está claro cuál de los dos tipos de explotaciones planteadas en esta investigación es más conveniente en cuanto al nivel nutricional para el consumo humano y el cuidado al medioambiente, de ahí la necesidad de realizar investigaciones a nivel molecular que puedan arrojar resultados de tipo científico y que permitan establecer diferencias.

En el Ecuador las prácticas de producción animal ecológicas están en sus primeros pasos, por lo que es necesario establecer ventajas sobre las explotaciones convencionales o comerciales.

Con los argumentos anteriormente expuestos se formula el problema: ¿La caracterización molecular de aislados proteicos de albumen de huevos de gallina, procedentes de producción ecológica vs. producción comercial nos permitirá encontrar diferencias y parámetros de calidad que incidan en la nutrición y el equilibrio medioambiental?

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Sistemas de producción

Son objetos unidos que interactúan interdependientemente de forma constante, pueden cambiar de componentes materiales; el modelo sistémico de organización identifica a los componentes de la empresa. El enfoque funcional para la administración de la producción está basado en tres procesos: 1) Planeación: actividades que generan un curso de acción; 2) Organización: actividades que originan una estructuración de tareas y niveles de responsabilidad; y, 3) Control: actividades que permiten asegurarse que el desempeño global de la empresa ocurra de acuerdo a lo planeado. (Adam & Ebert, 1991).

“Los sistemas de producción comprenden la descripción de proyectos, diseños de procesos y la administración del abastecimiento” (Ballard, 2001).

Estos sistemas de producción destacan el papel de los recursos humanos en los que es necesaria la relación entre los trabajadores para que mejoren los procesos de competitividad (Cárdenas, Bley, Hernández, & Raposo, 2010).

En lo que respecta a los sistemas productivos de crianza de gallinas ponedoras, el área disponible y los recursos requeridos en la instalación y desarrollo del proceso productivo se desarrollan en tres sistemas: a) Extensivos o tradicionales (pastoreo o gallinas de traspatio destinadas al autoconsumo); b) Semi-intensivos (cuentan con galpones rústicos de bajo costo, áreas amplias y seguras para el pastoreo de las aves destinadas la comercialización); y, c) Intensivos o de confinamiento (galpones tecnificados para la mayor producción y comercialización, requieren grandes inversiones que suministren todos los servicios de alojamiento, disponibilidad de agua y alimento). (Sena, 2013).

3.1.1. Producción comercial

En este sistema las aves permanecen encerradas durante toda su vida productiva sin salir del galpón o albergue, dispone de todos los servicios de alojamiento, disponibilidad de agua y alimento; es utilizado a nivel comercial en grandes avícolas industriales ya sea en piso o en jaulas. (Moreno, 2001).

Figura No. 1. Producción comercial de gallinas ponedoras.



Fuente: (Perdomo 2013).

Un gallinero destinado a la producción de huevos, puede tener las siguientes características:

3.1.1.1. Galpón

Es una infraestructura apropiada y acondicionada técnicamente para albergar aves de corral, proporciona todas las condiciones ambientales óptimas y por consiguiente permite el desarrollo de animal con todo su potencial genético a la vez que obtiene un producto de excelente calidad a un mínimo costo posible. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

“La superficie cubierta del gallinero debe estar en relación con la cantidad de aves que se pretenda alojar; se recomienda una densidad de 5 aves/m² o/y 6-7 aves/m². Los costados de menor longitud, pueden ser totalmente cerrados, en cambio el frente y el fondo del galpón deben ser abiertos, utilizándose tejido y cortina de arpillera plástica como barrera de protección” (Quispe, 2018).

Figura No. 2. Galpón para gallinas ponedoras.



Fuente: (Czarick 2017)

3.1.1.2. Ubicación

En las explotaciones o producciones comerciales de aves, se debe de tomar en cuenta las siguientes recomendaciones de ubicación de galpones:

- La nave o galpón no es aconsejable ubicarlo sobre una cima porque está demasiado expuesto a los rayos solares y el viento.

- La ventilación del galpón ubicado sobre una depresión es difícil y su drenaje es deficiente.
- Es aconsejable que el galpón esté ubicado sobre un terreno ligeramente inclinado ya que ésta pendiente actúa como una barrera contra el sol y el viento y sobre todo habilita una buena ventilación y suministro de agua.
- Es aconsejable que el galpón o nave se lo ubique sobre un terreno plano cuando exista una barrera natural que amortigüe el viento, sin impedir la circulación del aire a su interior.

Las condiciones de bienestar de las aves están fundamentadas en tres aspectos básicos que son: la temperatura, humedad y ventilación. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

Figura No. 3. Ubicación correcta del galpón de producción comercial de huevos.



Fuente: (Matos 2010)

3.1.1.3. Jaulas

Las Jaulas son infraestructuras apropiadas técnicamente que albergan a las aves de corral de cualquier propósito. Las jaulas colectivas están acondicionadas

bajo un espacio que pueden mantener de 6 a 12 gallinas. Las jaulas más recomendables son las individuales con capacidad para 1 a 2 aves. Las medidas de las jaulas para un animal, son 35 cm de alto por 40 cm de fondo y 30 cm de frente. “Las jaulas se disponen en dos filas paralelas, para facilitar la instalación de los comederos por el frente, así como la bandeja recolectora de huevos con una pequeña inclinación para que el huevo ruede con facilidad; los bebederos se localizan en la parte anterior en medio de las dos filas de jaulas”. (Sena, 2013).

El alojamiento en la producción de altas densidades técnicas intensivas requiere un mayor esfuerzo económico del productor para poder abastecer de alojamiento, agua, alimento y otras condiciones que permitan un óptimo desempeño productivo de las aves. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

Figura No. 4. Jaulas tecnificadas de un galpón para gallinas ponedoras.



Fuente: (Barroeta 2014) (Unifeed 2015)

3.1.1.4. Alimentación

Durante la cría es conveniente que las pollitas se alimenten con raciones balanceadas y dosificadas de todos los nutrientes requeridos para formar buenos aparatos reproductores de las futuras gallinas ponedoras. Se calcula que para esta etapa exista un consumo de 2 kg/animal. Las gallinas consumen entre 100 – 130 gr. de alimento por día, de los cuales necesita destinar un mínimo de 16 gr. de

proteína para producir 1 huevo. El alimento debe ofrecerse a discreción; el consumo por gallina por día varía según el tipo de ave, época del año y tipo de alimento. (Quispe, 2018).

3.1.1.5. Agua

El ave emplea el agua para satisfacer sus necesidades nutricionales, de producción y rendimiento; el consumo de agua puede variar dependiendo de varios factores: calidad del alimento, temperatura ambiental, porcentaje de producción, y estado sanitario del ave. Se debe evaluar continuamente el consumo de agua para aplicar correctivos. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

3.1.1.6. Ventajas

Las ventajas de la producción comercial son:

- Mayor producción y mejor aprovechamiento del alimento.
- Mayor y mejor control de enfermedades.
- Mayor número de animales por m², con mayor facilidad y eficiencia en el manejo.
- Mayor seguridad para animales contra depredadores y ladrones.
- Permite al productor observar más de cerca las aves, pudiendo detectar a tiempo cualquier irregularidad.
- Permite especializar la producción (huevos/carne).
- Permite un control absoluto de la producción.

Todas estas ventajas mencionadas son factores importantes que se deben tomar en cuenta para posibles créditos futuros de reinversión. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

3.1.1.7. Desventajas

Las desventajas de la producción comercial son:

- Requiere mayor inversión de capital por parte del productor para proveer alimento, agua, alojamiento, luz y ventilación.
- La acumulación de la gallinaza en el área donde las aves están confinadas se constituye en un reto para la salud de éstas, pues generalmente es portadora de gérmenes infecciosos y parásitos.
- Requiere un mercado asegurado.

Es importante manifestar que en la producción comercial de gallinas de diferente propósito se necesita una buena capacitación para su administración y manejo. (Quispe, 2018).

3.1.2. Producción orgánica

“Algunas organizaciones animalistas –como Igualdad Animal en España o L214 en Francia– llevan a cabo campañas en contra de los huevos de gallinas enjauladas, tanto en las redes como con piquetes delante de los establecimientos de las principales cadenas de distribución. Estas acciones hacen hincapié tanto en la crueldad de este sistema de producción como en la supuesta inferior calidad de los huevos procedentes de estas gallinas. Otras, como la Asociación para la Defensa de los Animales (ANDA), han optado por llegar a acuerdos de forma discreta con los puntos de venta y hacer campañas en las que explican qué quiere decir cada uno de los códigos y qué representa cada sistema de producción”. (Renter & Jurgens, 2017).

Los factores que influyen en la calidad del huevo están articulados con la genética y la salud de la gallina, los nutrientes de la dieta y el medio ambiente. Los efectos condicionales en la calidad del huevo son válidos para todos los sistemas de producción; sin embargo, en la producción orgánica es obligatorio que

las gallinas tengan acceso a material forrajero como parte de su dieta diaria. («mercado-prod-gourmet-dinamarca-icex.pdf», 2018).

En la producción de huevos orgánicos las gallinas deben pastorearse o tener acceso a material de forraje. En los climas templados, los pastos, hierbas y legumbres se pueden cultivar para el consumo de las gallinas, mientras que el material forrajero puede ser suministrado como ensilado o seco. Los pastos y hierbas consumidos por la gallina ponedora actúan en la calidad del huevo. (Hammershoj & Johansen, 2016).

En la producción de huevos ecológicos, "el forraje fresco, seco o ensilado deben suministrarse en la ración diaria para las gallinas" y "las aves de corral deben criarse en condiciones de campo abierto con acceso libre", el área de gallinero debe ser de al menos 4 m² por gallina. Está demostrado que el racionamiento de forraje afecta de manera positiva al comportamiento de gallinas ponedoras y puede proporcionar a la gallina nutrientes más allá de los que se dan en la alimentación formulada. (González, 2017).

Las gallinas que están sueltas a campo abierto, son pequeñas explotaciones utilizadas para el autoconsumo, tienen un sistema de incubación natural y su alimentación es precaria ya que se alimentan con lo que encuentran libremente en el campo, se le conoce como gallinas sueltas. Durante el día ellas recorren toda la parcela, casa, jardín, corredores, huerta casera etc., ocasionando daños, suciedad y posibilitando que los huevos puestos se pierdan o sean consumidos por otros animales (Moreno, 2001).

Figura No. 5. Producción orgánica de gallinas ponedoras.

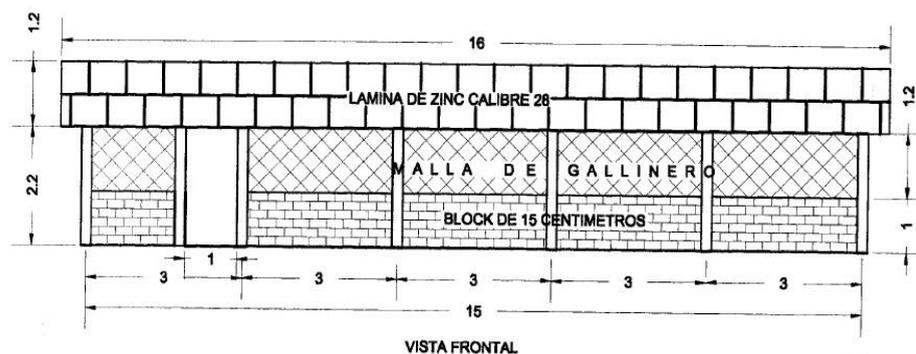


Fuente: Echeverría, 2015.

3.1.2.1. Galpón

Se puede hacer la cría y levante de gallinas ponedoras en galpones convencionales, con pisos de cemento o de tierra, lo cual aumenta la posibilidad de elevar la cantidad de aves por metro cuadrado y disminuir el riesgo de enfermedades como la coccidiosis y otros parásitos. (Universidad Industrial de Santander, 2013).

Figura No. 6. Galpón para gallinas ponedoras.

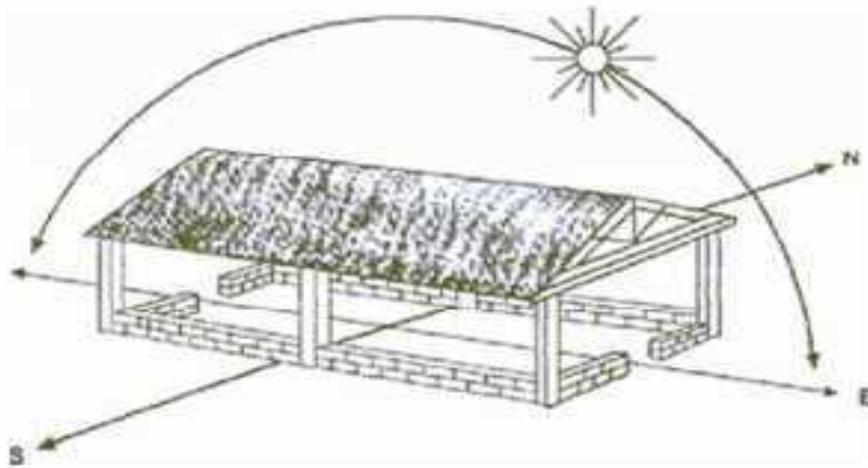


Fuente: (Unifeed 2015)

3.1.2.2. Ubicación

En producciones limitadas se pueden abastecer de áreas pequeñas para su pastoreo; en ellas las aves no solo disfrutan de un ambiente más natural, sino que fundamentalmente su alimentación la obtienen del forraje e insectos que logren capturar. («OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022», 2013).

