

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN PRESENCIAL**

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado académico  
de Magister en Ciencia de los Alimentos

**Tema:** LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE PROTEÍNAS DE FLORES DE BEGONIAS (*Begonia doublet*) DURANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTRODUODENAL *in vitro*.

**Autor(a):** Ing., Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón

**Director(a):** Ing., Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD

Ambato-Ecuador

Mayo 2022



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**INFORMACIÓN GENERAL**

**TEMA:** LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE PROTEÍNAS DE FLORES DE BEGONIAS (*Begonia doublet*) DURANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTRODUODENAL *in vitro*

**AUTOR:** Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón

Ingeniera en Alimentos

rodriguez.paulina.e@gmail.com

**DIRECTOR:** Ing. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.**

- Producción Agroalimentaria Sostenible
- Seguridad y Soberanía Alimentaria



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en  
Alimentos y Biotecnología**

El tribunal receptor del Trabajo de Titulación presidida por la Doctora Mirari Yosune Arancibia Soria, e integrado por la Doctora Lorena de los Ángeles Núñez Villacis y el Doctor Mario Daniel García Solís designados por la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Informe de Investigación con el tema: Liberación de péptidos con capacidad antioxidante a partir de proteínas de flores de Begonias (*Begonia doublet*) durante la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro*, elaborado y presentado por la señorita Ingeniera Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón, para optar por el grado Académico de Magíster en Ciencia de los Alimentos; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación, el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria.  
1802142461  
**Presidenta del Tribunal**

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis  
1804256905  
**Miembro del tribunal**

Dr. Mario Daniel García Solís  
1103605471  
**Miembro del tribunal**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Titulación presentado con el tema: Liberación de péptidos con capacidad antioxidante a partir de proteínas de flores de Begonias (*Begonia doublet*) durante la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro*, le corresponde exclusivamente a: la Ingeniera Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón, Autora bajo la Dirección del Ing. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD, Director del Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

Ingeniera, Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón.

1803741246

**AUTORA**

Ingeniero Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD

1802738102

**DIRECTOR**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el trabajo de titulación sirva como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigaciones, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este documento, dentro de las resoluciones de la Universidad.

Ingeniera, Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón.

1803741246

**AUTORA**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida, por su amor, bendiciones y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A mí ángel papito Luchito,  
por ser ejemplo en vida de amor, trabajo,  
humildad y perseverancia.*

*A mí querida madre Bachita la principal promotora  
que los sueños se cumplen, su amor y apoyo incondicional  
han permitido que cumpla con esta meta.*

*A mí querido padre Miguel por su apoyo  
quien influyo su amor y perseverancia a las cosas.*

*A mi hija Valentina que bajo del cielo, para llenar mi vida de amor y alegría,  
gracias princesa porque eres mi mayor motivación e inspiración de superación, una  
sonrisa tuya ilumina mi mundo y me da las fuerzas necesarias para luchar y  
conseguir mis metas. Siempre caminaremos juntas amor mío.*

*Pauly...!!*



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**AGRADECIMIENTO**

*A Dios, por guiarme por el camino correcto, quien fortaleció mi vida para llenar mi corazón de luz y alcanzar mi anhelo tan esperado.*

*A mi familia, por el amor, apoyo y confianza incondicional en cada momento de mi vida, gracias mami por los sacrificios llenos de amor, sin ellos no hubiera llegado a esta hermosa etapa, a mi hermano Javier por su amistad y aliento que me brindó todo este tiempo. A mi hija Valentina, que a su tan corta edad permitía que un abrazo sea reconfortante y renueve mis energías.*

*A la Universidad Técnica de Ambato, y por medio de ella a la Dirección de Posgrados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, la cual me brindó la oportunidad de continuar con mi formación profesional a través de su personal docente.*

*A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo – AECID por la media beca otorgada para la cumplir con esta meta y fomentar la investigación.*

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

*De manera especial, mi profundo agradecimiento a Rubén Vilcacundo Chamorro, Director del trabajo de Investigación. Valoro sinceramente su comprensión, su tiempo y la confianza depositada, que han sido aportes invaluable en mi formación como persona e investigadora.*

*Gracias infinitas a María Fernanda Quinteros y Robert Morán, investigadores que han compartido su tiempo y conocimientos para el desarrollo de este trabajo.*

*A mis compañeros por los momentos compartidos durante este camino lleno de satisfacción.*

*A mis amigos que siempre confiaron en mí y me apoyaron desde su trinchera, gracias por todo.*

*Pauly..!!*



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**ÍNDICE GENERAL**

DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS .....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.....	17
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	17
1.1. Introducción .....	17
1.2. Justificación.....	19
1.3. Objetivos .....	20
1.3.1. General.....	20
1.3.2. Específicos .....	20
CAPÍTULO II .....	21
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	21
2.1. Fundamentación Epistemológica.....	22
2.1.1. Flores Comestibles .....	22
2.1.2. Origen y distribución de la Begonia x semperflorens-cultorum .....	24
2.1.3. La florifagia.....	25
2.1.4. Proteínas alimentarias .....	25
2.1.5. Concentrados proteicos .....	27
2.1.6. Métodos de cuantificación de proteína .....	27





**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

2.1.7	Digestibilidad de Proteínas .....	28
2.1.8	Caracterización de Proteínas por Electroforesis .....	29
2.1.9	Actividad Antioxidante .....	30
CAPÍTULO III .....		31
MARCO METODOLÓGICO .....		31
3.1.	Ubicación .....	31
3.2.	Equipos y materiales .....	31
3.2.1.	Recursos humanos.....	31
3.2.2.	Materia Vegetal.....	32
3.2.3.	Materiales de Laboratorio .....	32
3.2.4.	Lista de materiales (vidrio, plástico y otros).....	32
3.2.5.	Lista de reactivos.....	33
3.2.6.	Lista de Equipos.....	34
3.2.7.	Metodología .....	34
3.2.7.2.	Obtención de la harina liofilizada de flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	35
3.2.7.3.	Obtención de concentrados proteicos de flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	35
3.2.7.5.	Caracterización de las proteínas de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> por la técnica de Electroforesis SDS-PAGE .....	37
3.2.7.6.	Digestibilidad in vitro Simulación <i>in vitro</i> de la digestión gastrointestinal del concentrado proteico de flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	38
3.3.	Tipo de investigación .....	40
3.3.1.	Investigación Experimental.....	40
3.4.	Hipótesis de prueba o prueba científica.....	40



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

3.4.1. Digestión gastrointestinal in vitro de aislados proteicos de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	40
3.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante de las proteínas de flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	41
3.5. Población o muestra .....	41
3.6. Recolección de información .....	41
3.7. Procesamiento de la información y análisis estadístico .....	41
3.8. Variables respuesta o resultados alcanzados .....	41
CAPÍTULO IV .....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1. Cuantificación y caracterización de las proteínas presentes en las flores y el concentrado proteico de la <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	42
4.1.1. Rendimiento del concentrado proteico de la <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	43
4.2. Simulación de digestibilidad gastrointestinal in vitro en los concentrados proteicos de las flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> . .....	44
4.3 Caracterización de proteínas de la flor liofilizada, concentrado proteico, digeridos gástrico y duodenal mediante electroforesis SDS- PAGE .....	44
4.4 Evaluación de la capacidad antioxidante de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	47
4.5. Verificación de hipótesis .....	49
CAPÍTULO V .....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
5.1. Conclusiones .....	50
5.2. Recomendaciones.....	51
Bibliografía .....	52



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

Anexos..... 60



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Flores comestibles y actividades biológicas .....	23
<b>Tabla 2:</b> Cuantificación de proteína en las flores y concentrado proteico de Begonia comestible .....	42
<b>Tabla 3:</b> Identificación del peso molecular de las proteínas de Begonia x semperflorens-cultorum mediante SDS-PAGE: (A) Flor liofilizada; (B) Concentrado proteico; (C) Concentrado proteico digerido en la fase oral; (D) Concentrado proteico digerido gástrico; (E) Concentrado proteico digerido duodenal.....	45
<b>Tabla 4:</b> Actividad antioxidante ABTS ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ ) .....	47
<b>Tabla 5:</b> Datos y resultados obtenidos de la actividad antioxidante expresada en $\mu\text{mol ET /g}$ muestra de los aislados proteicos obtenidos de la flor Begonia. Método ABTS .....	67
<b>Tabla 6:</b> Datos de absorbancias utilizadas para el análisis de la actividad antioxidante método ABTS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> .....	24
<b>Figura 2:</b> Estructura química de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas (esenciales y no esenciales).....	26
<b>Figura 3:</b> Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida. ....	29
<b>Figura 4:</b> Análisis de proteínas de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> mediante SDS-PAGE. (A) Flor liofilizada; (B) Concentrado proteico; (C) Concentrado proteico digerido en la fase oral; (D) Concentrado proteico digerido gástrico; (E) Concentrado proteico digerido duodenal.....	45



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**Figura 5.** Comparación de medias de la actividad antioxidante de la flor de begonia, flor liofilizada (MB), concentrado proteico (CPB), digestión duodenal (BDD), blanco de la digestión, digestión gástrica (BDG). ..... 48

**Figura 6:** Curva de calibrado de Trolox (0 uM/mL a 500  $\mu$ M/mL) para la determinación de actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de begonia por el método ABTS. .... 69

**ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS**

**Fotografía 1.** Flores *Begonia x semperflorens-cultorum* obtenidas de la empresa Florestible..... 64

**Fotografía 2.** Flores *Begonia x semperflorens-cultorum* Ultracongeladas -80 °C.... 64

**Fotografía 3:** Liofilización de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum*..... 64

**Fotografía 4.** Obtención de la harina de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* ..... 64

**Fotografía 5.** Extracción de concentrados proteicos de *Begonia x semperflorens-cultorum* ..... 65

**Fotografía 6.** Proteína liofilizada de harina de *Begonia x semperflorens-cultorum* . 65

**Fotografía 7.** Cuantificación del contenido de proteína en harina de begonia por el método Dumas. .... 65

**Fotografía 8.** Simulación de la digestión in vitro a Tiempo 0, Digestión gástrica a 120 min y duodenal a 120 min de concentrados proteicos de flores de Begonias..... 65

**Fotografía 9.** Caracterización de la proteína de las flores de begonias, técnica SDS - PAGE..... 65

**Fotografía 10.** Imagen obtenida en el Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20..... 65

**Fotografía 11.** Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de los aislados proteico y matriz de harina de begonia ..... 66



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**Fotografía 12.** Determinación de la actividad antioxidante in vitro. Equipo espectrofotómetro UV/Vis-NANODROP, método ABTS ..... 66

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** Certificado de análisis de cuantificación de proteína en la matriz y concentrado de proteína de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) ..... 60

**ANEXO B:** Curva de calibración de cuantificación de proteína en las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) ..... 61

**ANEXO C:** Curva de calibración de cuantificación de proteína en el concentrado proteico de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) ..... 62

**ANEXO D:** Curva de calibración de EDTA para el equipo Dumas ..... 63

**ANEXO E:** Fotografías de la parte experimental realizada durante la fase experimental..... 64

**ANEXO F:** Datos obtenidos y respuestas experimentales de la determinación de la actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum*..... 67



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**RESUMEN**

Actualmente, las flores comestibles se investigan como una fuente alternativa de proteínas, ya que presentan beneficios tanto en la medicina natural y la alimentación, siendo importante para la nutrición humana. En la presente investigación se ha llevado a cabo la caracterización de proteínas de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) y la evaluación potencial como fuente de péptidos con capacidad antioxidante durante la digestión gastroduodenal *in vitro*. Se obtuvo aislados proteicos a partir de harina de flor, usando un solo pH de solubilización y precipitación, se cuantificó la proteína por el método Dumas y la caracterización se realizó utilizando la técnica SDS-PAGE. Además, se determinó la actividad antioxidante por el método ABTS.