Figura No. 7. Ubicación correcta del galpón de producción orgánica de huevos.



Fuente: Universidad Industrial de Santander, 2013.

3.1.2.3. Nidos

En los nidos individuales conviene que el ancho sea no menor de 30 cm, por 30 cm. de profundidad y 30 cm de alto, de esta manera las gallinas se sentirán en lugares confortables para su postura. Un nido individual es suficiente para cuatro a cinco gallinas en postura. («Manejo de nidos mecánicos para reproductoras», 2015)

Figura No. 8. Galpón y nidos para gallinas ponedoras de huevos orgánicos.

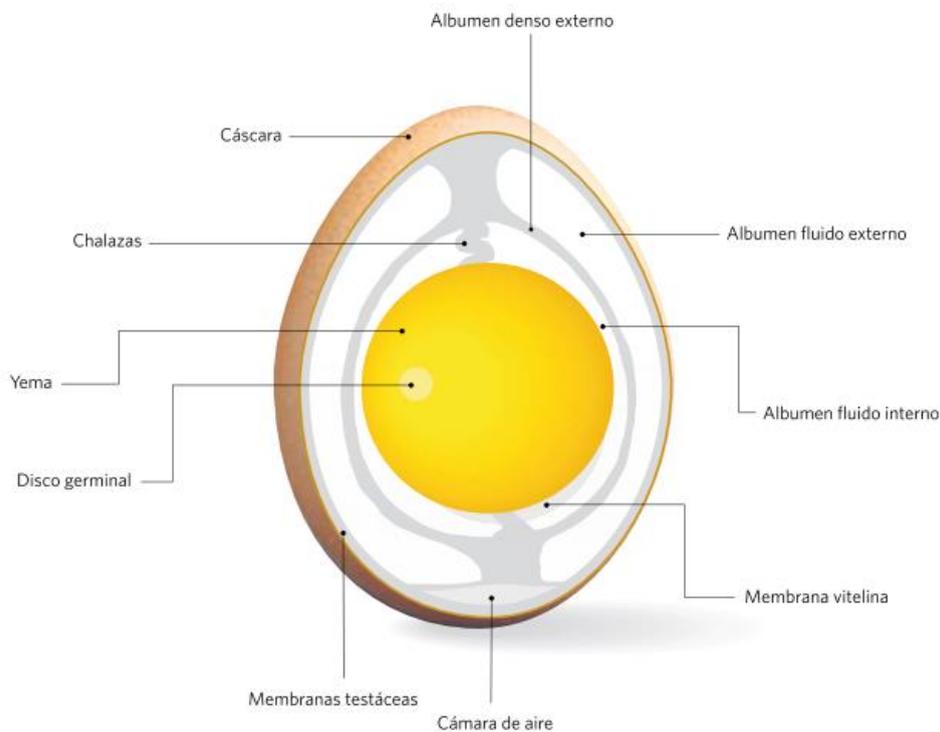


Fuente: (Barroeta 2014)

3.2. El huevo

El huevo está envuelto por una cáscara lisa de color blanco, amarillo o marrón, se encuentra revestida interiormente por dos membranas que forman una envoltura que se separan en el polo obtuso y constituyen la cámara de aire. La clara es un fluido acuoso ligeramente amarillento envuelto por tres capas de diferente viscosidad (clara, fluida y densa). Envuelta por la clara se encuentra en el interior del huevo la yema, de forma esferoidal que se fija mediante dos cordones retorcidos en espiral sobre sí mismos denominados chalazas. En la parte superior de la yema se encuentra el disco germinal denominado galladura o mácula (mancha blanquecina). (Domínguez, 2012)

Figura No. 9. Estructura del huevo de gallina.



Fuente: (Sandoval, Soriano, & Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

Sin lugar a dudas el huevo es uno de los alimentos más equilibrados en la dieta humana ya que es una proteína de muy alta calidad que contiene aminoácidos esenciales en proporciones similares a los requerimientos humanos, aporta una amplia gama de vitaminas, 65 % de grasas insaturadas y 35% de grasas saturadas. (Pintado, 2016).

El huevo es un ingrediente básico en la alimentación, contiene nutrientes tales como: proteínas, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales que nuestro organismo no puede fabricar y que por lo tanto deben ser aportados en la dieta diaria; es también fuente de otros componentes importantes para una buena salud y actúa previniendo algunas enfermedades crónicas. Su alta concentración en nutrientes y su bajo aporte calórico hacen que este alimento sea indispensable para cubrir las necesidades nutritivas específicas de ancianos, adolescentes,

gestantes, personas que realizan dietas hipocalóricas y vegetarianos. (huevoelmajadal, 2012).

El huevo está constituido por: la yema (30% de su peso), la clara (60%) y su cáscara (10%). Los componentes nutricionales están heterogéneamente repartidos. La grasa, el colesterol y algunos micronutrientes se encuentran en la yema. La clara, sin embargo, está formada principalmente por agua (88%) y proteínas (11%), siendo la ovoalbúmina la más importante; el contenido de algunos minerales y vitaminas hidrosolubles es también comparativamente mayor en la yema. (Azcona, 2006a)

Figura No. 10. Composición química del huevo.

Componentes	Unid.	Huevo (100g)	1 Huevo (50 g)
Energía	Kcal	143	72
Agua	g	76,2	38,1
Proteína	g	12,6	6,3
Grasa	g	9,5	4,8
Carbohidratos	g	0,7	0,4
GS	g	3,1	1,6
GMI	g	3,7	1,8
GPI	g	1,9	1,0
Colesterol	mg	372	186
Vitaminas	A, D, B2, Biotina, B12		
Minerales	Selenio, Yodo, Hierro y Zinc		
Fitoquímicos	Carotenoides en yema (Luteína y Zeaxantina)		

Fuente: (Araneda, 2018)

Los huevos son cuerpos albuminoideos que disponen de todos los aminoácidos importantes para la nutrición de organismos animales. La yema de huevo contiene de 10 a 12% de lecitina la misma que es materia importante para la

sustancia cerebral y nerviosa (para el trabajo intelectual), no existe otro alimento que dispone de ella en tanta proporción como el huevo. La yema de huevo es rica en vitamina A y D cuyas propiedades fisiológicas se pueden aprovechar cómoda y completamente.

“Dos huevos aportan 141 kcal. aproximadamente, lo que supone un 7% de la energía diaria recomendada para un adulto, que necesita 2.000 kcal. El huevo no contiene hidratos de carbono, por lo que la energía procede fundamentalmente de su materia grasa. La calidad de la grasa presente en el huevo es buena pues el contenido de AGM -ácidos grasos monoinsaturados- (3,6%) y AGP -ácidos grasos poliinsaturados- (1,6%) supera ampliamente al de grasa saturada -AGS- (2,8%). Contiene también omega-3, como EPA -ácido eicosapentaenoico- y DHA -ácido docosahexaenoico- que han demostrado efectos beneficiosos sobre la salud. El huevo es fuente apreciable de vitamina A (100 g de parte comestible aportan un 28,4% de la Cantidad Diaria Recomendada), vitamina D (36%), vitamina E (15,8%), riboflavina (26,4%), niacina (20,6%), ácido fólico (25,6%), vitamina B12 (84%), biotina (40%), ácido pantoténico (30%), fósforo (30,9%), hierro (15,7%), cinc (20%) y selenio (18,2%), ello hace del huevo un alimento nutricionalmente denso: rico en componentes nutritivos y con muy pocas calorías” (Azcona, 2006b).

Los huevos contienen numerosos minerales (Se, K, P, I, Zn, Cu, Mn, F) y vitaminas (B1, B2, B12, niacina, biotina, colina, ácido pantoténico, A, E, K, D). No es frecuente encontrar en la dieta alimentos con esta densidad de micronutrientes. Son fuente de hierro y cinc de alta biodisponibilidad que contribuyen a la prevención de la anemia. (Azcona, 2006b).

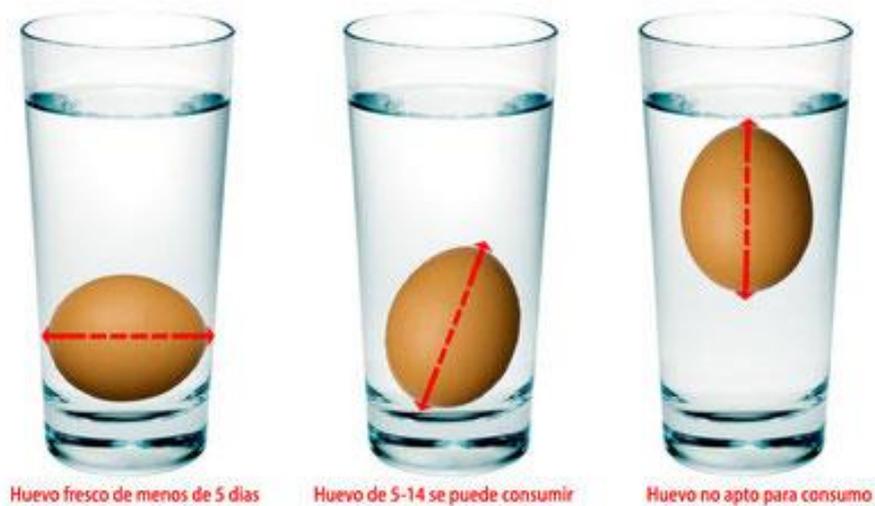
3.2.1. Frescura del huevo

“Para determinar si un huevo es fresco o no, existen varios métodos, de los cuales el más utilizado es la ovoscopia o método diafanoscópico que se basa en la translucidez de la cáscara y en las diferencias de transmisión lumínica que

presentan las estructuras internas del huevo, modificadas más o menos según las alteraciones. El huevo debe colocarse ante el foco luminoso en posición vertical. El interior del huevo queda completamente iluminado y la cáscara muestra su estructura porosa, estando influenciada la observación por el color de la cáscara. El huevo fresco aparece en el ovoscopio de color amarillo rosado claro” (Pintado, 2016).

La consistencia del albumen va decreciendo inexorablemente con el paso del tiempo tras la ovoposición, debido a un incremento del pH, que conlleva la degradación de la unión de las proteínas ovomucina y lisozima, que hacen que el albumen se haga cada vez más fluido, la calidad del albumen decrece con la edad de las aves y la aparición de ciertas enfermedades como la bronquitis infecciosa o la Newcastle. (Pintado, 2016).

Figura No. 11. Prueba para determinar la frescura del huevo.



Fuente: («Frescura del huevo - Google», 2018)

3.2.2. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas complejas que pueden llegar a constituir más del 50% del peso seco de las células. La masa molecular de las proteínas varía

de unos 5000 a varios millones de Daltons y están constituidas de carbono (C), hidrogeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y algunas veces por azufre (S). A partir de ellas se regulan la mayoría de procesos metabólicos y fisiológicos de las células. (Cruz, 2007).

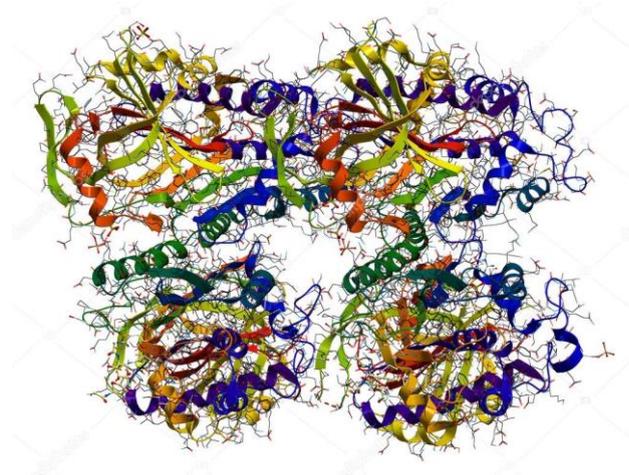
La albúmina del huevo contiene una alta proporción de agua (87,9%) la misma que se encuentra asociada en proporciones variables a las proteínas que constituyen un 10,6%. Además encontramos otras proteínas tales como: la ovoalbúmina (54%), la ovotransferrina (conalbúmina) (13%), el ovomucoide (11%), la lisozima (3,5%), la ovomucina (3,0%), las ovoglobulinas (2%), la ovoflavoproteína (0,8%), la ovostatina (ovomacroglobulina) (0,5%), la cystatina (0,05%), y la acidina (0,05%). La albúmina no tiene estructuras homogéneas ya que se dividen en cuatro láminas concéntricas principales. (Arias & Fernández, 2018).

3.2.2.1. Ovoalbúmina

“La OVA es una fosfoglicoproteína de una masa molecular de 45 kDa., es la proteína más abundante de la clara de huevo y cuenta con un 54% de contenido proteico. La secuencia completa de 385 aminoácidos ha sido descrita (McReynolds y col., 1978; Nisbet y col., 1981) y su estructura tridimensional ha sido estudiada por cristalografía de rayos X, observándose tres láminas β y nueve hélices α (Stein y col., 1990). La OVA contiene una unidad de carbohidratos, puede presentar hasta dos residuos de fosfoserina, un puente disulfuro y cuatro grupos sulfidriilo, tres de los cuales son poco reactivos en la forma nativa, mientras que el cuarto es altamente reactivo cuando la proteína se desnaturaliza. La mitad de los residuos de aminoácidos de la OVA son hidrofóbicos y un tercio presenta residuos cargados, la mayoría ácidos, confiriéndole a la proteína un pH de 4.5 y una temperatura de desnaturalización de 84°C (Li-Chan y Nakai, 1989)” (Jiménez, 2012).

La OVA muestra en su estructura molecular una similitud con la superfamilia de las serinas (serinas inhibidoras de proteasas), se encuentran presentes en todos los organismos eucariotas, con actividad inhibidora de proteasas y como fuente importante de aminoácidos. (Jiménez, 2012).

Figura No. 12. Estructura tridimensional de la Ovoalbúmina.



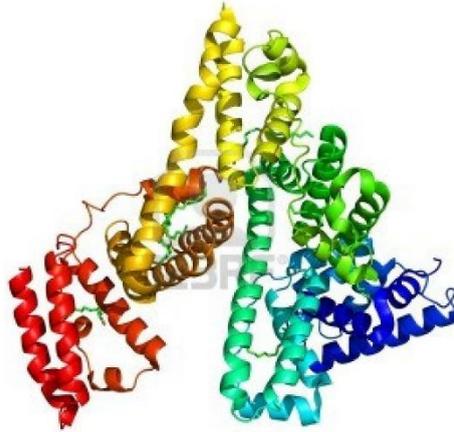
Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.2. Ovomucina

Esta proteína “es una flucoproteína que contribuye a la viscosidad de la clara. Forma con la lizosima un complejo insoluble en medio acuoso dependiendo del pH. Este complejo es responsable de la estructura gelificada de la capa espesa del albumen. La disociación de este complejo actúa durante el almacenamiento de los huevos, a medida que el pH se eleva, y es responsable de la licuefacción del albumen. Es estable al calor. La ovomucina es un inhibidor de la hemoaglutinación vírica”. (Gil, 2010).

La ovomucina comprende un 3.5% de la proteína de la clara y está fuertemente glucosilada con un contenido de carbohidratos de hasta el 33%. Su estructura molecular es muy larga, su peso molecular oscila entre 1800 y 1839 kDa. Contiene una cantidad substancial de grupos disulfuro, éteres de sulfato, grandes cantidades de cistina y el 50% del contenido ácido siálico presente en la clara. (Karp, 2018).

Figura No. 13. Estructura tridimensional de la Ovomucina.



Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.3. Canalbúmina

Es no fosforilada, forma una cadena poli-peptídica; tiene un peso molecular de 78 kDa., contiene restos de masas y glucosamina. Estas proteínas tienen gran poder quelante de metales divalentes y trivalentes. La capacidad secuestrante del hierro le confiere propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Es sensible a la desnaturalización térmica entre (57 y 65°C). (Domínguez, 2012).

Figura No. 14. Estructura tridimensional de la Canalbúmina.

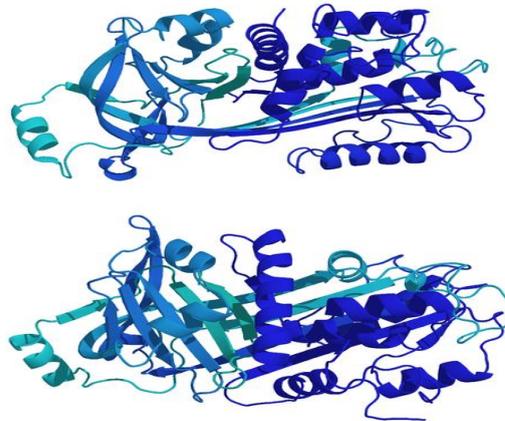


Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.4. Ovomucoide

“El OM tiene una masa molecular de 28 kDa. y un pH de 4.82. Representa el 11% de las proteínas de la clara de huevo. Se encuentra altamente glicosilado, conteniendo un 20-25% de fracciones de carbohidratos. El OM comprende 186 aminoácidos organizados en tres dominios estructuralmente independientes (Gal d1.1, 1.2 y 1.3), y posee 9 puentes disulfuro intermoleculares. El OM presenta capacidad de reducir la actividad de algunas enzimas digestivas, como la tripsina y quimotripsina (Konishi y col., 1985), así como un gran potencial alergénico. El dominio Gal d 1.3 es considerado como la fracción inmuno-dominante del OM en humanos alérgicos a huevo ya que mostró mayor actividad de unión a IgE e IgG que los dominios I y II (Zhang y Mine, 1998). Las propiedades alergénicas del OM se han descrito extensamente y los epítomos de células B y T han sido identificados tanto en pacientes alérgicos a huevo como en ratones”. (Jiménez, 2012).

Figura No. 15. Estructura tridimensional de la proteína Ovomucoide.



Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.5. Lisozima

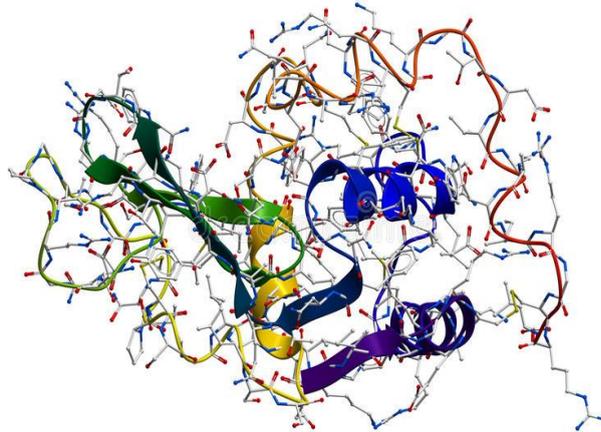
La lisozima (E.C.3.2.17, N-acetil-muramic-hidrolasa) es una proteína básica globular de alta actividad enzimática, fue descubierta por primera vez en la mucosa nasal por Alexander Fleming, quien le dio su denominación por la actividad lítica

hacia cocos bacterianos. La albúmina de huevo tiene una gran cantidad de lisozima, representa el 3.5% del contenido de proteína de clara de huevo. La lisozima consiste en 129 aminoácidos y una molécula que pesa 14,3 kDa. Esta enzima actúa lisando las paredes celulares de ciertas Bacterias Gram-positivas tales como bacterias del ácido láctico y *Clostridium* spp. dividiendo los enlaces $\beta(1-4)$ entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas. (Carrillo, 2013).

Esta proteína juega un papel muy importante en los modelos enzimáticos, y en muchos aspectos de la biología moderna, incluyendo la química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), inmunología y plegamiento de proteínas. La presencia de esta proteína en los humanos sirve de defensa ante las infecciones, actividad antibacteriana y otras actividades biológicas (antiviral, antioxidante, antiheparínica, antifúngica, fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos). (Carrillo, 2013).

“La lisozima es una enzima de origen natural que puede convertirse en una alternativa al uso de los antibióticos en la dieta. La lisozima se define como 1,4- β -N-acetilmuramidasa. Se encuentra en diversos fluidos corporales y secreciones externas del cuerpo como lágrimas, saliva, jugos gástricos, etc. (Sahoo *et al.*, 2012; Gong, 2014). La lisozima tiene diversas funciones siendo unas de las principales su acción antiinflamatoria, inmunológica y antibacteriana (Sahoo *et al.*, 2012). Como antiinflamatorio, se ha demostrado que la lisozima inhibe la quimiotaxis de los leucocitos activados. Asimismo, tiene interacción con el Sistema del Complemento (Cp) de manera indirecta, por una inhibición de la respuesta de los PMN hacia quimiotaxinas derivado del Complemento. También es capaz de modular directamente toda la activación de la reacción de la cascada del Cp y amortiguar varias respuestas de neutrófilos a los estimulantes inflamatorios”. (Sánchez, 2018).

Figura No. 16. Estructura tridimensional de la Lisozima.

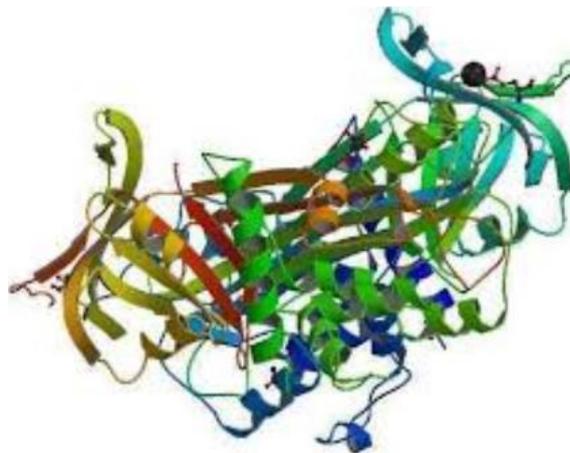


Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.6. Ovotransferrina

La ovotransferrina conforma entre el 12 y el 13 % de las proteínas de la clara con una masa molecular relativa de 77 kDa.; la proteína presenta un bajo contenido de carbohidratos (2.6%) y p/ de 6.0. y está considerada como un alérgeno menor en cuanto a su frecuencia de sensibilización comparada con los alérgenos principales del huevo (StaffNP, 2010).

Figura No. 17. Estructura tridimensional de la Ovotransferina.

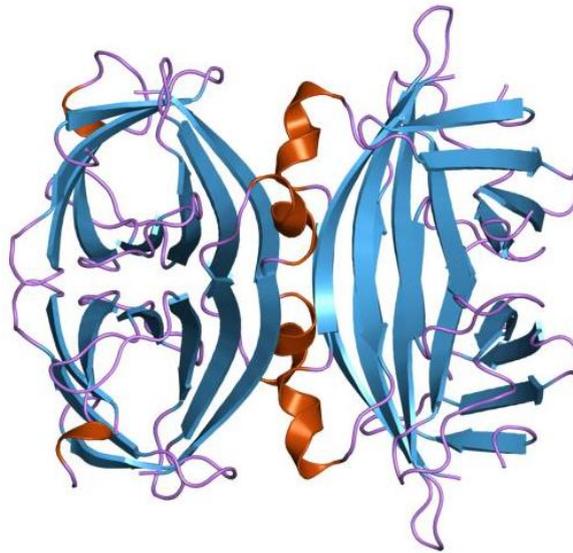


Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.7. Acidina

Es una glucoproteína en forma tetrámera, con cuatro subunidades idénticas, en cada una de las cuales se fija una molécula de biotina, se la utiliza en la detección de tumores cancerígenos y como agente precursor de tratamientos oncológicos. Presenta una alta estabilidad térmica ante las enzimas proteolíticas. (Domínguez, 2012).

Figura No. 18. Estructura tridimensional de la Acidina.

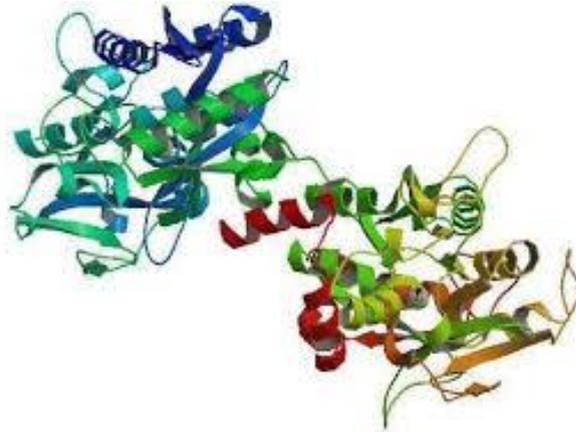


Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.8. Flavoproteína

Las flavoproteínas cooperan en algunos procesos biológicos actuando como enzimas, se caracterizan por poseer un nucleótido derivado de la vitamina B2, como flavín-adenín-dinucleótido (FAD) o flavín- mononucleótido (FMN) conocido también como riboflavina-5'-monofosfato. (Pomilio, Ollivier, Oscar, & Vitale, 2013).

Figura No. 19. Estructura tridimensional de la Flavoproteína.

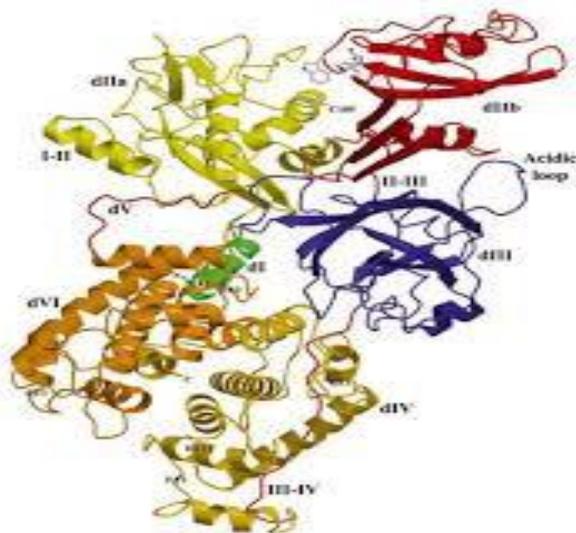


Fuente: (Andronov s.f.)