Los concentrados proteicos se obtuvieron a pH 8 de solubilización y pH 2 para la precipitación, alcanzando un rendimiento de 9,75 por ciento y un contenido proteico de 20,3 por ciento. En dicho concentrado se evidenció la presencia de cinco proteínas con pesos moleculares entre 25,83 y 56,94 kDa, logrando identificar fracciones proteicas como Globulinas 7S y Globulinas 11S AB.

Se evaluó el proceso de la digestión gastrointestinal *in vitro*, la cual permitió evaluar la digestibilidad de las proteínas de la flor. En el transcurso de la fase gástrica, la pepsina permitió hidrolizar parcialmente las proteínas, mientras que en la fase duodenal por la acción de la pancreatina las proteínas fueron degradadas por completo. Finalmente, se determinó la actividad antioxidante *in vitro*, correspondiendo el valor más alto (1146.09 más menos 32.11 micro mol Trolox por gramo) al digerido duodenal, lo cual demuestra que los péptidos liberados durante esta fase son los responsables de dicha actividad biológica.

**Palabras claves:** *Begonia x semperflorens-cultorum*, proteína, concentrados proteicos, digestibilidad, actividad antioxidante.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**ABSTRACT**

Currently, edible flowers are being investigated as an alternative source of protein, since they have benefits in both natural medicine and food, being important for human nutrition. In this investigation, the characterization of proteins from the flower of *Begonia x semperflorens-cultorum* (*Begonia* doublet) and the potential evaluation as a source of peptides with antioxidant capacity during *in vitro* gastroduodenal digestion have been carried out. Protein isolates were obtained from flower flour, using a single pH of solubilization and precipitation, quantifying the protein by the Dumas method and the characterization was performed using the SDS-PAGE technique. In addition, the antioxidant activity was determined by the ABTS method.

The protein concentrates were obtained at pH 8 for solubilization and pH 2 for precipitation, reaching a yield of 9.75 percentage and a protein content of 20.3 percentage. In that concentrate, the presence of five proteins with molecular weights between 25.83 and 56.94 kDa was evidenced, identifying protein fractions such as Globulins 7S and Globulins 11S AB.

The *in vitro* gastrointestinal digestion process was evaluated, which allowed evaluating the protein digestibility of the flower. During the gastric phase, pepsin partially hydrolyzed the proteins, while in the duodenal phase, due to the action of pancreatin, the proteins were completely degraded.

Finally, the *in vitro* antioxidant activity was determined, the highest value (1146.09 plus minus 32.11 micro mole Trolox per gram) correspond to the duodenal digest, which shows that the peptides released during this phase are responsible for the biological activity.

**Key words:** *Begonia X semperflorens-cultorum*, protein, protein concentrates, digestibility, antioxidant activity.





**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**CAPÍTULO I**

**EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

**1.1. Introducción**

En varias partes del mundo las flores comestibles son una tradición y se mantienen hasta la actualidad, la florifagia y etnobotánica culinaria, llamado así el consumo de flores, debido a que presentan varios beneficios tanto en la medicina natural y la alimentación. Las flores comestibles están relacionadas con el desarrollo de la humanidad en diferentes zonas geográficas reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como tratamiento de enfermedades. Las flores se usaban por los indígenas de América y la antigua Grecia y Roma (Melillo, 1994) como condimentos y potenciadores del sabor de muchos platos dulces y salados (Albán et al., 2018).

En la actualidad, el surtido de flores comestibles incluye varias decenas de inflorescencias que difieren en forma, color y sabor, y estos se utilizan en todo el mundo para mejorar la apariencia, color y valor nutritivo de las comidas (Kelley et al., 2001). Los alimentos de origen vegetal como las flores pueden llegar a ser fuentes importantes de antioxidantes y tienen un marcado efecto inhibitor sobre los radicales libres (Fu & Mao, 2008), las vitaminas esenciales como carotenoides que aportan y contribuyan a una buena alimentación (Chitrakar et al., 2019). La ingesta de antioxidantes como los polifenoles ha resultado eficaz en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Cao et al., 1997).

En Ecuador las flores comestibles son escasamente utilizadas en la gastronomía, formando parte principalmente de la comida gourmet, pero es importante destacar e incentivar el uso de flores comestibles por su alto contenido de compuestos fitoquímicos y propiedades biológicas beneficiosas, como se ha reportado en varios estudios (Pellegrini et al., 2018)

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

La familia de las begonias, principalmente como planta ornamental, se encuentra ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales, concentrándose su mayor diversidad en el norte de Sudamérica, en Ecuador 29 de las 60 especies que se han encontrado son endémicas y se encuentran amenazadas (Villa-Ruano et al., 2017). Especies como las begonias, tienen pocas poblaciones en su hábitat debido a que son sustituidas por cultivos. El conocimiento de las características y propiedades bioactividades y nutraceuticas impulsaría el cultivo y conservación de estas especies. Un factor relevante es el punto de vista nutricional, la flor se puede dividir en tres componentes principales, el polen es una fuente muy rica en proteínas, aminoácidos y carbohidratos (Parkinson & Pacini, 1995), lípidos saturados e insaturado, carotenoides y flavonoides en pequeñas cantidades (Feas et al., 2012). Como segundo componente el néctar un líquido dulce que contiene una mezcla equilibrada de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa), aminoácidos (principalmente prolina), proteínas, iones inorgánicos, lípidos, ácidos orgánicos, fenólicos sustancias, alcaloides, terpenoides, (Thornburg, 2007). Como último esta lo pétalos y otras partes de las flores pueden ser una fuente importante de compuestos antes mencionados, así como vitaminas (amarillo las flores suelen ser una muy buena fuente de vitamina A), minerales, antioxidantes, etc. (Mlcek & Rop, 2011). La digestión de proteínas tiene un efecto importante en el aumento de la actividad antioxidante al liberar péptidos que presentan esta bioactividad (Santos et al., 2019).

Sin embargo, a pesar de existir varios estudios que reportan el potencial de la actividad antioxidante de flores comestibles, no existe información de la actividad antioxidante determinada en concentrados proteicos y sus digeridos gastrointestinales.

La digestión de proteínas tiene un efecto significativo e importante en el incremento de la actividad antioxidante al liberar péptidos que presentan esta bioactividad (Quinteros Meneses, 2021; R. Vilcacundo et al., 2017).

**1.2. Justificación**

Ecuador al tener alrededor de 250 especies de flores comestibles gracias a su mayor biodiversidad a nivel mundial y riqueza de conocimientos ancestrales, ha permitido contribuir a una alternativa etnobotánica culinaria con posibilidades de industrialización, permitiendo desarrollar matrices alimentarias de productos vegetales (Cárdenas Melgarejo et al., 2007).

En las últimas fechas el consumidor se ha dado la tarea de buscar nuevas alternativas de alimentos, los cuales deben poseer propiedades nutritivas y organolépticas de calidad; donde se evidencia que las tendencias de las familias por adquirir productos de origen vegetal van en aumento (Lara-Cortés et al., 2013).

Las flores se han usado en alimentación desde hace muchos siglos, pero, desde la década pasada ha influenciado en grandes cocineros. Se conoce que pueden aportar beneficios para la salud, a través de la dieta, la cual puede jugar un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante está siendo ampliamente investigada en los últimos años (Lopez et al., 2009).

La digestión gastrointestinal es un proceso fundamental para la salud de los seres vivos, un conjunto de reacciones produce la degradación de los alimentos y la transformación de macromoléculas a moléculas más pequeñas, con la finalidad que exista una fácil absorción en el organismo (Carvajal & Catucuamba, 2019).

Por esta razón, el presente trabajo de investigación está enfocado en caracterizar las proteínas y evaluar la actividad antioxidante de péptidos liberados de las proteínas de flores de *Begonias x semperflorens-cultorum* durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**1.3. Objetivos**

**1.3.1. General**

- Evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos liberados a partir de las proteínas de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) durante la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro*.

**1.3.2. Específicos**

- Aislar y caracterizar las proteínas presentes en las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet).
- Evaluar el cambio en la estructura de las proteínas de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet) tras el proceso de la digestión gastroduodenal *in vitro*.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los péptidos liberados durante la simulación del proceso digestivo *in vitro*.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**CAPÍTULO II**

**ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS**

La comunidad científica tiene un gran interés en estudios de flores o vegetales que presente perspectivas alimentarias y beneficios para la salud humana. Históricamente culturas de china e indígenas de América consumían flores como agentes medicinales ancestrales en tratamientos de dolencia (Altamirano et al., 2014).

En los últimos años, las flores comestibles han ido en aumento gracias a su popularidad y demanda en libros de cocina, artículos científicos y programas de televisión. Debido a las propiedades antioxidantes, antibacteriales y antifúngicas, antiinflamatorias y antitumorales de productos naturales están atrayendo la atención de estudio (Chitrakar et al., 2019)

En la actualidad, las matrices vegetales han descubierto características funcionales que benefician la salud. Diversas investigaciones realizadas en vegetales, han permitido analizar y determinar que las flores poseen efectos nutritivos y seguros para el consumo humano.

En el organismo humano, la producción de las especies reactivas puede controlarse mediante los sistemas de defensa antioxidante. Los antioxidantes está fundamentadas en estudios que presenten estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (Kumari et al., 2021a).

La digestión humana se provoca simultáneamente una ruptura mecánica y luego una hidrólisis enzimática de glúcidos, proteínas y lípidos a través de enzimas presentes en la saliva, estómago y el intestino delgado (Guerra et al., 2012). Los péptidos bioactivos mediante la acción de enzimas digestivas pueden generarse a partir de una proteína precursora. Del mismo modo, durante la digestión gastrointestinal, procesamiento de

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

alimentos; por ejemplo: fermentación, maduración, cocción o hidrólisis *in vitro* con enzimas proteolíticas (Carrasco-Castilla et al., 2012).