3.2.2.9. Cistatina

Esta proteína C de peso molecular 13kDa., no es glicosilada aunque es producida por todas las células nucleadas. Su bajo peso molecular y alto punto isoeléctrico permite a esta proteína ser filtrada libremente y reabsorbida en el túbulo renal. (Universidad Nacional de Quilmes, 2010).

Figura No. 20. Estructura tridimensional de la Cistatina.



Fuente: (Andronov s.f.)

3.3. Métodos de extracción de proteínas

En el caso de órganos u otros tejidos animales, es necesario disgregarlos antes de proceder a la lisis celular, ya que las células se encuentran rodeadas de tejido conectivo. En general estas técnicas involucran la utilización de enzimas (como por ejemplo colagenasa) y/o una ruptura mecánica grosera. Se pueden utilizar: morteros, homogeneizadores eléctricos, tijeras o tamices metálicos (mesh), entre otros. Cuando el material es un cultivo celular, la extracción puede realizarse adicionando un detergente, realizando un shock osmótico, o por sonicación.

“La finalidad del extracto proteico determina el buffer de extracción que se utilizará dependiendo si se desea o no que las proteínas conserven su actividad biológica, su conformación nativa, su interacción con otras proteínas u otras moléculas. Algunos protocolos son tan violentos que involucran la ruptura de todas las membranas; otros en cambio permiten fraccionar y obtener, distintos componentes subcelulares (núcleos, mitocondrias, etc). Para la extracción de proteínas tiene que existir una ruptura celular o lisis. Los métodos más utilizados están basados en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos”. (Universidad Nacional de Quilmes, 2010).

3.3.1. Extracciones de proteínas con diferentes tampones de lisis con o sin cordón paliza

“El tampón de lisis de proteína basado en el dodecil sulfato de sodio (SDS), contiene SDS al 4% (p / v) en tampón Tris-HCl 50 mM. (pH 8,0). El reactivo de extracción de proteína bacteriana (B-Per) se adquiere de Thermo Fisher Scientific Inc. (número de catálogo, 78248). Tampón de lisis a base de urea, preparado con 8 M. de urea en 50 mM. Tris-HCl buffer (pH 8.0). Para los tres tampones de lisis, los cócteles de inhibidores de proteasa, incluida una mini tableta Roche complete™ y una tableta Roche Phos-STOP™ por cada 10 ml. de tampón de lisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las extracciones de

proteínas sin el batido de cuentas se vuelve a suspender las células microbianas en 500 µl. de tampón de lisis con pipeteo arriba y abajo hasta que no haya partículas visibles en el lisado. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 16,000 g, 4 °C en 10 minutos”. (Zhang et al., 2018).

3.3.2. Aislamiento de proteínas de clara de huevo

“Aproximadamente 40 ml. de clara de huevo tratados con etanol al 30% y ajustados pH a 5.8 para separar la mucina. La solución fue centrifugada en 4.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1 M. y sujeto a IEX cromatografía” . (Tubón, 2016).

3.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos de proteínas ESM

“Las partículas secas de ESM se suspendieron en diferentes sólidos a solventes relaciones: 1:10, 1:20 y 1:30 (g: mL) en agua destilada. La solución las muestras fueron expuestas a ondas ultrasónicas con una sonda ultrasónica reactor (UP200S, 200 W, Hielscher, Teltow, Alemania) teniendo una frecuencia fija de 24 kHz. El procesador ultrasónico tenía una Chaqueta de acero con temperatura controlada a través de la cual el agua fría puede pasar, por la temperatura del agua de refrigeración se ajustó a 4 °C para evitar los efectos de calentamiento. Las muestras fueron sometidas a sonicación en diferentes amplitudes y para diferentes tiempos después de los cuales fueron filtrados y centrifugados a 6000 g durante 20 min. Los sobrenadantes se recogieron para un análisis posterior”. (Surangna & Anil, 2016).

3.4. Cuantificación de proteínas

Los métodos de cuantificación de proteínas totales incluyen métodos tradicionales tales como la medición de la absorbancia a 280 nm, electroforesis, ensayos de Bradford y ácido bicinónico; otros métodos alternativos como el de Lowry o ensayos novedosos desarrollados por los proveedores comerciales.

Los proveedores comerciales proveen un kit bien diseñado para cada tipo de ensayo. Los métodos para cuantificar proteínas individuales incluyen el ELISA, el Western blot, la espectrometría de masas, entre otros. (Franco, Reyes, Carriel, & Ramón, 2018).

3.4.1. Análisis elemental

Es una técnica que indica el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en muestras sólidas y líquidas de naturaleza orgánica e inorgánica. La técnica se basa en la oxidación instantánea de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C; los productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, se transportan mediante el gas portador (He) por un tubo de reducción selectiva en columnas específicas para ser absorbidos térmicamente. Los campos de utilidad de esta técnica son varios como: análisis de combustibles fósiles (carbón, coque, gasolina, aceites minerales, gasoil, etc.), industria farmacéutica, análisis de suelos, industrial alimenticia, cerámicas, etc. (Universidad de Alicante, 2012).

3.5. Electroforesis

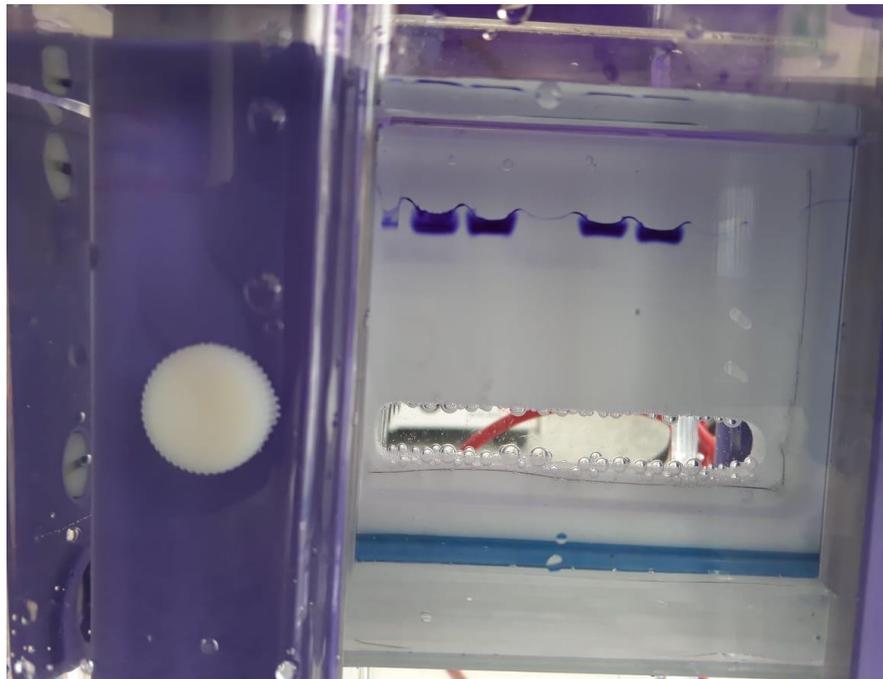
Es una técnica de laboratorio que habilita la separación de las proteínas de acuerdo con sus características físicas. Las proteínas, tienen cargas eléctricas diferentes cuando se ponen en un campo eléctrico, sus moléculas se desplazan de acuerdo con su carga eléctrica y su peso molecular. La dirección de la migración de las moléculas depende del pH de la solución del punto isoelectrico de la proteína; el grado de desplazamiento depende de la carga eléctrica de cada proteína, y, con menor importancia de otros factores como la diferencia de potencial, peso molecular, tamaño de la molécula, conductividad del medio y tipo de soporte. (Campuzano, 2016).

“El término electroforesis describe la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente

(aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos". (Padilla, Diez, Martínez, Bárcena, & García, 2012).

En unas condiciones determinadas de electroforesis, la distinta movilidad de cada molécula define su comportamiento y separación en el espacio. Diferentes moléculas tendrán diferente movilidad electroforética en un medio determinado. La interpretación de la electroforesis se debe hacer cuantitativa y cualitativamente, analizando los valores absolutos de cada fracción y observando el patrón electroforético, para determinar la presencia o ausencia de patrones previamente reconocidos. (Campuzano, 2016).

Figura No. 21. Electroforesis.



Fuente: (Verdezoto 2018)

3.5.1. Electroforesis método NATIVE

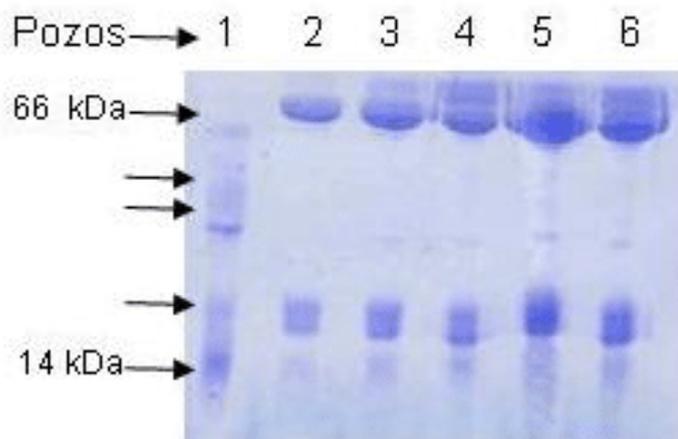
“Clear-native PAGE (CN-PAGE) separa las proteínas ácidas hidrosolubles y de membrana (pH <7) en un gel de gradiente de acrilamida y, por lo general, tiene una resolución inferior a la PAGE azul nativa (BN-PAGE). La distancia de migración depende de la carga intrínseca de la proteína y del tamaño del poro del gel de gradiente. Esto complica la estimación de masas nativas y estados de oligomerización cuando se compara con BN-PAGE, que usa colorante de Coomassie unido a proteínas cargado negativamente para imponer un cambio de carga en las proteínas. Por lo tanto, BN-PAGE en lugar de CN-PAGE se usa comúnmente para análisis estándar. Sin embargo, CN-PAGE ofrece ventajas cuando el colorante Coomassie interfiere con las técnicas requeridas para analizar los complejos nativos, por ejemplo, la determinación de actividades catalíticas, como se muestra aquí para la ATP sintetasa mitocondrial, o la separación eficiente a microescala de complejos proteicos de membrana para la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) analiza. CN-PAGE es más suave que BN-PAGE. Especialmente, la combinación de digitonina y CN-PAGE puede retener conjuntos supramoleculares lábiles de complejos proteicos de membrana que se disocian bajo las condiciones de BN-PAGE. Los estados oligoméricos enzimáticamente activos de la ATP sintasa mitocondrial previamente no detectados usando BN-PAGE se identificaron mediante CN-PAGE”. (Wittig & Schägger, 2005).

3.5.2. Electroforesis método SDS – PAGE

“Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)”. (Pérez, 2000).

“La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se hace la separación de proteínas en función de la masa molecular. Tanto es así que la representación del logaritmo de la masa molecular frente a la distancia migrada obedece a una línea recta para gran número de proteínas. Para que esta dependencia sea correcta, es preciso romper los puentes disulfuro intra- e intercatenarios, para lo cual es frecuente añadir durante la preparación de la muestra un agente reductor, generalmente 2- mercaptoetanol. De este modo, la masa molecular observada corresponde a la de cada subunidad de una proteína, no a la proteína completa, al existir una relación lineal. Para aplicar la muestra al gel, se le suele añadir un agente que la haga más densa, generalmente glicerina o sacarosa. Además, para seguir el avance de la separación, se añade un colorante, como azul de bromofenol, que sirve como referencia (tracking dye). Éste tiene una movilidad mayor que la de cualquier macromolécula y, por tanto, si se aplica corriente hasta que el colorante esté a poca distancia del extremo inferior del gel, se tiene la seguridad de que ninguna macromolécula se ha salido del gel por avance excesivo”. («Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS “SDS-PAGE” practicas.pdf», 2018).

Figura No. 22. Electroforesis Sds – Page.



Fuente: (Torres 2006)

3.6. Caracterización molecular

Es el estudio específico de cualquier característica molecular que permite la diferenciación entre especies mediante el uso de marcadores moleculares, pueden ser a nivel del DNA, RNA o proteico. (Vásquez C, Ramírez Castrillón, & Monsalve F, 2016).