El proceso de la digestión juega un papel importante en la sensibilización alérgica. Saber que le sucede a los alérgenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (fragmentación, absorción, biodisponibilidad y conjugación con otras proteínas) es importante para el conocimiento del mecanismo que subyace en las alergias alimentarias (Quinteros Meneses, 2021)

Un gran número de alérgenos alimentarios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre estas proteínas hay ciertas características comunes, se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesado, sobre todo al tratamiento térmico (W. Carrillo et al., 2016; Rincón et al., 2016)

Según Miller & Rice-Evans, (1997), los tratamientos térmicos modifican la estructura de las proteínas. La desnaturalización produce cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de una molécula proteica, en ocasiones la desnaturalización puede ser irreversible dependiendo de la intensidad y duración del tratamiento.

La digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas, se convierte en un instrumento muy útil para la evaluación y estabilidad de los péptidos frente a las enzimas digestivas (Prabawati et al., 2021).

## **2.1. Fundamentación Epistemológica**

### **2.1.1. Flores Comestibles**

Las flores comestibles se definen como no tóxicas, inocuas y con beneficios para la salud en la dieta humana; presentan valores altos de humedad, proteínas y fibra dietética total, las mismas no difieren su contenido de carbohidrato, energía total y cenizas González-Barrio et al., (2018) y aportan sustancias saludables a las personas que consumen, como vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), riboflavina,

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

niacina, calcio, fósforo, hierro y potasio. Además, han contribuido en la estética de los alimentos, Lara-Cortés et al., (2013) con características como aroma exótico, sabor delicado, atractivo visual y potencial fitoquímico. (Pinakin et al., 2020).

Las flores de varias plantas se han considera alimentos funcionales por sus compuestos terapéuticos. Por ejemplo, en los pétalos de rosas (*Rosa* sp.), se encuentra compuestos fenólicos presentes en los compuestos biológicamente activos, asociados a la prevención de enfermedades crónicas que va en aumento entre la población, como se observa en la Tabla 1. Además se asocian con el olor, sabor, color y astringencia de las flores (Fernandes et al., 2020).

**Tabla 1:** Flores comestibles y actividades biológicas

<b>Taxonomía de las Flores</b>	<b>Actividad Biológica</b>
Boca de dragón ( <i>Antirrhinum majus</i> )	Antitrombótica Inmunomodulante Opioide Antioxidante Antihipertensiva
Caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L)	Antiinflamatorio, antiséptico, astringente, infecciones cutáneas y reduce callos y verrugas
Girasol ( <i>Helianthus annus</i> )	Pétalos: fitosterina, betaína, quercetina, colina, pigmentos antociánicos, faradiol, arnidiol, Minerales: fósforo, calcio
Jazmín ( <i>Jasminum officinale</i> )	Previene los dolores de cabeza, tos, antidepresivo, calmante, enfermedades crónicas como el reumatismo. Antioxidante

**Elaborado por:** Rodríguez, P (2022)

**Referencia:** (Prabawati et al., 2021)

A pesar que el consumo de las flores es una práctica muy antigua, existe muy poca información y reglamentación, por lo cual es importante realizar mayor investigación sobre análisis funcionales y actividades biológicas.

### 2.1.2. Origen y distribución de la *Begonia x semperflorens-cultorum*



**Figura 1:** *Begonia x semperflorens-cultorum*

**Fuente:** (Quintana C, 2017).

Las *Begonias x semperflorens – cultorum* proviene de la familia Begoniaceae, se encuentran en los trópicos y subtropicos de la región norte de Sudamérica. En Ecuador existen alrededor de 60 especies, 29 especies son endémicas por ejemplo *Begonia sodiroi*, *B. acerifolia* y *B. tropaeolifolia* consideradas en las Plantas Endémicas del Ecuador (Quintana C, 2017).

Las Begonias se encuentran en las tres regiones de Ecuador como la Amazonía, Sierra y Costa, principalmente sobre los 1000 m de altitud donde están presentes 25 de las 29 especies endémicas (Anacleto et al., 2021).

Las Begoniaceae es una familia escasamente colectada en Ecuador, por lo cual las Begonias se encuentran vulnerables en la vegetación natural, por reemplazos de cultivos (Socha et al., 2021).

Las *Begonias x semperflorens – cultorum*, se las conoce con varios nombres comunes, como flor de azúcar, Begonia de flor o Begonia, poseen tallos carnosos y ramificados, hojas ovales y redondas, pueden ser de color rosa, rojo o blanco con sabor ligeramente a limón, su especie les permite florecer todo el año, su reproducción es por semilla (Lopez et al., 2009)

Las Begonias pueden ser utilizadas como plantas ornamentales o comestibles que favorecen con compuestos biológicos activos, el conocimiento de las propiedades



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

nutracéuticos y bioactividades fomentaría el cultivo y domesticación de estas especies ayudando a su conservación (Nowicka & Wojdyło, 2019)

### **2.1.3. La florifagia**

La florifagia es una actividad antigua pero no muy difundida en la actualidad entre los consumidores, de la cual existe muy poca reglamentación con respecto al consumo y manejo de las flores como alimentos. La Unión Europea (EU), en 1997 constituyó y estableció la normativa de registro de alimentos, pero garantizando el consumo de productos tradicionales que pueden expendirse sin trámites especiales, ya que la seguridad para la salud avala la tradición del producto. Por ende las flores al ser tradicionales y antiguas han entrado en controversia si son o no consideradas alimentos (Pezzarossi, 2004). En varios países como México y Ecuador el Reglamento de Control Sanitario considera a las flores como derivados de frutas y hortalizas, por ende su regulación permite ser importadas o exportadas para consumo (Lara-Cortés et al., 2013).

Las flores además de tener propiedades nutricionales contienen actividades biológicas como los compuestos fenólicos y acciones terapéuticas, por ejemplo la flor de Caléndula que atribuye propiedades antiespasmódica, inmunoestimulante, analgésica entre otras (Kumari et al., 2021a)

### **2.1.4. Proteínas alimentarias**

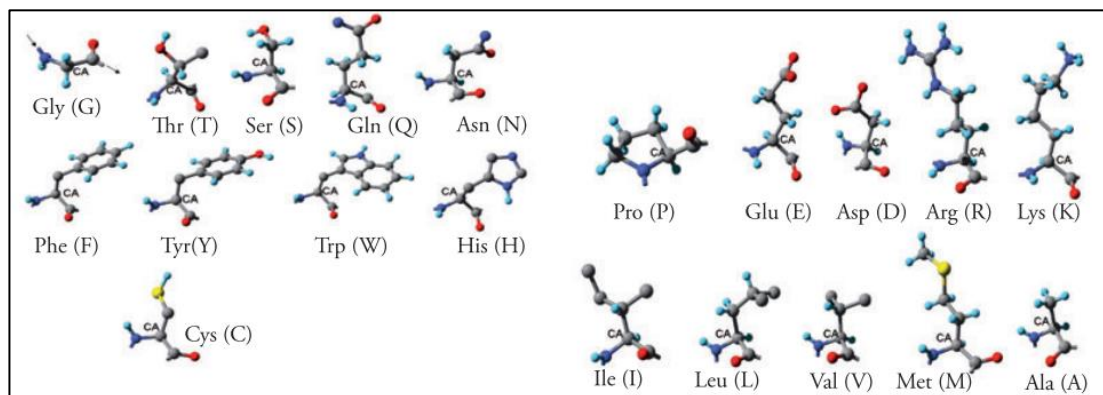
Las proteínas son los componentes esenciales y principales de las células del cuerpo, conjuntamente con los ácidos nucleicos, forman las funciones de los sistemas biológicos de información como transporte, almacenamiento, reconocimiento, estructura y la función catalítica de las enzimas (Bank, 2016).

Las proteínas son definidas como proteínas alimentarias, no tóxicas, con alto valor nutricional, los aminoácidos son las unidades más simples presentes en las proteínas,

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

el orden como se unen los aminoácidos determina el código genético donde puede codificar los 20 aminoácidos, los cuales forman los péptidos, que conforman las cadenas polipeptídica, alcanzado los pesos moleculares y determinar las funciones de las proteínas (Bank, 2016).

Los aminoácidos se clasifican en dos grupos diferentes, 9 aminoácidos esenciales y 11 aminoácidos no esenciales, los cuales son: esenciales (valina, isoleucina, treonina, lisina, triptófano, histidina, metionina, fenilalanina y leucina) y no esenciales (tirosina, alanina, ácido aspártico, cisteína, , arginina, glutamina, glicina, prolina, ácido glutámico, serina y asparragina) (Kamdem & Tsopmo, 2019).



**Figura 2:** Estructura química de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas (esenciales y no esenciales)

**Fuente:** (Kamdem & Tsopmo, 2019)

Las proteínas alimentarias, presentan una calidad nutricional dependiendo la concentración de los aminoácidos esenciales y la digestibilidad del alimento en la dieta. Los aminoácidos son esenciales cuando están presentes en porciones adecuadas para satisfacer las necesidades metabólicas, por lo cual es indispensable ingerir proteínas en la dieta alimentaria. Las proteínas contribuyen en el transporte de nutrientes como vitaminas, minerales y grasas, etc (Pezzarossi, 2004).

### **2.1.5. Concentrados proteicos**

Según Martínez et al., (2011) los concentrados proteicos, pueden ser obtenidos de vegetales que se utilicen como ingredientes de productos funcionales, para productos en las industrias de alimentos, farmacéuticas o cosméticas.

Los aislados proteicos se obtienen aplicando tratamientos para eliminar oligosacáridos, polisacáridos u algunos otros componentes por ejemplo azúcares, lípidos y fibra que no son de origen peptídicos donde se aplica solubilización alcalina, posterior una precipitación ácida controlando diferentes parámetros como el pH y temperatura hasta alcanzar el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, método que permite el enriquecimiento de la proteína requerida, utilizada por su facilidad de estudio y el mejoramiento de la digestibilidad en el producto final (E. Vilcacundo et al., 2019).

### **2.1.6 Métodos de cuantificación de proteína**

Para determinar la concentración de proteínas en una muestra vegetal, se utiliza técnicas de rutinas básicas que purifican una proteína en concreto, que permiten conocer actividades específicas de una preparación enzimática, facilitando diagnósticos de enfermedades u otros propósitos.

Existen diferentes métodos para cuantificar las proteínas, basados en las propiedades o en los criterios técnicos utilizados por ejemplo, la capacidad de unirse a ciertos colorantes, la concentración de proteínas, la formación de derivados químicos o las propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz ultravioleta (UV), en la investigación realizada se aplicó el método Dumas (Fernández & Galván, 2006).

### **2.1.6.1 Método Dumas**

El método Dumas, denominado el método de combustión inventado por Jean Baptiste Dumas en el año 1883, este método permite determinar la cantidad de nitrógeno y proteínas misma que garantiza resultados confiables reconocidos por Association of Analytical Communities (AOAC), Asociación Estadounidense de Química Clínica (AACC), International Organization for Standardization. (ISO), American Society of Brewing Chemists (ASBC), American Oil Chemists' Society (AOCS), etc.

Consiste en utilizar muestras bien homogéneas, calentadas una temperatura donde se provoque una combustión en presencia del oxígeno. Esta mezcla conduce a la liberación de agua, nitrógeno y dióxido de carbono. Los gases que pasan circulan sobre columnas especiales que absorben el dióxido de carbono y agua, que ingresan a una cámara de reducción térmica, en este paso convierten los óxidos en nitrógeno elemental y se recoge el sobrante de oxígeno y eliminan el agua residual y el dióxido de carbono, para medir el contenido total de nitrógeno restante (Ramírez-guerrero, 2016).

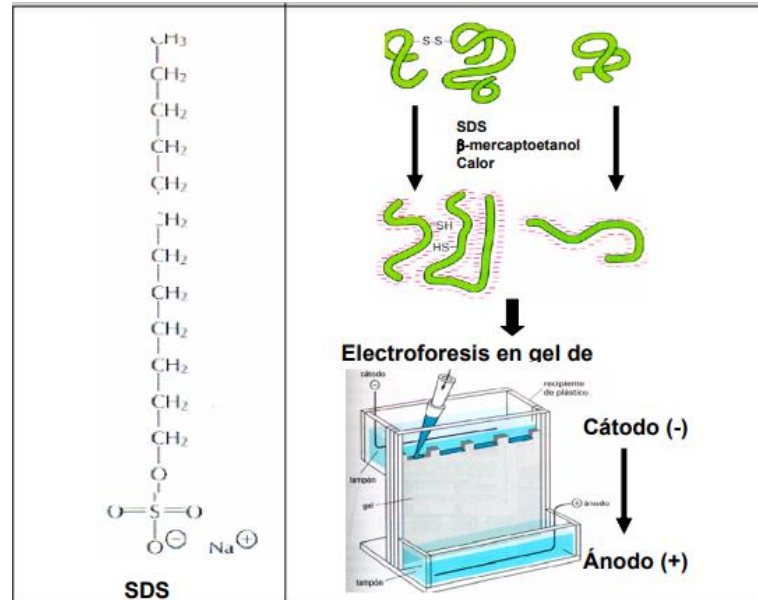
### **2.1.7 Digestibilidad de Proteínas**

El organismo humano al ser un sistema muy complejo ha desarrollado métodos para descomponer los alimentos y extraer las sustancias o nutrientes que necesita para una salud adecuada. Para simular estos procesos, se ha desarrollado simulaciones *in vitro* de la digestibilidad gastrointestinal (Samaniego et al., 2020).

Los métodos *in vitro* de digestión gastrointestinal simulada, hace énfasis en la ingesta de alimentos que sufren cambios fisicoquímicos que incluyen la digestión bucal, gástrica y duodenal gástrica, tratando de imitar las condiciones fisiológicas del ser humano, teniendo en cuenta las concentraciones de sal, pH, presencia de enzimas digestivas entre otras. Estos métodos *in vitro* tiene la ventaja de ser menos costosos, más rápidos y sin restricciones éticas (Minekus et al., 2014).

### 2.1.8 Caracterización de Proteínas por Electroforesis

La técnica de electroforesis (Electroforesis en poliacrilamida en presencia de dudosil sulfato de sodio) SDS - PAGE, permite la separación de proteínas según el peso molecular de una determinada muestra, moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico, y un soporte sólido que va a retener la proteína. Es necesario romper los puentes disulfuros, mediante un agente reductor como generalmente se utiliza 2-mercaptoetanol. Para colocar la muestra en el gel, se añade un agente más denso como glicerina o sacarosa, además se añade un colorante azul de Coomassie, se aplica corriente hasta que el colorante esté a poca distancia del extremo inferior del gel, teniendo la seguridad que ninguna macromolécula ha salido del gel. Cuando ha culminado la electroforesis, se puede observar que las moléculas más pequeñas llegan al conocido ánodo y con el apoyo de la tinción se observa con facilidad el revelado (Wilman Carrillo et al., 2016).



**Figura 3:** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

**Fuente:** (Maldonado-Alconada & Jorin-Novo, 2001)

### **2.1.9 Actividad Antioxidante**

Los alimentos en las últimas décadas han dado un giro en su enfoque saludable que brinde beneficios para las personas, gracias a las investigaciones se ha determinado que los alimentos están compuestos por un gran número de péptidos bioactivos provenientes de las proteínas funcionales, capaces de ejercer efectos en el sistema inmune, cardiovascular o el tracto gastrointestinal. Varios péptidos y proteínas han sido estudiados para tratamiento de enfermedades dentales, la hipertensión, la trombosis, o de inmunodeficiencias aportando beneficios al consumidor (R. Vilcacundo et al., 2017).

La presencia de antioxidantes en alimentos como frutas y verduras se ven relacionadas con beneficios para la salud humana, debido que proporcionan compuestos bioactivos, una amplia variedad de fitoquímicos y actividad antioxidante que proporcionan beneficios para la salud. Los antioxidantes naturales no solos protegen el sistema biológico, también protegen la calidad de los alimentos (Martínez-Navarrete et al., 2008).

El estrés oxidativo se asocia con las células y la acción de un radical libre que afecta y produce un desequilibrio en la producción de sustancias nocivas en el organismo u otras especies que producen mecanismos antioxidantes. Además, puede provocar varias enfermedades degenerativas como artritis o mal de parkinson. Los compuestos antioxidantes juegan un papel importante en la salud del ser humano, como sustancias protectoras de los radicales libres (Pires et al., 2021).

El estrés oxidativo afecta al ADN (Ácido desoxirribonucleico) donde pueden ocurrir mutaciones y transformar las células buenas en cancerosas, que perjudican la parte gástrica o la vejez prematura (Mlcek & Rop, 2011).



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**CAPÍTULO III**

**MARCO METODOLÓGICO**

**3.1. Ubicación**

La parte experimental se desarrolló en los Laboratorios de Alimentos funcionales del Centro de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato y en los Laboratorios del Centro de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Los reactivos, materiales y equipos fueron proporcionados a través del fondo económico del proyecto de investigación del director de la tesis y del fondo económico que posee la maestría.

**3.2. Equipos y materiales**

Los materiales, equipos y reactivos para la investigación de caracterización de proteínas de flores de *Begonias x semperflorens-cultorum* (*Begonia doublet*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antioxidante durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* se detallan a continuación:

**3.2.1. Recursos humanos**

**Autora:**

- Ingeniera, Paulina Elizabeth Rodríguez Bombón

**Director del proyecto de investigación:**

- Ingeniero, Vilcacundo Chamorro Rubén Darío, PhD

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**3.2.2. Materia Vegetal**

Se trabajó con 1200 gramos de flores rojas orgánicas comestibles de *Begonia x semperflorens-cultorum* que fueron adquiridas frescas, en Quito en el mes de Julio del 2021, en la empresa Florestibles misma que se dedica a la comercialización de flores para uso gastronómico. Las flores fueron conservadas y ultracongeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, para proceder a ser liofilizadas en un liofilizador Christ Alpha 1-4 LSCbasic por 48 horas y pulverizadas en un molino Retsch con un tamaño de partícula de 0.2 mm. Estas muestras fueron conservadas en fundas ziploc a temperatura de refrigeración para proceder a los análisis correspondientes.

**3.2.3. Materiales de Laboratorio**

Los reactivos, materiales y equipos fueron proporcionados a través del fondo económico del proyecto de investigación del director de la tesis, y del fondo económico que posee la maestría. A continuación, se detalla la lista de materiales (vidrio, plástico y otros), reactivos y equipos que se utilizó durante la investigación.

**3.2.4. Lista de materiales (vidrio, plástico y otros)**

- Vasos de precipitación de 10, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraz aforado de 5, 10, 15, 25 ml.
- Probetas de 10, 100, 500 ml.
- Espátula
- Pinzas
- Tubos falcon de 50 ml
- Tubos Eppendorf de 2 ml
- Magnetos
- Puntas de 200 y 1000  $\mu\text{L}$
- Micropipetas de 100- 100 - 1000  $\mu\text{L}$
- Tubos de vidrio de 15 ml con tapa rosca
- Gradillas





**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

- Varillas de agitación

**3.2.5. Lista de reactivos**

- Hidróxido de sodio NaOH (Merck)
- Ácido clorhídrico HCl (Merck)
- Pancreatina (Sigma- pancreatin)
- Pepsina porcina (Sigma- Pepsin)
- $\alpha$  amilasa (Sigma-Aldrich)
- Billis (Sigma-Aldrich)
- Persulfato de amonio (PSA) (BIO-RAD)
- Extracto de bilis (Sigma- Aldrich)
- Cloruro de potasio KCL (Merck)
- Fosfato de dihidrógeno de potasio  $KH_2PO_4$  (Merck)
- Fosfato de sodio di básico y monobásico
- Tris- HCl (Sigma- Aldrich)
- Tris-base (Merck)
- SDS (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- Cloruro de magnesio hexahidratado  $MgCl_2(H_2O)_6$  (Merck)
- Glicerol (Invitrogen)
- Glicerina (ISOLAB)
- Azul de bromofenol (Thermo Scientific™)
- Azul de Coomasie- R250 (BIO-RAD)
- $\beta$ - mercaptoetanol (Merck)
- Tetramethylethylenediamine Temed (Merck)
- Estándar de proteínas (BIO-RAD 10 a 250 kDa)
- Metanol (Merck)
- Ácido acético (Merck)
- Solución de ABTS

### **3.2.6. Lista de Equipos**

- Molino (Retsch)
- Equipo de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra System Bio-Rad)
- Agitador (VWR)
- Fotodocumentador (GelTower de Analytik Jena)
- Balanza Analítica (VWR-224AC)
- Plancha de agitación y calentamiento (Isotemp Fisher Scientific)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Microcentrífuga (Labnet 5702 eppendorf)
- Girador Orbital (Thermo Scientific)
- pH-metro (HANNA modelo HI 2221)
- Congelador (Panasonic)
- Ultracongelador (Panasonic)
- Refrigerador (Indurama Modelo RI-470 y Mabe)
- Agitador vórtex (VWR)
- Liofilizador (Christ Alpha 1-4 LSCbasic)
- Equipo Dumas (ELEMENTAR)
- Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.
- Vortex Mixer VWX

### **3.2.7. Metodología**

#### **3.2.7.1. Liofilizado de flores *Begonia x semperflorens-cultorum***

Para iniciar el proceso de liofilización es necesario acondicionar las flores comestibles de *Begonias x semperflorens-cultorum*, debido que una vez que inicie la transformación, las flores no pueden ser manipuladas. Se pesó 1200 gramos de que se almacenó en fundas ziploc, para congelar el producto por ultracongelación en un equipo marca PANASONIC a -80°C por dos días. Posteriormente se realiza la

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

liofilización en un Liofilizador marca Christ Alpha 1-4 LSCbasic por tres días aproximadamente, para garantizar la calidad de la materia prima, cuyo objetivo es extraer alrededor del 95% del agua contenida en las flores, preservando las características organolépticas y nutritivas del producto.