Los objetivos fundamentales de la caracterización molecular son: 1) evaluar la situación y tendencias de los recursos genéticos 2) mejorar la contribución de los recursos genéticos a la seguridad alimentaria y al desarrollo rural incrementando la comprensión de sus usos actuales y potenciales y 3) contribuir a la determinación de las prioridades y necesidades de conservación, uso sostenible y ordenación de los recursos genéticos de las especies animales. (Roman-Ponce et al., 2014)

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1. Materiales

4.1.1. Localización de la investigación

Provincia:	Bolívar
Cantón:	Guaranda
Parroquia:	Veintimilla
Localidad:	Laguacoto II

4.1.2. Situación geográfica y climática

Altitud:	2.668 m.s.n.m.
Latitud:	S 1°40'00'' / S 1°30''
Longitud:	W 79°15'' / W 79 °0''
Temperatura media anual:	13.5 °C.
Precipitación media anual:	845 mm.
Heliofanía media anual:	720 h/l/a.

Fuente: Datos obtenidos de la Estación Meteorológica de Laguacoto II. 2018.

4.1.3. Zona de vida

Según la clasificación Ecológica de Holdridge las zonas corresponden a Bosque Siempre Verde Montado Bajo. (bbMB).

4.1.4. Material experimental

Huevos procedentes de producción ecológica (Empresa privada Pichincha Ecuador) y de producción comercial (Supermercado Bolívar Ecuador).

4.1.5. Materiales de laboratorio

- Materiales de vidrio.
- Materiales de plástico.
- Puntas para micropipetas.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf.
- Papel aluminio.
- Guantes.
- Etanol.
- NaOH.
- HCl.
- Ácido acético glacial.
- SDS.
- TRIS base.
- Metanol.
- TEMED.
- Glicina.
- Acrilamida bis.
- Glicerol.
- Azul de Comassie R250.
- 2-mercaptoetanol.
- Azul de Bromofenol.
- Estándar de proteínas.
- Estándar de sulfamida.
- Plancha de agitación.
- pH metro.
- Centrífuga.
- Balanza analítica.
- Ultracongelador.
- Liofilizador.

- Analizador elemental.
- Vortex.
- Termo agitador.
- Extractora de gases.
- Equipo de electroforesis: Mini Protean.

4.1.6. Materiales de oficina

- Computadora.
- Hojas A4.
- Esferos.
- Memoria flash.
- Internet.
- Impresora.

4.1.7. Reactivos

- β -mercaptoetanol
- Tris-Cl a pH 8,8 y 6,8 %
- Acrilamida 30%
- Temed 1.5 N
- Dodecil sulfato sódico (SDS) 10%
- Persulfato de amonio (PSA) 10%
- Azul de coomassie 66%, Buferr Running

4.2. Métodos

4.2.1. Factores en estudio

Cuadro No. 1. Factores y niveles de estudio

FACTOR A	FACTOR B
A1= E = Ecológico	B1= P = Precipitado
A2= C = Comercial	B2 = S=Sobrenadante

4.2.2. Tratamientos

Cuadro No. 2. Tratamientos

Código	Descripción
A1	Ecológico + Peso inicial
A2	Comercial + Peso inicial
A1B1	Ecológico + Precipitado + Peso final
A1B2	Ecológico + Sobrenadante + Peso final
A2B1	Comercial + Precipitado + Peso final
A2B2	Comercial + Sobrenadante + Peso final
A1B1	Ecológico + Precipitado + %Nitrógeno
A1B2	Ecológico + Sobrenadante + %Nitrógeno
A2B1	Comercial + Precipitado + %Nitrógeno
A2B2	Comercial + Sobrenadante + %Nitrógeno
A1B1	Ecológico + Precipitado + %Proteína
A1B2	Ecológico + Sobrenadante + %Proteína
A2B1	Comercial + Precipitado + %Proteína
A2B2	Comercial + Sobrenadante + %Proteína
A1	Ecológico + % Rendimiento
A2	Comercial + %Rendimiento

4.2.3. Tipo de análisis

Prueba de Fisher

4.3. Métodos de evaluación y datos tomados

4.3.1. Peso del albumen de huevo (PAH)

Para garantizar que los tratamientos sean equitativos se pesaron 50 g del albumen por medio de una balanza digital

4.3.2. Peso final (PF)

Se centrifugó la clara de cada producción (Ecológicos y Comerciales), obteniéndose un precipitado y un sobrenadante siendo pesados en una balanza digital, estos datos se expresaron en gramos (gr.), estos pesos nos ayudaran a obtener el peso final (PF).

4.3.3. Porcentaje de Nitrogeno (%N)

El porcentaje de nitrógeno se obtuvo mediante el analizador elemental.

4.3.4. Porcentaje de Proteína (%P)

El porcentaje de proteína se obtuvo mediante el porcentaje de Nitrógeno.

4.3.5. Porcentaje de Rendimiento (%R)

El porcentaje de Rendimiento se obtuvo mediante el peso de la clara de los huevos siendo este el peso inicial sobre el peso final que se obtuvo por los pesos del precipitado y del sobrenadante sumados; este será expresado en porcentaje.

4.3.6. Electroforesis NATIVE y SDS-PAGE (E)

Los resultados de esta prueba nos dan como resultado las proteínas que se encuentran en el albumen de los huevos y estas podrán ser visibles en el gel.

4.4. Manejo del Ensayo

4.4.1. Obtención de las muestras

Las muestras de los huevos ecológicos fueron obtenidas de la Granja Gallinas Felices de la parroquia Puéllaro del cantón Quito – Prov. Pichincha; y la muestra de los huevos comerciales se obtuvieron en un supermercado de la ciudad de Guaranda – Prov. Bolívar.

4.4.2. Extracción de proteínas

Para la extracción de la proteína se pesó 50g en una balanza digital marca OHAUS modelo PA224 de los huevos de las diferentes producciones, tratados con Etanol al 30% en relación 50/50 con la muestra.

4.4.3. Separación de la ovomucina

La ovomucina se separó ajustando el pH de la solución antes descrita a un pH de 5,8 con el pH metro marca HANNA modelo HI 2221, se agitó con la ayuda del agitador magnético marca IKA modelo C-MAG HS7, al cambiar el pH la ovomucina precipitó y se la pudo retirar fácilmente después de agitarlo.

4.4.4. Centrifugación

Se colocó la muestra en tubos falcon y se centrifugó en la centrifugadora marca EPPENDORF modelo centrifuge 5804R, a 4000rpm por 30 min a 4°C, para retirar

el resto de ovomucina, obteniendo un precipitado y un sobrenadante que se los trasvasó a frascos para muestras.

4.4.5. Liofilización

Previamente las muestras fueron ultracongeladas a menos 80 ° C en el ultracongelador marca Panasonic modelo MDF- U76VA-PA para mejorar el proceso de liofilización.

Utilizando el liofilizador marca CHRIST modelo Alpha 1-4LDplus, condicionando el equipo a -56°C por 20 min a 0,03 milibares para el secado primario y en el secado secundario se utilizan las mismas condiciones, pero de 37 a 48 horas dependiendo del contenido de la muestra, eliminando el agua de las muestras mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida, mejorando la concentración proteica.

4.4.6. Porcentaje de Proteína

El porcentaje de proteína se obtuvo mediante el porcentaje de nitrógeno que se obtuvo a partir del analizador elemental marca Elementar modelo vario MACRO CUBE que utiliza el método Dumas a partir de la siguiente fórmula:

$$\%P = \%N * \text{Factor de conversión del huevo}$$

Donde:

%P = Porcentaje de Proteína

%N = Porcentaje de Nitrógeno

Factor de conversión del huevo = 6,68

4.4.7. Porcentaje de Rendimiento

Se realizó teniendo en cuenta el peso inicial y el peso final de las muestras mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = (w_f/w_i) \times 100$$

Donde:

%R = Porcentaje de Rendimiento

Wf = Peso final (suma del precipitado y del sobrenadante)

Wi = Peso inicial (peso de la clara)

4.4.8. Caracterización de proteínas por electroforesis**4.4.8.1. Preparación de muestras****SDS-PAGE:**

De las 4 muestras liofilizadas se pesaron 10mg en un tubo ependorf de 1,5 ml, diluyendo con 1 mililitro de agua, agitamos en el vortex marca Vortex MIXER modelo VM-300 y se trasvasó 200 μ L de las muestras en dos tubos ependorf, colocando 200 μ L de Buffer con y sin 2mercaptoethanol (beta-mercaptoetanol) obteniendo 4 muestras con 2-mercaptoethanol y 4 muestras sin 2mercaptoethanol, se agitaron en el termoagitador o microincubadora marca Optic IVYMEN system modelo TR100-6 a 100°C por 5 min.

NATIVE:

De las 4 muestras liofilizadas se pesaron 10mg en un tubo ependorf de 1,5 ml, diluyendo en 1 mililitro de agua agitamos en el vortex y se trasvasó 200 μ L a otro tubo ependorf y se colocó 200 μ L de Buffer el cual no contiene ni 2-mercaptoethanol ni dodecilsulfato sódico (SDS), se agitó en el vortex.

4.4.8.2. Electroforesis SDS-PAGE**Preparación del gel concentrador o gel de arriba**

Para preparar el gel, colocamos en un tubo falcon 1,220ml de agua (H₂O); 0,260ml de Acrilamida al 30%; 0,500ml de Tris con un pH de 6,8; 0,020ml de

SDS al 10%; 10,0 μ L de antígeno prostático específico (PSA) al 10% y 2,0 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED); y colocamos en la cámara del equipo de electroforesis.

Preparación del gel separador o gel de abajo

Para preparar el gel, colocamos en un tubo falcon 1,530ml de agua (H₂O); 1,800ml de Acrilamida al 30%; 1,125ml de Tris con un pH de 8,8; 0,045ml de SDS al 10%; 22,5 μ L de PSA al 10% y 2,3 μ L de TEMED; y colocamos en la cámara del equipo de electroforesis colocando el peine para las muestras y esperamos a que gelifique.

Corrida de la muestra

Se armó las piezas para el equipo de electroforesis y vertemos el Buffer Running que contiene SDS, TRIS y GLICINA, en la cámara y en el gel ponemos 10 μ L de las muestras en cada pocillo más el estándar de proteínas, tapamos y colocamos los electrodos para generar el campo eléctrico; dejamos correr la muestra hasta que lleguen al final de la cámara; los geles resultantes de la electroforesis se tiñen con azul de Comassie R-250, al teñir el gel éste se vuelve azul, posterior a este proceso para observar las proteínas lo desteñimos con la solución que tiene 50% de metanol, 5% de ácido acético y 45% de agua.

4.4.8.3. Electroforesis NATIVE

Preparación del gel concentrador

Para preparar el gel, se colocó en un tubo falcon 1,240ml de agua (H₂O); 0,260ml de Acrilamida al 30%; 0,500ml de Tris con un pH de 6,8; 10,0 μ L de antígeno prostático específico (PSA) al 10% y 2,0 μ L de TEMED; y colocamos en la cámara del equipo de electroforesis.

Preparación del gel separador

Para preparar el gel, se colocó en un tubo falcon 1,530ml de agua (H₂O); 1,800ml de Acrilamida al 30%; 1,125ml de Tris con un pH de 8,8; 22,5µL de PSA al 10% y 2,3µL de TEMED; y colocamos en la cámara del equipo de electroforesis colocando el peine para las muestras y esperamos a que gelifique.

Corrida de la muestra

Se armó las piezas para el equipo de electroforesis y vertemos el Buffer Running que a diferencia del Buffer para el gel SDS-PAGE este no contiene SDS en la cámara y en el gel ponemos 10 µL de las muestras en cada pocillo más estándar de proteínas, tapamos y colocamos los electrodos para generar el campo eléctrico; y dejamos correr la muestra hasta que lleguen al final de la cámara; los geles resultantes de la electroforesis se tiñen con azul de Comassie R-250, al teñir el gel éste se vuelve azul, posterior a este proceso para observar las proteínas lo desteñimos con la solución que tiene 50% de metanol, 5% de ácido acético y 45% de agua.

4.4.8.4. Resultado de los geles

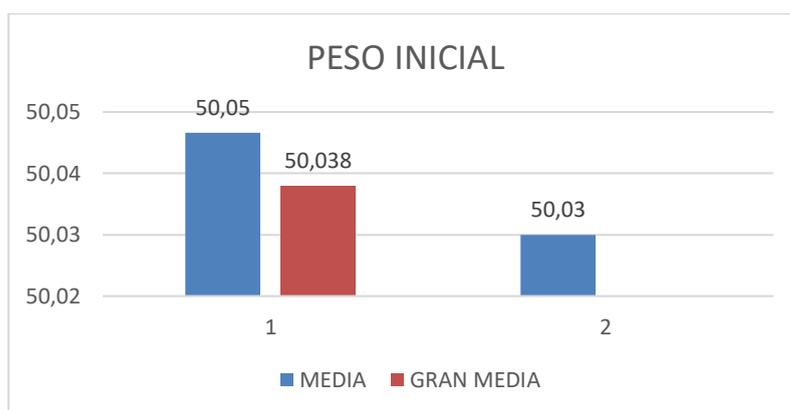
Para los resultados de los geles utilizamos el sistema de foto documentación marca ANALITYKJENA modelo GelTowe, con un software Vision Works.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro No. 3. Peso inicial (PAH), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

PESO INICIAL		NS 0,68
	A1	A2
	50.06	50.01
	50.02	50.06
	50.06	50.02
MEDIA	50.05	50.03
GRAN MEDIA	50,038	

Gráfico No. 1. Peso inicial (PAH), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.