**3.2.7.2. Obtención de la harina liofilizada de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum***

Para obtener la harina de la materia prima, se pesó aproximadamente 95,5 gramos de las flores liofilizadas que posteriormente fueron pulverizadas las muestras en un molino Retsch con un tamaño de partícula de 0.2 mm, obteniendo una harina libre de impurezas apta para los análisis correspondientes. El peso del polvo de las flores de begonias fue 94 gramos, almacenadas a una temperatura de refrigeración 4°C en fundas herméticas ziploc, para evitar el contacto con la humedad.

**3.2.7.3. Obtención de concentrados proteicos de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum***

La extracción de proteínas de las flores de begonias se realizó por su punto isoeléctrico, siguiendo el método descrito por Martínez & Añón, (1996) con ligeras modificaciones. La relación de trabajo harina: solvente fue de 1:90 (P/V), se pesó 10 g de harina de begonia y se diluyó en 900 ml de agua destilada, la mezcla se agitó durante 30 minutos, 400 RPM y a temperatura ambiente. Durante la agitación se ajustó el pH a 8.00 con NaOH 2N. Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro marca HANNA modelo HI 2221.

Las proteínas solubilizadas se centrifugaron durante a 5 °C, 8000 RPM por 20 min, utilizando una centrífuga marca Eppendorf. Se obtuvo la muestra centrifugada y se utilizó el sobrenadante para precipitar la parte proteica, empleando 2N de HCl para ajustar a un pH 2.0, se repiten los procesos de agitación y centrifugación descritos



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

anteriormente. Finalmente, el precipitado se colocó en un frasco de liofilización, almacenados a temperatura de -80 °C durante 72 horas en un ultracongelador, para posterior liofilización, los concentrados proteicos se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

El cálculo del rendimiento del concentrado proteico se lo realizó bajo la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

**Siendo:**

**% R=** Porcentaje de rendimiento del concentrado proteico del geranio

**Pf:** Peso final del precipitado después del proceso de liofilización

**Pi:** Peso inicial de la harina de la begonia liofilizada

#### **3.2.7.4. Cuantificación de proteína de Concentrados Proteicos – Método Dumas**

La cuantificación de proteína en la harina de flor y el concentrado proteico se realizó mediante el método Dumas descrito por Carvajal & Catucuamba, (2019). Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos LACONAL de la Universidad Técnica de Ambato

Se elaboró una curva de calibración con EDTA, véase Anexo D. Finalmente se procedió alrededor de 20 a 25 miligramos de la harina y concentrado proteico, se colocó en el equipo y se analizó.

### **3.2.7.5. Caracterización de las proteínas de *Begonia x semperflorens-cultorum* por Electroforesis SDS-PAGE**

Las proteínas se caracterizaron siguiendo el protocolo de Laemmli, (1970) por la técnica analítica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE) con ligeras modificaciones, se utilizó un estándares (2 kDa a 250 kDa) de proteínas de pesos moleculares conocidos. Los equipos y reactivos utilizados en esta técnica fueron de marca BIO-RAD.

#### **Preparación de la muestra**

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

#### **Separación electroforética**

La SDS-PAGE se realizó con gel concentrador de 4 % de poliacrilamida y gel separador de 12 % de poliacrilamida, con un espesor cada uno de 1mm en un equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra System Bio-Rad. Se utilizó reactivos de electroforesis en cantidades establecidas por el método. En el proceso de gelificación de los dos geles se añadieron los peines para formar pocillos.

En los geles se inyectó 20 uL de muestra y estándar en cada pocillo. La cámara se llenó con buffer running y se realizó la corrida con parámetros 200V por 40 min.

#### **Tinción y análisis del gel**

Al culminar el proceso de electroforesis, los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie G-250 durante 12 horas y posterior se desteñir durante 4 horas con solución de metanol y ácido acético. Los geles fueron fotografiados en el equipo fotodocumentador GelTower de Analytik Jena y los pesos moleculares relativos se calcularon con el software VisionWorks 8.20, comparando con el estándar de proteínas.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**3.2.7.6. Digestibilidad in vitro Simulación in vitro de la digestión gastrointestinal del concentrado proteico de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum***

Para el análisis de la simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro se utilizó el método descrito por Minekus et al., (2014) con ciertas modificaciones.

**3.2.7.6.1. Preparación de los fluidos de la digestión**

- 1. Simulador fluido salival (SFS):** En esta fase se elaboró el SFS a un pH 7,0; mezclando 74 µl de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 302 µl de KCl, 10 µl de  $\text{MgC}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ , 136 µl de  $\text{NaHCO}_3$  con agua tipo 2.
- 2. Simulador de fluido gástrico (SFG):** Se preparó el SFG a un pH 3,0 se mezcló los reactivos, las cantidades de 45 µl de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 590 µl de NaCl, 345 µl de KCl, 20 µl de  $\text{MgC}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ , 625 µl de  $\text{NaHCO}_3$  con agua tipo 2.
- 3. Simulador de fluido intestinal (SFI):** Se obtuvo el SFI a un pH 7,0; se mezcló los reactivos, 340 µl de KCl, 2125 µl de  $\text{NaHCO}_3$ , 480 µl de NaCl, 55 µl de  $\text{MgC}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ , 40 µl de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con agua tipo 2 ajustando a un pH.

**3.2.7.6.2. Fase Oral**

Para la fase oral se utilizó 5 gramos de muestra de concentrado proteico de *Begonia x semperflorens-cultorum* se mezcló con 3.5 mL de fluido salival simulado (FSS), a esta mezcla se le añadió 0.5 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa de 1500 U/mL ( $\alpha$ -amilasa de saliva humana, tipo XIII-A, liofilizada, 300-1500 unidades/mg proteína, Sigma Aldrich), se dejó reaccionar durante 2 minutos en agitación a 37°C y 500 rpm.

**3.2.7.6.3. Digestión gástrica in vitro**

En la fase gástrica, se utilizó el producto de la fase anterior se mezcló con 7.5 mL de fluido gástrico simulado (FGS), 1.6 mL de pepsina porcina de 2500 U/mL (pepsina de mucosa gástrica porcina 3200–4500 U/mg proteína, Sigma Aldrich), se dejó reaccionar durante 2 horas a pH 3.0 en agitación constante y se incubó a 37°C por 200 rpm en el Termoagitador Orbital Termo Scientific.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**3.2.7.6.4. Digestión duodenal *in vitro***

En la fase intestinal, el producto de la fase anterior se mezcló con 11 mL de fluido intestinal simulado (FIS), 5 mL de pancreatina de 800 U/mL (pancreatina de páncreas porcino, Sigma Aldrich), 2.5 mL de bilis 160 mM (Extracto de bilis porcina, Sigma Aldrich). Se dejó reaccionar durante 2 horas a pH 7.0. Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C y se detuvieron por calentamiento a 80 °C por 5 minutos.

Finalmente, cada uno de los digeridos fueron almacenados a -80 °C por dos días, para ser liofilizados y conservados a -20 °C para su respectivo análisis. La evaluación del grado de digestibilidad de las proteínas de begonias se realizó mediante la aplicación de la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

**3.2.7.7. Actividad Antioxidante mediante el método ABTS**

La actividad antioxidante se realizó con el método descrito por (Piñuel et al., 2019) con modificaciones. Se preparó la solución de trabajo ABTS mediante la mezcla de Buffer Tampón Fosfato de sodio ajustado a pH 7.0, ABTS y persulfato de potasio marca SIGMA ALDRICH.

Se realizaron los extractos de la harina de flor, concentrado proteico y sus digeridos gástricos. Se pesó 300 mg de muestra, se añadió 5 mL de solución extractora (64 mL H<sub>2</sub>O, 150 mL de etanol y 15 µL de ácido fórmico) y se agitó durante 10 minutos, las muestras se introdujeron en un baño ultrasónico por 10 minutos y finalmente se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos. Se separó el sobrenadante en balones de aforo ámbar de 25 mL. Este procedimiento se repitió 5 veces.

Se colocó 100 µL de los extractos en tubos eppendorf de 2 mL, se agregó 1900 µL de solución de ABTS (compuesta de ABTS 7 mM y K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2.45 mM, en proporción 1:1). Los tubos se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar por 45 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. Se realizó una curva de calibración con Patrón Trolox en concentraciones de 200  $\mu\text{mol}$  a 600  $\mu\text{mol}$ , para la determinación de las concentraciones.

### **3.3. Tipo de investigación**

La investigación que se realizará es tipo experimental, con enfoque mixto debido uso de datos cualitativos y cuantitativos.

#### **3.3.1. Investigación Experimental**

Se adquirieron flores comestibles de *Begonia x semperflorens-cultorum* de la empresa Florestibles ubicada en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. Se controló y analizó una o más variables en el proceso de la caracterización de las proteínas de las flores y su potencial fuente de péptidos, recopilando información para generar el experimento deseado de un tema poco investigado.

Por lo tanto, se analizaron 6 tratamientos. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete de Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.03.

### **3.4. Hipótesis de prueba o prueba científica**

#### **3.4.1. Digestión gastrointestinal in vitro de aislados proteicos de *Begonia x semperflorens-cultorum***

##### **Hipótesis**

**H<sub>0</sub>**= El concentrado proteico de *Begonia x semperflorens-cultorum* no es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

**H<sub>a</sub>**= El concentrado proteico de *Begonia x semperflorens-cultorum* es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.





**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**3.4.2. Evaluación de la actividad antioxidante de las proteínas de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum***

**Hipótesis**

**H<sub>0</sub>**= Los digeridos gástricos y duodenales no presentan actividad antioxidante

**H<sub>a</sub>**= Los digeridos gástricos y duodenales presentan actividad antioxidante

**3.5. Población o muestra**

La población será 1200 gramos de flores de begonias liofilizadas.

La muestra será 1 gramo para cada ensayo que se realizó

**3.6. Recolección de información**

Los instrumentos y las técnicas que se utilizará en la liberación de péptidos con capacidad antioxidante a partir de proteínas de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* durante la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro* están descritas con detalle en la metodología 3.2.7 del documento.

**3.7. Procesamiento de la información y análisis estadístico**

Para cada prueba, se realizó al menos tres réplicas con muestras preparadas en diferentes días. Se realizará un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación Tuckey serán aplicadas a un nivel de confianza del 95% en el programa Stat Graphics, para la identificación de diferencias significativas entre los tratamientos.