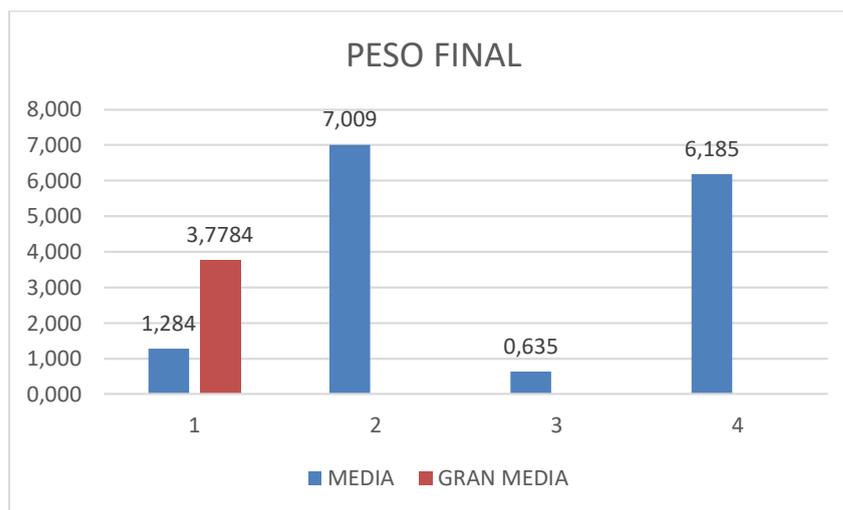
Según los resultados estadísticos de la distribución de Fisher del Peso inicial este no es significativo con una media total de 50.038 y con un coeficiente de variación de 0.05; siendo el mejor tratamiento A1 con 50.047.

El CONSEJO ASESOR DEL INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO (2002), dice que el peso del albumen de huevo varía entre g. 35,7 - 39,5. En nuestra investigación utilizamos un peso de albumen estándar para poder obtener un % proteico y un % de rendimiento concreto.

Cuadro No. 4. Peso final (PF), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

PESO FINAL ** 123,63				
	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
	1.193	7.274	0.583	7.308
	1.373	6.925	0.584	5.453
	1.288	6.828	0.738	5.794
MEDIA	1.284	7.009	0.635	6.185
GRAN MEDIA	3,7784			

Gráfico No. 2. Peso final (PF), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.



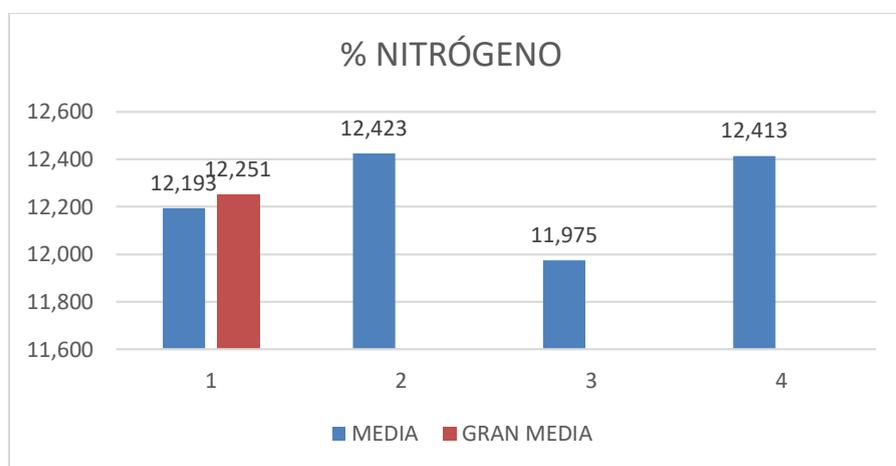
Según los resultados estadísticos de la distribución de Fisher del Peso final dio como resultado muy significativo con un valor de 123.63; el coeficiente de variación de 13.53 y con una media total de 3.7784 siendo el mejor tratamiento A1B2 con 7.0090. y el tratamiento más bajo el A2B1 con 0.6350

Debido a que no existen datos referenciales en investigaciones anteriores sobre el peso del albumen en liofilización se considera a esta investigación innovadora.

Cuadro No. 5. Porcentaje de Nitrógeno (%N), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

%NITRÓGENO		NS 2,33		
	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
	12.13	12.54	11.85	12.16
	11.99	11.33	11.76	12.24
	12.47	12.51	12.27	12.76
	12.43	12.58	12.21	12.77
	12.03	12.77	11.88	12.29
	12.11	12.81	11.88	12.26
MEDIA	12.193	12.423	11.975	12.413
GRAN MEDIA	12,251			

Gráfico No. 3. Porcentaje de Nitrógeno (%N), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.



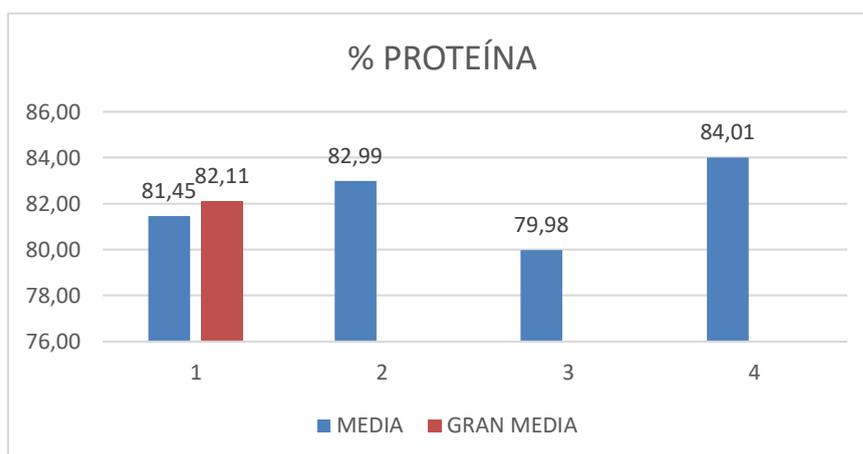
Según los resultados estadísticos de la distribución de Fisher del % de Nitrógeno dio como resultado no significativo con un valor de 2.33; un coeficiente de variación de 2.78 y una media total de 12.251 siendo el mejor tratamiento A1B2 con 12.423. y el tratamiento más bajo el A2B1 con 11.975.

No existen datos referenciales en investigaciones anteriores sobre el % de Nitrógeno del albumen de huevo obtenido mediante el analizador elemental por lo tanto se considera a esta investigación innovadora.

Cuadro No. 6. Porcentaje de Proteína (%P), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

%PROTEÍNA		NS 2,08		
	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
	80.56	79.73	78.86	81.496
	83.17	83.8	81.73	85.27
	80.63	85.44	79.36	85.27
MEDIA	81.45	82.99	79.98	84.01
GRAN MEDIA	82,11			

Gráfico No. 4. Porcentaje de Proteína (%P), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.



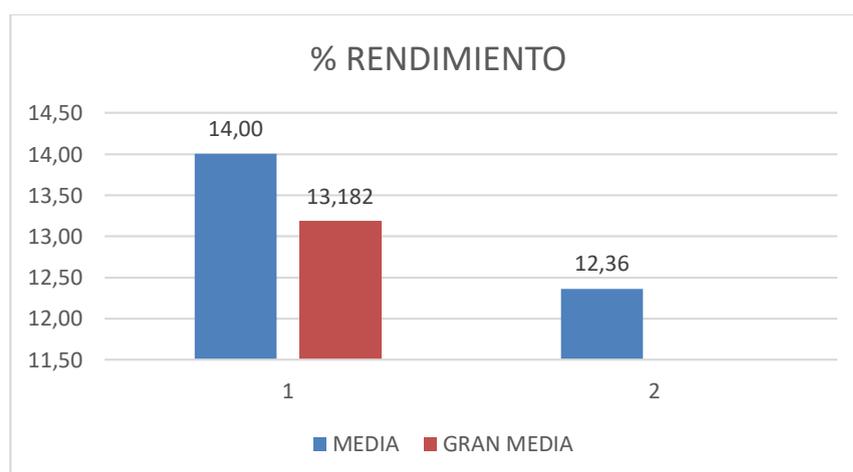
Según los resultados estadísticos de la distribución de Fisher del % de Proteína dio como resultado no significativo con un valor de 2.08; un coeficiente de variación de 2.58 y una media total de 82.110 siendo el mejor tratamiento A2B2 con 84.012. y el tratamiento más bajo el A2B1 con 79.983.

Ángeles Carbajal Azcona. Profesora Titular de Nutrición y su publicación Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud en la Revista de Nutrición práctica en el 2006 este dice que, existe un 11% de proteína en el albumen del huevo, esto no es comparativo con nuestra investigación ya que existe un mínimo de 79,98% y un máximo de 84,01% de proteína en aproximadamente 50 g de albumen de huevo.

Cuadro No. 7. Porcentaje de Rendimiento (%R), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

%RENDIMIENTO		NS 1,96
	A1	A2
	14.53	14.61
	13.84	10.89
	13.64	11.58
MEDIA	14.00	12.36
GRAN MEDIA	13.182	

Gráfico No. 5. Porcentaje de Rendimiento (%R), de los huevos procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.

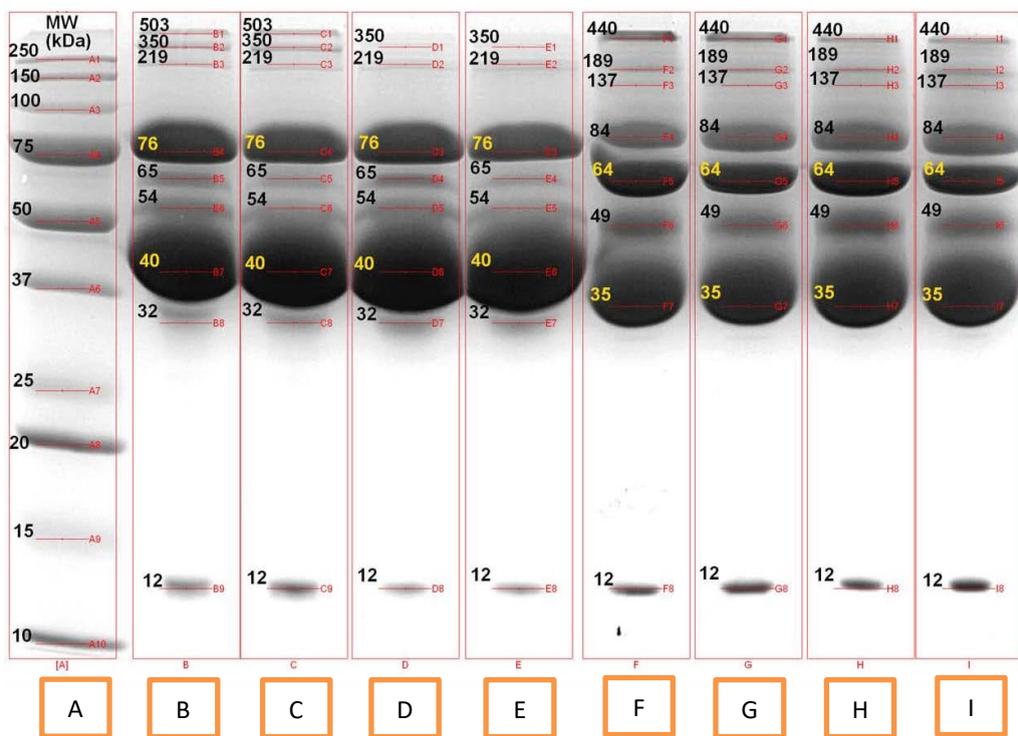


Según los resultados estadísticos de la distribución de Fisher del % de Rendimiento dio como resultado no significativo con un valor de 1.96; un

coeficiente de variación de 10.91 y una media total de 13.182 siendo el mejor tratamiento A1 con 14.003.

No existen datos referenciales en investigaciones anteriores sobre el % de Rendimiento, por lo que se considera a esta investigación innovadora.

Gráfico No. 6. Gel electroforético SDS-PAGE de albumen de huevo de gallina procedentes de producción ecológica vs. producción comercial.



Fuente: Investigación de campo.

Elaborado por: Stephanie Cristina Verdezoto Tapia

El gráfico No 12, muestra la caracterización de proteínas por medio de Electroforesis SDS-PAGE en presencia y ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol de proteínas aisladas de albumen de huevo de gallina procedentes de la producción comercial y la producción ecológica.

La línea A corresponde al estándar que nos proporciona los pesos de las proteínas.

Las líneas B, y C corresponden a los precipitados del huevo Ecológico y Comercial; las líneas D, y E a los sobrenadantes de los huevos Ecológicos y Comerciales respectivamente; con el agente reductor, y presentaron proteínas con un peso molecular de, 502,95 y 349,86 kDa que corresponden a la Ovomucoide; 218,55 kDa que corresponden a la Ovomucina; 76,44 kDa de la Ovotransferrina; 39,87 kDa de la Ovoalbúmina y 12,39 kDa de la Lisozima.

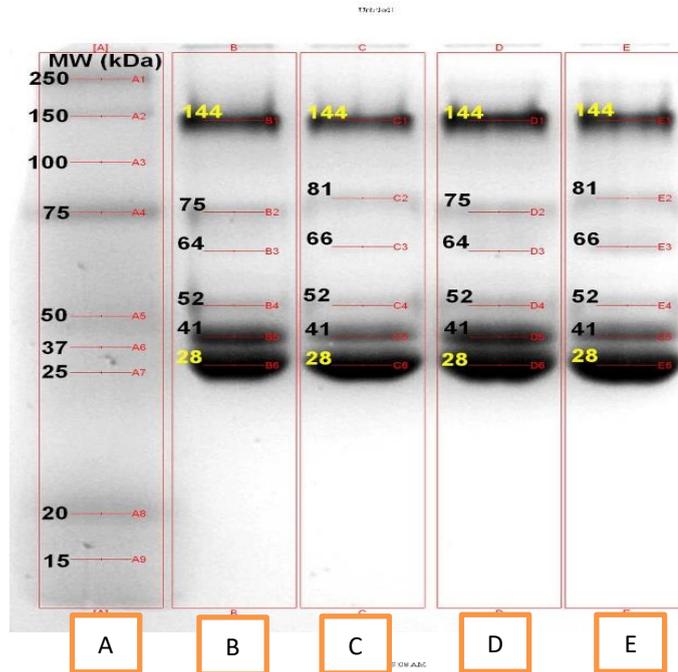
Las líneas F, y G corresponden a los precipitados del huevo Ecologico y comercial; las líneas H, e, I son las muestras pertenecientes a los sobrenadantes de los huevos ecológicos y comerciales respectivamente; sin el agente reductor, y presentaron proteínas con un peso molecular de, 439,68 kDa que corresponden a la Ovomucoide; 188,51 kDa a la Ovomucina; 84,04 kDa a la Ovotransferrina; 49,13 kDa de la Ovoalbúmina y 12,39 kDa de la Lisozima.

Según el estudio realizado por C. Desert y otros; 2001; en “Comparison of Different Electrophoretic Separations of Hen Egg White Proteins” podemos afirmar que los pesos encontrados en esta investigación si corresponden a los antes mencionados.

No existen diferencias entre el precipitado y el sobrenadante en todas las muestras; para un proceso industrial de extracción de proteínas se debe tomar en cuenta las dos partes del proceso (sobrenadante y precipitado).

A través del agente desnaturizante 2-mercaptoetanol se puede visualizar las proteínas que tienen presencia de cisteína; el rompimiento de puentes disulfuro se puede evidenciar de acuerdo a su peso molecular en: LISOZIMA en un peso de 12 kDa, OVOTRANSFERRINA en un peso de 76 y 65 kDa y OVOMUCOIDE con un peso de 350 y 219 kD.

Gráfico No. 7. Gel electroforético NATIVE de albumen de huevo de gallina, procedentes de Producción ecológica vs. Producción comercial.



Fuente: Investigación de campo.

Elaborado por: Stephanie Cristina Verdezoto Tapia

Análisis:

El gráfico No 13, muestra la caracterización de proteínas por medio de Electroforesis NATIVE, de proteínas aisladas de albumen de huevo de gallina procedentes de la producción comercial y la producción ecológica.

La línea A corresponde al estándar que nos proporciona los pesos de las proteínas. Las líneas B, y C a los precipitados del huevo Ecológico y Comercial; las líneas D, y E a los sobrenadantes de los huevos de producción Ecológica y Comercial respectivamente; estas bandas como las proteínas no han sido desnaturalizadas; se pueden observar grupos de proteínas las cuales según podemos ver se encuentran en los mismos rangos de peso (KDa) es decir se encuentran las mismas proteínas ya sea en producción comercial, como en producción ecológica.

VI. COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

No existe evidencia estadística para rechazar la Hipótesis nula (H_0) que dice, “Los aislados proteicos del albumen de huevos de gallina, procedentes de la producción ecológica vs. la producción comercial no presentan diferencias en su composición proteica a nivel molecular”, ya que, según las pruebas estadísticas realizadas y a la caracterización a través de electroforesis no existen diferencias significativas.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones:

- A través de la presente investigación se ha logrado caracterizar molecularmente los aislados proteicos del albumen de huevos de gallina procedentes de la producción ecológica vs. la producción comercial; se ha conseguido estandarizar la metodología de extracción.
- Las muestras analizadas estadísticamente en cuanto a porcentaje de proteína (%P), porcentaje de rendimiento (%R), porcentaje de Nitrógeno; y tipos de proteínas, no presentaron diferencias significativas.
- Una vez caracterizadas las muestras por el método de electroforesis (SDS-PAGE, NATIVE), se determina que no existen diferencias significativas, tanto en precipitados como en sobrenadantes de los dos diferentes tipos de huevo.
- Según el estudio realizado se determinó que por el % de proteína obtenido en las dos muestras; estos son concentrados proteicos; ya que, el menor porcentaje es de 79,99% y el mayor porcentaje de proteína es de 82,99%.

7.2. Recomendaciones:

- Se recomiendan futuras investigaciones que incluyan un estudio diferencial de otras partes estructurales como la yema, a través de la comparación de ácidos grasos, carotenoides, entre otros.
- Además, se sugieren realizar pruebas de bioactividad y establecer si existen diferencias.
- Finalmente se recomienda hacer una investigación usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para mejorar la exactitud de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adam, E. E., & Ebert, R. J. (1991). *Administración de la producción y las operaciones: conceptos, modelos y funcionamiento*. Pearson Educación. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=FI1wYyoz8-oC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
2. Arias, J., & Fernández, M. (2018). Revista TecnoVet. Recuperado 29 de junio de 2018, de http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9610%2526ISID%253D458,00.html
3. Azcona, Á. (2006a). Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud, 11.
4. Azcona, Á. (2006b). Publicado en: Revista de Nutrición Práctica 2006;10: PDF. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://docplayer.es/21098646-Publicado-en-revista-de-nutricion-practica-2006-10-73-76.html>
5. Ballard, G. (2001). CYCLE TIME REDUCTION IN HOME BUILDING, 9.
6. Campuzano, G. (2016). La electroforesis de proteínas: más que una prueba de laboratorio. Recuperado 30 de junio de 2018, de <https://edimeco.com/medicina-laboratorio/2012/articulos-de-revision/item/253-la-electroforesis-de-proteinas-mas-que-una-prueba-de-laboratorio>
7. Cárdenas, L. F. A., Bley, A. S., Hernández, E. A., & Raposo, I. C. (2010). EVALUACIÓN Y MEJORAMIENTO DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN PROYECTOS DE CONSTRUCCIÓN, 320.
8. Carrillo, W. (2013). Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad Lysozyme: Antibacterial Activity and Allergenicity, 14, 13.
9. Cruz, A. L. (2007). Correlacion del metodo KJELDAHL.pdf. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10914/Correlacion%20del%20metodo%20KJELDAHL.pdf?sequence=1>
10. Domínguez, F. A. (2012). Aspectos Microbiológicos del huevo y sus derivados. Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2013/enero/305545264/305545264.pdf>

11. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS «SDS-PAGE» practicas.pdf. (2018). Recuperado 30 de junio de 2018, de <http://www3.uah.es/jcdiez/biologia%20sanitaria/metodos%20biologia%20molecular/practicas.pdf>
12. Franco, G., Reyes, Y., Carriel, A., & Ramón, S. (2018). Determinación de proteínas por el método de Lowry (Fohn Cicalteau). Recuperado 30 de junio de 2018, de <https://es.scribd.com/document/354132210/Lab-Bioquimica-Informe-2-Metodo-de-Lowry>
13. Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos / Composition and Nutritional Quality of Foods*. Ed. Médica Panamericana. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=hcwBJ0FNvqYC&pg=PT106&lpg=PT106&dq=Es+una+glucoproteina+que+contribuye+a+la+viscosidad+de+la+clara.+Forma+con+la+lizosima+un+complejo+insoluble+en+medio+acuoso+dependiendo+del+pH.+Este+complejo+es+responsable+de+la+estructura+gelificada+de+la+capa+espesa+del+albumen.+La+disociaci%C3%B3n+de+este+complejo+act%C3%BAa+durante+el+almacenamiento+de+los+huevos,+a+medida+que+el+pH+se+eleva,+y+es+responsable+de+la+licuefacci%C3%B3n+del+albumen.+Es+estable+al+calor.+La+ovomucina+es+un+inhibidor+de+la+hemoaglutinaci%C3%B3n+v%C3%ADrica&source=bl&ots=6IBWKhp63p&sig=pZ6wmcanJ5rbXlZApPTL6gqNUC0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwib1cyr2PnbAhUKxVvKKhf2qBCAQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Es%20una%20glucoproteina%20que%20contribuye%20a%20la%20viscosidad%20de%20la%20clara.%20Forma%20con%20la%20lizosima%20un%20complejo%20insoluble%20en%20medio%20acuoso%20dependiendo%20del%20pH.%20Este%20complejo%20es%20responsable%20de%20la%20estructura%20gelificada%20de%20la%20capa%20espesa%20del%20albumen.%20La%20disociaci%C3%B3n%20de%20este%20complejo%20act%C3%BAa%20durante%20el%20almacenamiento%20de%20los%20huevos%20a%20medida%20que%20el%20pH%20se%20eleva%20y%20es%20responsable%20de%20la%20licuefacci%C3%B3n%20del%20albumen.%20Es%20estable%20al%20calor.%20La%20ovomucina%20es%20un%20inhibidor%20de%20la%20hemoaglutinaci%C3%B3n+v%C3%ADrica&f=false>

14. González, K. (2017). Valor nutricional de los pastos. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://zoovetesmipasion.com/pastos-y-forrajes/valor-nutricional-los-pastos/>
15. Hammershoj, M., & Johansen, N. F. (2016). Review: The effect of grass and herbs in organic egg production on egg fatty acid composition, egg yolk colour and sensory properties - Livestock Science. Recuperado 29 de junio de 2018, de [https://www.livestockscience.com/article/S1871-1413\(16\)30245-1/abstract](https://www.livestockscience.com/article/S1871-1413(16)30245-1/abstract)
16. Hernández, R. (2015). Prevalencia y caracterización molecular de Salmonella spp, en granjas avícolas de postura comercial en el departamento del Tolima., 99.
17. huevoselmajadal. (2012). Valor nutricional del huevo y recomendaciones de consumo. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://huevoselmajadal.com/2012/05/24/composicion-del-huevo-y-recomendaciones-de-consumo/>
18. Jiménez, R. (2012). Digestibilidad, Alergenicidad in vitro y efecto inmunomodulador de proteína de huevo procesado, 104.
19. Karp, G. (2018). biología celular y molecular- 5 ed - PDF Free Download. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://edoc.site/biologia-celular-y-molecular-gerald-karp-5-ed-pdf-free.html>
20. Manejo de nidos mecánicos para reproductoras: individuales y comunitarios. (2015). Recuperado 29 de junio de 2018, de <http://www.elsitioavicola.com/articles/2708/manejo-de-nidos-mecanicos-para-reproductoras-individuales-y-comunitarios/>
21. mercado-prod-gourmet-dinamarca-icex.pdf. (2018). ICEX España. Recuperado de <http://www.mercacei.com/pdf/mercado-prod-gourmet-dinamarca-icex.pdf>
22. Moreno, D. A. O. (2001). Zootecnista - Profesor Asociado, 46.
23. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022. (2013), 335.
24. Padilla, C. A. P., Diez, J., Martínez, E., Bárcena, J., & García, C. (2012). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico, 8.
25. Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Recuperado 30 de junio de 2018, de http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm

26. Pintado, D. (2016). La calidad del huevo en el punto de mira: calidad externa. Recuperado 29 de junio de 2018, de <https://avicultura.info/la-calidad-del-huevo-en-el-punto-de-mira-calidad-externa-2/>
27. Pomilio, A. B., Ollivier, C., Oscar, J., & Vitale, A. A. (2013). Flavoproteínas que actúan como amino-oxidasas: Estructura, función e importancia clínica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47(2), 279-305.
28. Quispe, W. M. (2018). Crianza-de-gallinas-para-la-produccion-de-huevos, 18.
29. Renter, A., & Jurgens, A. (2017). Huevos de gallinas felices, una tendencia al alza en toda Europa. Recuperado 29 de junio de 2018, de <http://www.lavanguardia.com/vida/20171128/433261030103/huevos-gallinas-felices-etiquetado-cero-proteccion-animales.html>
30. Roman-Ponce, S. I., A. Cantú-Covarrubias, A. Vélez-Izquierdo, A. Ríos-Utrera, F.E. Martínez-Silva, L. De La Cruz-Colín, ... V.E. Vega-Murillo. (2014). Manual Para la Identificación y Caracterización de los Recursos Genéticos Pecuarios. Aves y Cerdos. Unpublished. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.11512.24325>
31. Sánchez, L. (2018). Uso de lisozima como promotor de crecimiento. Recuperado 29 de junio de 2018, de <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/uso-de-lisozima-como-promotor-de-crecimiento.html>
32. Sena, S. N. (2013). insumos_factores_de_produccion_oct_2013.pdf [Boletín mensual Núm. 16]. Recuperado 28 de junio de 2018, de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/insumos_factores_de_produccion_oct_2013.pdf
33. StaffNP. (2010). Características de los alérgenos más importantes en el huevo. Recuperado 29 de junio de 2018, de https://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2010/01/07/alergenosen_huevo/
34. Surangna, J., & Anil, A. (2016). Optimization of Extraction of Functional Protein Hydrolysates from Chicken Egg Shell Membrane (ESM) by Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) and Enzymatic Hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.057>