**3.8. Variables respuesta o resultados alcanzados**

**Variable independiente:** digestión gastrointestinal *in vitro*

**Variable dependiente:** péptidos bioactivos con actividad antioxidante

**CAPÍTULO IV**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**4.1. Cuantificación y caracterización de las proteínas presentes en las flores y el concentrado proteico de la *Begonia x semperflorens-cultorum***

*Tabla 2: Cuantificación de proteína en las flores y concentrado proteico de Begonia comestible*

<b>Muestra</b>	<b>Parámetros</b>	<b>Unidad</b>	<b>Resultados</b>	<b>Método</b>
Flor de begonia comestible	Proteína	% (N x 6,25)	10,50	Dumas
Concentrado proteico de Begonia comestible	Proteína	% (N x 6,25)	20,30	Dumas

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)

**Fuente:** Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos LACONAL

En la tabla 2 se puede observar que la flor liofilizada y molida tiene un contenido de proteína de 10,50% cuantificado a través del método Dumas. Fernandes et al., (2017) y Lara-Cortés et al., (2013) indican que las flores comestibles como la Calendula (*Calendula officinalis*), la Cuaresma (*Euphorbia radians*) y Gasparito (*Erythrina caribaea*) contiene 13,6, 25,1 y 27,4 g/100 de proteína respectivamente, deduciendo que en las flores comestibles se puede encontrar un alto contenido de proteínas y las begonias no son la excepción. En el concentrado proteico de las flores de begonia a un pH de precipitación de 2,0 se obtuvo un porcentaje de 20,30 %, lo cual indica que el método puede ser mejorado utilizando diferentes pHs de solubilidad y precipitación. El resultado obtenido en la concentración no fue comparado, por cuanto no se ha encontrado trabajos relacionados con aislamiento de proteínas a partir de flores.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

Kumari et al., (2021b), indica que una flor debe cumplir con ciertos parámetros nutrimentales y de calidad para que se considere proteica, estableciendo que la flor *Begonia x semperflorens-cultorum* cumple con estas características.

**4.1.1. Rendimiento del concentrado proteico de la *Begonia x semperflorens-cultorum***

El concentrado proteico de las flores *Begonia x semperflorens-cultorum* se obtuvo por precipitación isoeléctrica y se determinó el rendimiento.

El cálculo del rendimiento del concentrado proteico se lo realizó bajo la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{P}{P_i} \times 100$$

$$\% R = \frac{3,90 \text{ g de concentrado proteico liofilizado}}{40 \text{ g de harina de flores de begonia liofilizada}} \times 100$$

$$\% R = 0,0975 \times 100$$

$$\% R = 9,75$$

La obtención del rendimiento del concentrado de proteína de flor de *Begonia x semperflorens-cultorum* a un pH de precipitación de 2,0 fue de 9,75 %. La extracción de concentrados proteicos por precipitación isoeléctrica, están relacionados principalmente con la pureza de los reactivos para ajustar el pH, la solubilidad de las proteínas que se incrementa en circunstancias de pH alcalino y con una alta fuerza iónica que permite la extracción proteica con mejores rendimientos. Es importante recalcar que la concentración de nitrógeno en el suelo permite el ascenso o descenso de la síntesis de proteínas.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**4.2. Simulación de digestibilidad gastrointestinal *in vitro* en los concentrados proteicos de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum*.**

Las proteínas hidrolizadas del concentrado proteico de la flor de *Begonia* se obtuvieron mediante un proceso de hidrólisis enzimática, aparentando las condiciones fisiológicas del sistema gastro duodenal humano. Según Pellegrini et al., (2018) y Viva, (2014) las proteínas son los componentes esenciales de las células, cuya función depende de la concentración de aminoácidos, la digestibilidad y biodisponibilidad de las mismas. Por su parte Minekus et al., (2014) indican que el método *in vitro* de digestión gastrointestinal simulada, hace énfasis en la ingesta de alimentos que sufren cambios fisiológicos durante la digestión bucal, gástrica y duodenal, siendo importante la presencia de sales, concentración de las enzimas digestivas, tiempo de digestión, pH, entre otros. Por tal motivo, en este estudio se determinó el posible grado de digestibilidad *in vitro* del concentrado proteico de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum*, utilizando las enzimas pepsina y pancreatina, tras ser sometidas a 120 minutos digestión gástrica (DG) y 120 minutos digestión duodenal (DD) de manera secuencial.

**4.3 Caracterización de proteínas de la flor liofilizada, concentrado proteico, digerido gástrico y duodenal mediante electroforesis SDS- PAGE**

La harina de la flor de *Begonia*, concentrado proteico y los hidrolizados provenientes de la digestión gastroduodenal *in vitro*, fueron caracterizados utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS – PAGE). Dicha técnica permitió analizar las proteínas de acuerdo al peso molecular (PM) como se observa en la figura 4. Se utilizó un estándar de proteínas de precisión con pesos moleculares comprendidos entre 10 a 250 kDa (**BIO RAD**). Se puede visualizar la presencia de proteínas en las siguientes muestras: harina de flor [A], concentrado proteico [B] y digerido oral [C], las mismas que fueron teñidas con azul de coomassie.

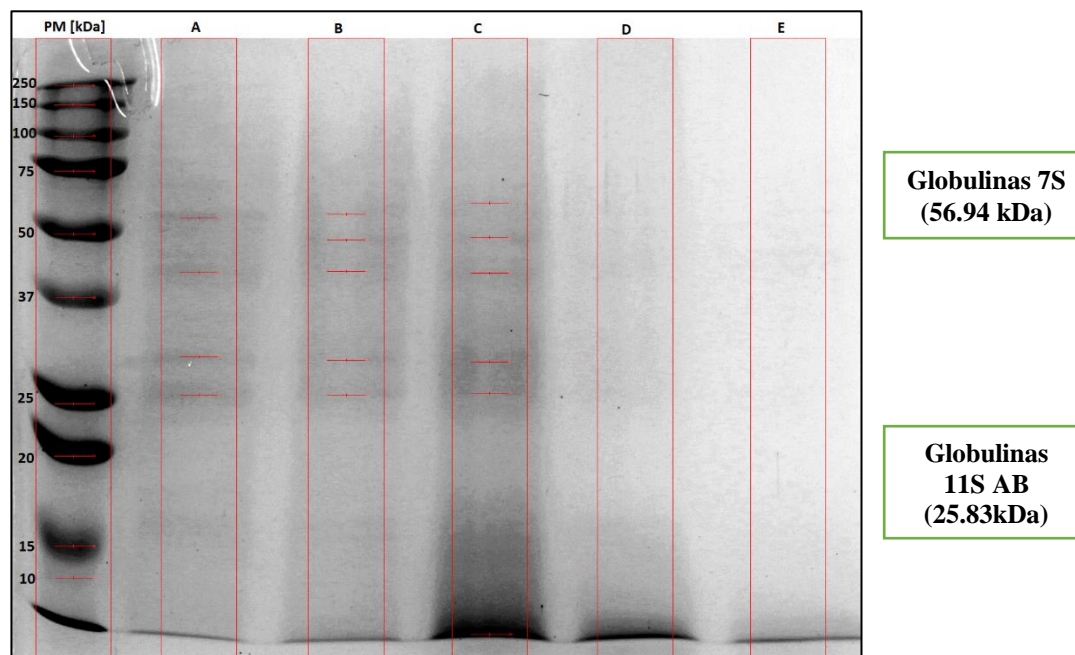
**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**Tabla 3:** Identificación del peso molecular de las proteínas de *Begonia x semperflorens-cultorum* mediante SDS-PAGE: (A) Harina de flor; (B) Concentrado proteico; (C) Fase oral; (D) Digerido gástrico; (E) Digerido duodenal.

Band	PM	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]
1	250 kD	56.94	56.94	56.94	---	---
2	150 kD	41.71	49.31	49.31		
3	100 kD	29.76	41.71	41.71		
4	75 kD	25.83	29.76	29.76		
5	50 kD		25.83	25.83		
6	37 kD					
7	25 kD					
8	20 kD					
9	15 kD					
10	10 kD					

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)

**Fuente:** Laboratorios de Investigación y Vinculación Universidad Estatal de Bolívar



**Figura 4:** Análisis de proteínas de *Begonia x semperflorens-cultorum* mediante SDS-PAGE. (PM) Estándar, (A) Harina de flor; (B) Concentrado proteico; (C) Fase oral; (D) Digerido gástrico; (E) Digerido duodenal.

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)

**Fuente:** Laboratorios de Investigación y Vinculación Universidad Estatal de Bolívar

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

Las proteínas son los componentes nutricionales de mayor importancia en la dieta humana, estas son procesadas en el aparato digestivo, donde los péptidos o aminoácidos son liberados, absorbidos y transportados al torrente sanguíneo.

En el presente estudio como se observa en la figura 4 y tabla 3 se puede analizar el perfil de proteínas de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum*, con bandas que se encuentran entre pesos moleculares de 56,94 kDa y 25,83 kDa. Según Orozco et al., (2016) indican que en matrices vegetales se pueden encontrar proteínas como albúminas (ALB), globulinas (GLB), glutelinas (GLT) y prolaminas (PRO). En el caso de la flor de begonia, concentrado proteico y el digerido de la fase oral (columna B y C) se observa la presencia de 5 tipos de proteínas con pesos moleculares de 56.94, 49.31, 41.71, 29.76 y 25.83 kDa; en la harina de flor (columna A) se evidencia 4 tipos de proteínas (56.94, 41.71, 29.76 y 25.83 kDa). En el digerido gástrico (columna D) y en digerido duodenal (columna E), se observa la ausencia de bandas proteicas las mismas que han sido hidrolizadas, demostrando que la digestión es total.

Según Vilcacundo et al., (2017) exterioriza que las globulinas son clasificadas y consideradas como proteínas de reserva, por lo tanto las globulinas 7S son un grupo de glicoproteínas con pesos moleculares entre 42 a 58 kDa. Por otra parte, Mudgil et al., (2019) manifiesta que las globulinas 11S se caracterizan por poseer conjuntos de polipéptidos y dividirse en dos tipos: subunidad ácida o AS cuyos pesos moleculares se encuentran entre 30 y 40 kDa y la subunidad básica o AB con pesos moleculares entre 20 - 25 kDa. En el presente estudio se evidencia que dos de las proteínas identificadas podrían corresponder al grupo de las Globulinas 7S (56.94 kDa) y 11S AB (25.83 kDa) (Figura 4).



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**4.4 Evaluación de la capacidad antioxidante de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.**

Hartmann & Meisel, (2007) y Kamdem & Tsopmo, (2019) manifiestan que los fragmentos de péptidos bioactivos se encuentran inactivados dentro de la secuencia de las proteínas y necesitan proteasas digestivas, químicos hidrolizantes o microorganismos proteolíticos para liberarse. Los péptidos derivados de matrices alimentarias de origen vegetal, brindan una amplia gama de actividades biológicas tales como antioxidante, antiinflamatoria o modulación del sistema inmunológico, esto gracias a la secuencia aminoacídica y la capacidad de enlazar elementos.

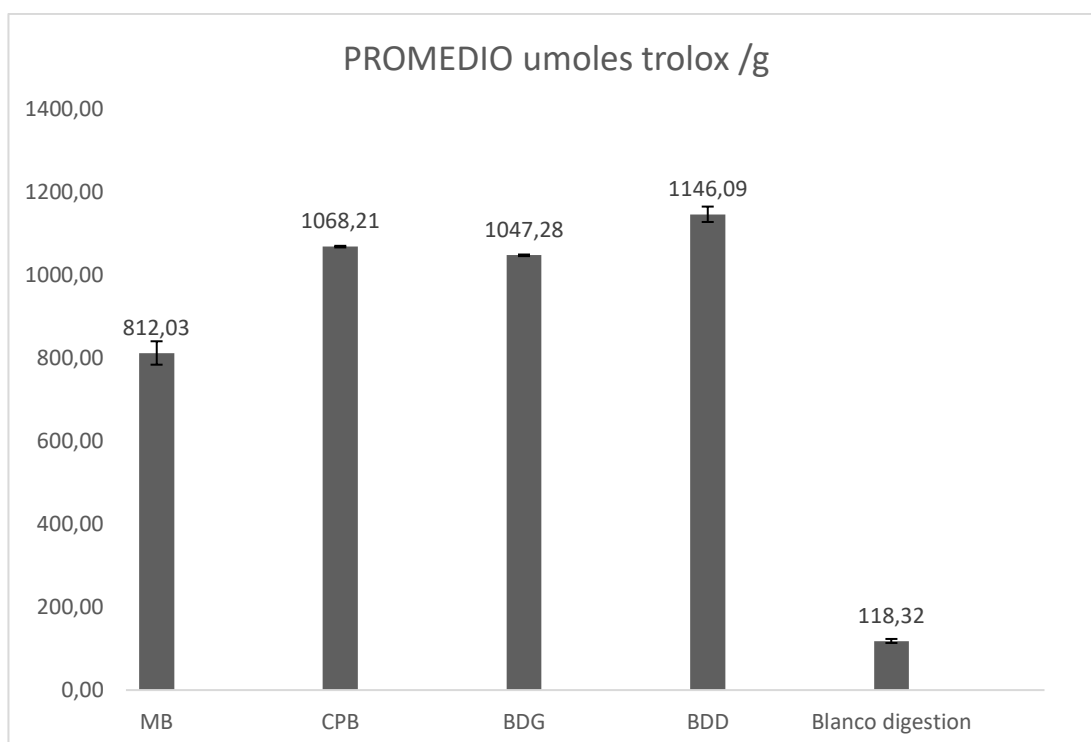
En el presente estudio se evaluó la capacidad antioxidante de la matriz, concentrado proteico y los digeridos gástrico y duodenal, mediante el método ABTS

En la tabla 4 y figura 5 se observa los datos obtenidos de actividad antioxidante, expresado en  $\mu\text{mol}$  de Trolox por gramo de las diferentes muestras estudiadas. Los resultados fueron expresados con su desviación estándar y analizados por ANOVA de un factor y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Las diferencias estadísticas se indican con diferentes letras.

**Tabla 4:** Actividad antioxidante ABTS ( $\mu\text{mol}$  Trolox/g)

<b>Muestra</b>	<b><math>\mu\text{mol}</math> Trolox /g</b>
Harina de Flor	812.03 $\pm$ 48.81 <sup>a</sup>
Concentrado proteico	1068.21 $\pm$ 3.35 <sup>b</sup>
Digerido, fase gástrica	1047.28 $\pm$ 3.35 <sup>b</sup>
Digerido, fase duodenal	1146.09 $\pm$ 32.11 <sup>c</sup>
Blanco digestión	118,32 $\pm$ 8.40 <sup>d</sup>

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)



**Figura 5.** Comparación de medias de la actividad antioxidante de la flor de begonia, harina de flor (MB), concentrado proteico (CPB), digestión gástrica (BDG), digestión duodenal (BDD), blanco de la digestión.

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)

Los resultados obtenidos demuestran un valor más alto en el concentrado proteico ( $1068.21 \pm 3.35 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) respecto a la harina de flor ( $812.03 \pm 48.81 \mu\text{mol Trolox/g}$ ), mientras que el concentrado proteico y el digerido gástrico ( $1047.28 \pm 3.35 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) no presentaron diferencia significativa. El valor más alto registrado fue de  $1146.09 \pm 32.11 \mu\text{mol Trolox/g}$  en el digerido duodenal; dado el valor bajo de la actividad antioxidante del blanco de la digestión ( $118,32 \pm 8.40 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) se puede atribuir la capacidad antioxidante a los péptidos liberados durante esta fase.

En un estudio realizado a 23 tipos de flores comestibles se reveló el incremento de la actividad antioxidante en la fase duodenal con relación a la matriz inicial, en el caso de *Perennial chamomile* existió un incremento de  $214.99 \pm 6.30 \mu\text{mol Trolox/g}$  a  $460.28 \pm 11.15 \mu\text{mol Trolox/g}$ . En cuanto al resto de flores, los valores reportados en



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

la matriz inicial están entre  $46.46 \pm 1.69 \mu\text{mol Trolox/g}$  a  $818.35 \pm 7.33 \mu\text{mol Trolox/g}$  y en los digeridos duodenales desde  $74.46 \pm 5.57 \mu\text{mol Trolox/g}$  a  $1984.09 \pm 19.47 \mu\text{mol Trolox/g}$  (Chen et al., 2015; Prabawati et al., 2021), los valores obtenidos en el estudio *Begonia x semperflorens-cultorum* se encuentran entre los datos reportados por Chen et al.

Por otro lado, la capacidad antioxidante también puede atribuirse al contenido de polifenoles presente en las flores. Se estudió dos variedades de harina de *Begonia cucullata*, (blanca y roja), identificando que la mayor parte de polifenoles se encuentra en las Begonias de variedad roja con  $33.00 \pm 0.86$  (mg GAE/g d.w.). Además, se estableció una alta correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles (Socha et al., 2021). De esta manera se puede explicar la actividad antioxidante obtenida en la harina de flor de *Begonia x semperflorens-cultorum*.

#### **4.5. Verificación de hipótesis**

##### **Digestión gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de *Begonia x semperflorens-cultorum***

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, ya que el concentrado proteico de *Begonia x semperflorens-cultorum* es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

##### **Evaluación de la actividad antioxidante de las proteínas de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum***

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, debido que el digerido gástrico y duodenal obtenido durante la digestión gastrointestinal presenta actividad antioxidante.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**CAPÍTULO V**

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

**5.1. Conclusiones**

- El proceso de extracción de los concentrados proteicos de las flores *Begonia x semperflorens-cultorum* (*Begonia doublet*), se realizó a pH 8 para la solubilización y pH 2 para la precipitación, obteniendo un rendimiento de 9,75 % y un contenido proteico de 20,3 %. En dicho concentrado se evidenció la presencia de cinco proteínas con pesos moleculares entre 25,83 y 56,94 kDa, logrando identificar fracciones proteicas mayoritarias como las Globulinas 7S y Globulinas 11S AB.
- Se simuló el proceso de la digestión gastrointestinal *in vitro*, misma que permitió evaluar la digestibilidad de las proteínas de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum* (*Begonia doublet*). La pepsina permitió hidrolizar parcialmente las proteínas en la fase gástrica, mientras que en la fase duodenal por la acción de la pancreatina las proteínas fueron degradadas por completo.
- Se determinó la actividad antioxidante *in vitro*, correspondiendo el valor más alto ( $1146.09 \pm 32.11 \mu\text{mol Trolox/g}$ ) al digerido duodenal, lo cual demuestra que los péptidos liberados durante esta fase son los responsables de dicha actividad biológica.
- El extracto de proteínas de la flor *Begonia x semperflorens-cultorum* (*Begonia doublet*) presentó actividad antioxidante, por lo cual podría ser considerado como un ingrediente bioactivo para el desarrollo de productos alimenticios con características saludables para el consumidor.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**5.2. Recomendaciones**

- Realizar el aislamiento de proteína de las flores de begonia a diferentes pHs, para conseguir un óptimo punto isoeléctrico de las proteínas, con la finalidad de mejorar el rendimiento.
- Analizar el perfil de aminoácidos presentes en la proteína de las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum*, aplicando técnicas de separación moleculares como HPLC.
- Respaldar los resultados de actividad antioxidante del presente estudio, aplicando otros modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Ampliar la investigación con análisis de actividad antiinflamatoria y antimicrobiana a partir de los concentrados proteicos de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum*.

## **Bibliografía**

- Albán, M., Echavarría, A., & Domínguez, L. (2018). Composición Nutricional Y Propiedades Funcionales de Flores Comestibles. *Saber*, 30, 498–507. <https://core.ac.uk/download/pdf/235926612.pdf>
- Altamirano, L., Hernández, F., & Montoya, G. (2014). La transición alimentaria y la doble carga de malnutrición. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición Órgano Oficial de La Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, Vol. 64(4), 10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.083790>.
- Anacleto, A., Bornancin, A. P. de A., Mendes, S. H. C., & Scheuer, L. (2021). Between flowers and fears: the new coronavirus pandemic (COVID-19) and the flower retail trade. *Ornamental Horticulture*, 27(1), 26–32. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2232>
- Bank, P. D. (2016). *Amino ácidos péptidos y proteínas*. 52. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/UNIDADII\\_AMINOACIDOS\\_PEPTIDOS\\_PROTEINAS\\_21268.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/UNIDADII_AMINOACIDOS_PEPTIDOS_PROTEINAS_21268.pdf)
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749–760. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Cárdenas Melgarejo, C., Stashenko, E., Castañeda, M., Blanco Velandia, K., Muñoz, A., Kouznetsov, V., & Reyes, J. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 1(33), 125–128.
- Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224–243.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

<https://doi.org/10.1007/s12393-012-9058-8>

- Carrillo, W., Tubón, J., & Vilcacundo, R. (2016). Isolation of hen egg white lysozyme by cation exchange chromatography, analysis of its digestibility and evaluation of the inhibition lipid peroxidation in the zebrafish model. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(3).
- Carrillo, Wilman, Carpio, C., Toapanta, A., & Vilcacundo, R. (2016). Analysis of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 332–334.
- Carvajal, D., & Catucuamba, E. (2019). *Determinación in vitro de la digestibilidad gástrica y duodenal en concentrados proteícos de moringa oleifera*. Universidad Estatal de Bolívar.
- Chen, G. L., Chen, S. G., Xie, Y. Q., Chen, F., Zhao, Y. Y., Luo, C. X., & Gao, Y. Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.028>
- Chitrakar, B., Zhang, M., & Bhandari, B. (2019). Edible flowers with the common name “marigold”: Their therapeutic values and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 89(May), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.008>
- Feas, X., Vazquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359–8377. <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>
- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.017>

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

- Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2020). An Overview on the Market of Edible Flowers. *Food Reviews International*, 36(3), 258–275. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1639727>
- Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:M?todos+para+la+cuantificaci?n+de+prote?nas#1>
- Fu, M., & Mao, L. (2008). In vitro antioxidant activities of five cultivars of daylily flowers from China. *Natural Product Research*, 22(7), 584–591. <https://doi.org/10.1080/14786410701592828>
- González-Barrio, R., Periago, M. J., Luna-Recio, C., Garcia-Alonso, F. J., & Navarro-González, I. (2018). Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 252, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.102>
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Kamdern, J. P., & Tsopmo, A. (2019). Reactivity of peptides within the food matrix. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12489>
- Kelley, K. M., Behe, B. K., Biernbaum, J. A., & Poff, K. L. (2001). Consumer preference for edible-flower color, container size, and price. *HortScience*, 36(4), 801–804.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

<https://doi.org/10.21273/hortsci.36.4.801>

Kumari, P., Ujala, & Bhargava, B. (2021a). Phytochemicals from edible flowers: Opening a new arena for healthy lifestyle. *Journal of Functional Foods*, 78(December 2020), 104375. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104375>

Kumari, P., Ujala, & Bhargava, B. (2021b). Phytochemicals from edible flowers: Opening a new arena for healthy lifestyle. *Journal of Functional Foods*, 78(February), 104375. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104375>

Laemmli, U. K. (1970). 227680a0. *Nature*, 227, 680–685.