35. Telégrafo, E. (2017). El ecuatoriano consume 165 huevos al año. Recuperado 30 de junio de 2018, de <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/el-ecuatoriano-consume-165-huevos-al-ano>
36. Tubón, J. (2016). “*Modificación de la Actividad enzimática de Lisozima de Clara de Huevo de Gallina, por hidrólisis gástrica y tratamiento térmico (microondas)*”. Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23822/1/AL607.pdf>
37. Universidad de Alicante. (2012). Análisis Elemental. Recuperado 30 de junio de 2018, de <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x/analisis-elemental.html>
38. Universidad Industrial de Santander. (2013). *Manual de gallinas ponedoras. Emprendedor en producción y comercialización de gallinas con alimentación alternativa y semipastoreo. Dr. Jaime Augusto Ortiz Salazar*. Recuperado de https://www.slideshare.net/jaimeaugusto/manual-de-gallina-ponedora-sena?qid=3d34b08d-17e5-4dea-a29f-2dd21268dde4&v=&b=&from_search=1.
39. Universidad Nacional de Quilmes. (2010). TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. Recuperado de <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp2.pdf>
40. Vásquez C, J. A., Ramírez Castrillón, M., & Monsalve F, Z. I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>
41. Wittig, I., & Schägger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, 5(17), 4338-4346. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500081>
42. Zhang, X., Li, L., Mayne, J., Ning, Z., Stintzi, A., & Figeys, D. (2018). Assessing the impact of protein extraction methods for human gut metaproteomics. *Journal of Proteomics*, 180, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.001>

ANEXOS

Anexo No. 1. Tabla de los pesos iniciales de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.

PESO INICIAL					
ECOLÓGICOS			COMERCIALES		
R1	R2	R3	R1	R2	R3
50,0609	50,02	50,0604	50,0191	50,062	50,0208

Anexo No. 2. Tabla de los pesos finales de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.

	PESO FINAL					
	ECOLÓGICOS			COMERCIALES		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
PRECIPITADO	1,1925	1,3732	1,2875	0,5831	0,5836	0,738
SOBRENADANTE 1	1,0258	2,6767	2,7797	3,4228	2,5494	2,4374
SOBRENADANTE 2	5,0552	2,8747	2,7609	3,3021	2,3196	2,6183
SOBRENADANTE T	6,081	5,5514	5,5406	6,7249	4,869	5,0557
TOTAL	7,2735	6,9246	6,8281	7,308	5,4526	5,7937

Anexo No. 3. Porcentaje de Nitrógeno obtenido del analizador elemental de los huevos de la Producción Ecológica y Comercial.

Porcentaje de Nitrogeno (%N)	
Huevo Eco Precipitado 1 R1	12,13
Huevo Eco Precipitado 1 R2	11,99
Huevo Eco Sobrenadante1 R1	12,54
Huevo Eco Sobrenadante 1 R2	11,33
Huevo Eco Precipitado 2 R1	12,47
Huevo Eco Precipitado 2 R2	12,43
Huevo Eco Sobrenadante 2 R1	12,51
Huevo Eco Sobrenadante 2 R2	12,58
Huevo Eco Precipitado 3 R1	12,03
Huevo Eco Precipitado 3 R2	12,11
Huevo Eco Sobrenadante 3 R1	12,77
Huevo Eco Sobrenadante 3 R2	12,81
Huevo Comercial Precipitado 1 R1	11,85
Huevo Comercial Precipitado 1 R2	11,76
Huevo Comercial Sobrenadante 1 R1	12,16
Huevo Comercial Sobrenadante 1 R2	12,24
Huevo Comercial Precipitado 2 R1	12,27
Huevo Comercial Precipitado 2 R2	12,21
Huevo Comercial Sobrenadante 2 R1	12,76
Huevo Comercial Sobrenadante 2 R2	12,77
Huevo Comercial Precipitado 3 R1	11,88
Huevo Comercial Precipitado 3 R2	11,88
Huevo Comercial Sobrenadante 3 R1	12,29
Huevo Comercial Sobrenadante 3 R2	12,26

Anexo No. 7. Fotografías del trabajo de campo en el laboratorio.



Huevos utilizados para muestras de la producción comercial y de la producción ecológica.



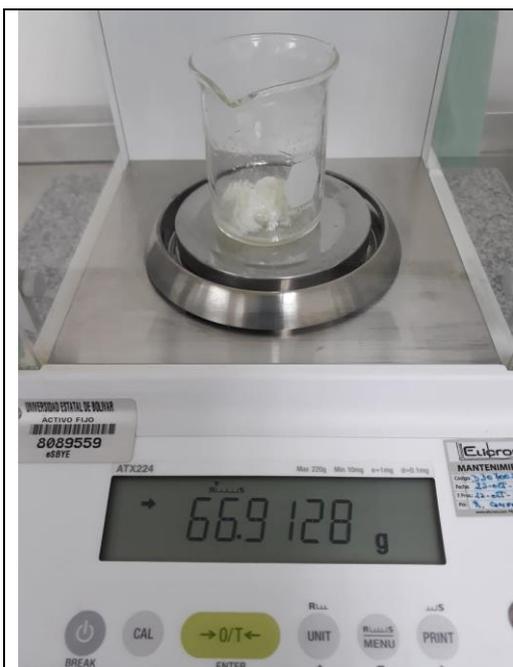
Huevos de la producción comercial y de la producción ecológica sometidos a medición en sus diámetros con cinta métrica.



Separación de claras y yemas de huevos de ambas producciones en estudio.



Muestras salidas del centrifugador (precipitado y sobrenadante)



Peso del precipitado.



Colocación de la muestra de pH 5.8 a los tubos de plástico para la centrifugación.



Cambio de pH de las muestras con el phmetro y el agitador magnético.



Liofilizador



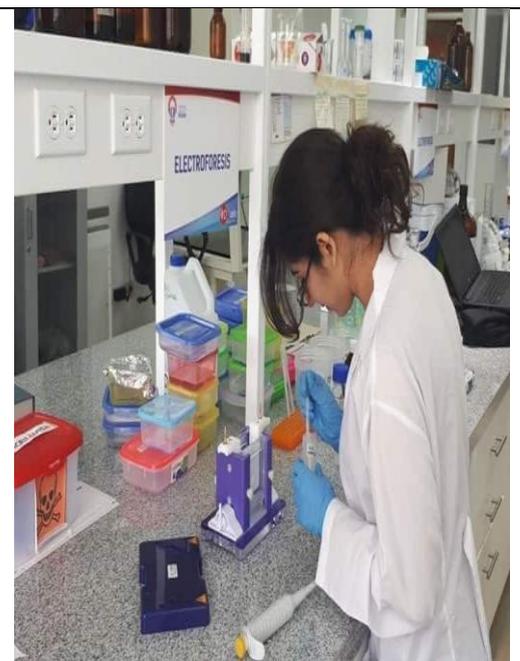
Colocación de muestras en el
liofilizador.



Muestras liofilizadas.



pH metro indicando el pH al cual
deben estar las muestras.



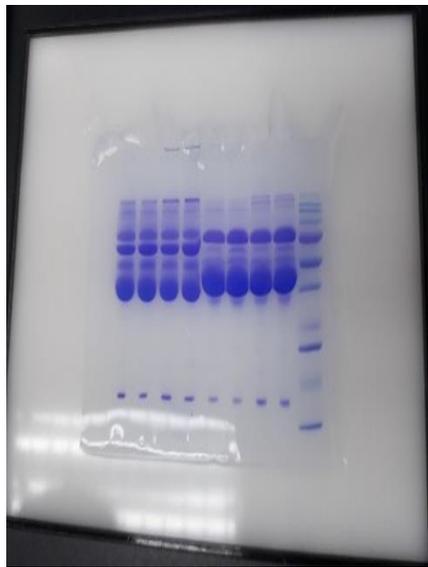
Realización de geles para la
electroforesis.



Preparación de muestras para colocar en el gel para la electroforesis.



Electroforesis corriendo el gel.



Gel SDS-PAGE desteñado y listo para la interpretación de datos.



Fuente de poder para que corra la muestra en la electroforesis.



Gel Native listo para la interpretación



Sistema de fotodocumentación.



Exposición en la visita de campo



Visita de campo en el laboratorio.

Anexo No. 8. Glosario de términos.

Alergia: Intolerancia a determinado tipo de componentes de la dieta como es el caso común de muchas proteínas de algunos cereales, como las gliadinas del gluten, que dan lugar a la enfermedad celiaca.

Aminoácidos: También ácidos aminados, elementos constitutivos de las proteínas formados por largas cadenas de sus elementos constitutivos comunes, unidos linealmente entre sí. Los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son apenas una veintena.

Antioxidante: Sustancia que inhibe directa o indirectamente las oxidaciones causadas por el oxígeno.

Aterosclerosis: Consecuencia patológica, a nivel cardiovascular, de los depósitos de colesterol y otros elementos (placas de ateroma), que reducen el diámetro de las arterias.

ADN de cadena simple: Polímero no ramificado, compuesto por cuatro tipos de subunidades: los desoxiribonucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

ADN Polimerasa: Enzima que cataliza la incorporación de los nucleótidos complementarios a la cadena molde durante el proceso de replicación del ADN.

Bacteriofago (Fago): Cualquier virus que infecte bacterias. Herramienta ampliamente utilizada como vector de clonaje.

Caloría: Es la cantidad de calor necesario para aumentar 1° C 1 milímetro o gramo de agua de 15,5 a 16,5° C.

Cebador / Oligo / oligonucleótido o "primer": Molécula corta de ADN de una sola cadena (Unos 18-24 nucleótidos)

Colesterol: Compuesto orgánico presente en los lípidos de origen animal. Cuando hay mucho colesterol en la sangre puede favorecer la aterosclerosis. Hay dos formas principales de transporte del colesterol en la sangre: las HDL o high density lipoproteins que son “el bueno” y aseguran su retorno al hígado, y las LDL o low density lipoproteins que son el llamado “malo” y lo llevan a los tejidos.

Cuerpos cetónicos: Tienen olor característico a acetona y se producen por utilización masiva de ácidos grasos como principal sustrato energético.

Déficit proteico: La falta de proteínas en la dieta va, a menudo unido a un déficit global de alimento, y a malnutrición calórico – proteica, sobre todo en los niños, dando lugar a enfermedades.

Desoxiribonucleótido: Unidad básica del ADN constituida por una base nitrogenada: adenina, guanina (purinas), citosina o timina (pirimidinas), un azúcar (desoxiribosa) y un grupo fosfato.

Electroforesis: Método de fraccionamiento molecular basado en diferencias de movilidad en un campo eléctrico.

Enzimas: Proteínas que facilitan una reacción bioquímica, y se asocian a un cofactor llamado coenzima.

Gel desnaturizante: Gel al que se ha incorporado urea como agente desnaturizante y en el que las moléculas de ADN (previamente desnaturizadas por calentamiento a 90°C) se someten a electroforesis a 45°C con objeto de evitar su renaturalización (Formación espontánea de la doble hélice). De esta forma la

velocidad de migración en el gel es directamente proporcional al tamaño de la cadena sencilla de ADN.

Gel de acrimamida/bisacrilamida: Gel copolimerizado que gracias a la formación de una malla de un tamaño de poro concreto permite separar diferentes moléculas en función de su tamaño.

Liofilización: Es un sistema de conservación que sirve para algunos alimentos, mediante el paso de un sólido a gas, realizado con el vacío.

Metabolismo: Conjunto de transformaciones bioquímicas que se producen en un organismo vivo. Metabolismo basal es el gasto energético mínimo necesario para mantener un organismo en ayunas, reposo y condiciones térmicas óptimas.

Obesidad: Es una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo. Su medida es un proceso bastante complicado, que se propone hacer por diversos métodos, entre ellos el IMC o índice de masa corporal.

Oxidación: Concepto bioquímico que corresponde a una ganancia de oxígeno y pérdida de hidrógeno.

Pectinas: Polisacáridos que se encuentran en el espacio que separa las paredes de las células vegetales, y se hinchan con agua. Forman parte de la pulpa de algunas frutas.

Vitaminas: Conjunto de sustancias que nuestro organismo necesita incorporar en pequeñas cantidades para desarrollar funciones distintas del aporte de energía. Participan en funciones muy diversas.