Lara-Cortés, E., Osorio-Díaz, P., Jiménez-Aparicio, A., & Bautista-Baños, S. (2013). Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 63(3), 197–208.

Lopez, D., Carazo, N., Rodrigo, M. C., Fabra, M., Planes, a, Mediterrani, E. P., & Llobregat, B. (2009). *Conservación de flores comestibles 1 : Efecto de la atmósfera*. 1149–1153.

Maldonado-Alconada, A. M., & Jorin-Novo, J. V. (2001). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales*, 1–16.

Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)

Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523–2530. <https://doi.org/10.1021/jf960169p>

Martínez, J. J., Medina, O. J., & Zambrano, R. (2011). *Bistua : Revista de la Facultad de Ciencias Básicas ISSN : 0120-4211 Universidad de Pamplona Colombia Martínez ,*

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

*José J. ; Medina , Oscar J. ; Zambrano , Rocio Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya ( Passiflora .*

Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(3), 195–199. <https://doi.org/10.3109/10715769709097799>

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food- an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

Mlcek, J., & Rop, O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends in Food Science and Technology*, 22(10), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.04.006>

Mudgil, P., Omar, L. S., Kamal, H., Kilari, B. P., & Maqsood, S. (2019). Multi-functional bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed quinoa and amaranth proteins. *Lwt*, 110(March), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.084>

Nowicka, P., & Wojdyło, A. (2019). Anti-hyperglycemic and anticholinergic effects of natural antioxidant contents in edible flowers. *Antioxidants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080308>

Orozco ab, E. F., Toledo, N. A., Acevedo C, O. L., Galván, L. M., Hacienda El Copal km, E., Irapuato-Silao, carretera, & México, G. (2016). CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE PAROTA (*Enterolobium cyclocarpum*) RESUMEN. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 147–152.

Parkinson, B. M., & Pacini, E. (1995). A comparison of tapetal structure and function in



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

- pteridophytes and angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 198(1–2), 55–88.  
<https://doi.org/10.1007/BF00985107>
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 47–53. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0649-7>
- Pezzarossi, K. B. S. (2004). “*Contenido de proteína y aminoácidos, y generación de descriptores sensoriales de los tallos, hojas y flores de Moringa oleifera Lamark (Moringaceae) cultivada en Guatemala*”. 75.
- Pinakin, D. J., Kumar, V., Suri, S., Sharma, R., & Kaushal, M. (2020). Nutraceutical potential of tree flowers: A comprehensive review on biochemical profile, health benefits, and utilization. *Food Research International*, 127, 108724.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108724>
- Piñuel, L., Vilcacundo, E., Boeri, P., Barrio, D. A., Morales, D., Pinto, A., Moran, R., Samaniego, I., & Carrillo, W. (2019). Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(9), 045–058.  
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90804>
- Pires, E. de O., Di Gioia, F., Roupheal, Y., Ferreira, I. C. F. R., Caleja, C., Barros, L., & Petropoulos, S. A. (2021). The compositional aspects of edible flowers as an emerging horticultural product. *Molecules*, 26(22).  
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26226940>
- Prabawati, N. B., Oktavirina, V., Palma, M., & Setyaningsih, W. (2021). Edible flowers: Antioxidant compounds and their functional properties. *Horticulturae*, 7(4), 1–22.  
<https://doi.org/10.3390/horticulturae7040066>
- Quinteros Meneses, M. F. (2021). Universidad técnica de cotopaxi. In *Universidad Técnica*

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

*de Cotopaxi* (Vol. 1). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>

Ramirez-guerrero, H. (2016). *Rodríguez, J. ; Pérez M. ; Ramírez H y Zambrano, J. 1998. Caracterización de algunos parámetros de calidad en la cebolla bajo diferentes épocas de cosecha. 48*(January 1998).

Rincón, C. T. S., Gómez, G. L. C., & Montoya, J. E. Z. (2016). Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from leaves of *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 133–144.

Samaniego, I., Brito, B., Viera, W., Cabrera, A., Llerena, W., Kannangara, T., Vilcacundo, Ru., Angós, I., & Carrillo, W. (2020). Influence of the Maturity Stage on the Phytochemical Composition and the Antioxidant Activity of Four from Ecuador. *Plants*, 1–15.

Santos, D. I., Saraiva, J. M. A., Vicente, A. A., & Moldão-Martins, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>

Socha, R., Kałwik, J., & Juszczak, L. (2021). Phenolic profile and antioxidant activity of the selected edible flowers grown in Poland. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 25(2), 185–200. <https://doi.org/10.2478/AUCFT-2021-0017>

Thornburg, R. W. (2007). *Chapter 6 MOLECULAR BIOLOGY OF THE*. 265–288.

Vilcacundo, E., Gaibor, J., Albá, G., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2019). Gastrointestinal Evaluation of Tocte Protein Concentrate (*Juglans neotropica* Diels) and Their Chemical Composition. *Biotechnology(Faisalabad)*, 19(1), 23–30. <https://doi.org/10.3923/biotech.2020.23.30>



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R., Lozoya-Gloria, E., & Betancourt-Jiménez, M. G. (2017). Seasonal variation in phytochemicals and nutraceutical potential of *Begonia nelumbiifolia* consumed in Puebla, México. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1484–1490. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2576-x>
- Viva, Q. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 13(2), 109–122. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86331633005.pdf>

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**Anexos**

**ANEXO A:** Certificado de análisis de cuantificación de proteína en la matriz y concentrado de proteína de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet)

0000549

**CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO**

Certificado No: 21- 110		R01-7.8.03				
Solicitud N°: 21-110		Pág.: 1 de 1				
Fecha recepción:	17 de noviembre de 2021	Fecha de ejecución de ensayos: 17 de noviembre de 2021				
<b>Información del cliente:</b>						
Empresa:	C.I./RUC:	1803741246				
Representante: Paulina Rodríguez	TIF:	0987916234				
Dirección: Ambato, La Vicentina	Email:	rodriguez.paulina.e@gmail.com				
Ciudad:	Ambato					
<b>Descripción de las muestras:</b>						
Producto:	Begonia Comestible	Peso / Volumen: 2g				
Marca comercial:	n/a	Tipo de envase: n/a				
Lote:	n/a	No de muestras: n/a				
F. Elb.:	n/a	F. Exp.: n/a				
Conservación:	Ambiente: X Refrigeración: Congelación:	Almac. en Lab: inmediato				
Cierres seguridad:	Ninguno: X Intactos: Rotos:	Muestreo por el cliente: 16 de noviembre de 2021				
<b>RESULTADOS OBTENIDOS</b>						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados/ Técnica	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Begonia comestible liofilizada	11021264	BL	Proteína,	Método Dumas	%(Nx6,25)	10,5
Concentrado proteico de Begonia liofilizada	11021265	CPB	Proteína,	Método Dumas	%(Nx6,25)	20,3
Conds. Ambientales: 21,2°C; 55,6%HR						
Nota: Se adjunta 2 hojas de resultados del equipo						
			 Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad			
Autorización para transferencia electrónica de resultados: Si						
Fecha de emisión del certificado: 18 de noviembre de 2021						
Nota: La muestra fue suministrada por el cliente y los resultados se aplican a la muestra en las condiciones recibidas. El Laboratorio se responsabiliza exclusivamente de los resultados obtenidos en base a la muestra entregada por el cliente. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Solo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo mención a la UTA y la LACONAL.						
"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser revelada. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".						



Dir.: Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi. Av. Los chasquis y Río Payamino  
Edificio Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología / Ambato - Ecuador

(593) 32400987 ext. 5517; 5518 <http://laconal.uta.edu.ec> [laconal@uta.edu.ec](mailto:laconal@uta.edu.ec)



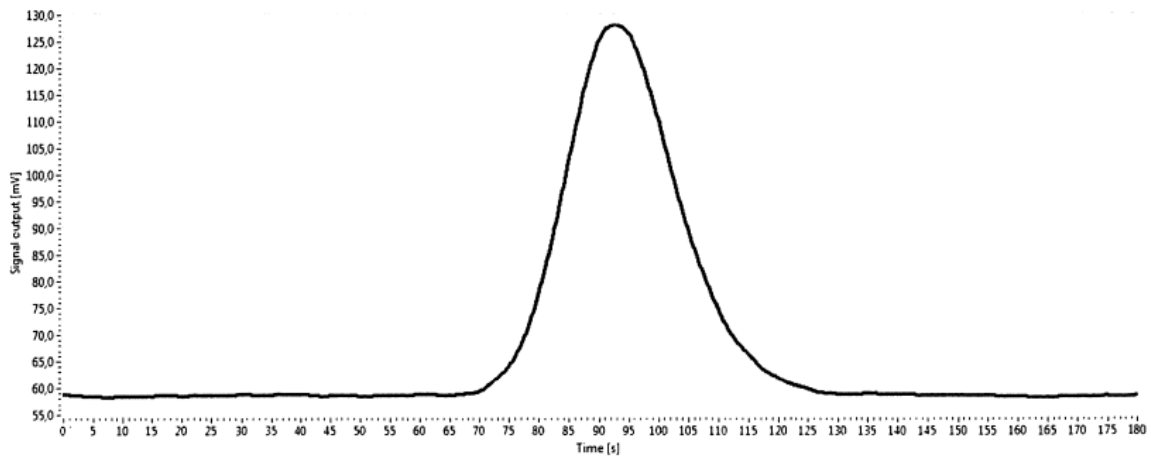
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS

ANEXO B: Curva de calibración de cuantificación de proteína en las flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet)

Phone:  
E-mail:  
Notes:

S/N:  
Software version: 3.15.0  
Operator Name:

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [% Factor]	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
17/11/21	10:42:36	BL	19,52	400,0	1,0	230,2	19	6,25	1586,3	0,3283	1,682	10,513



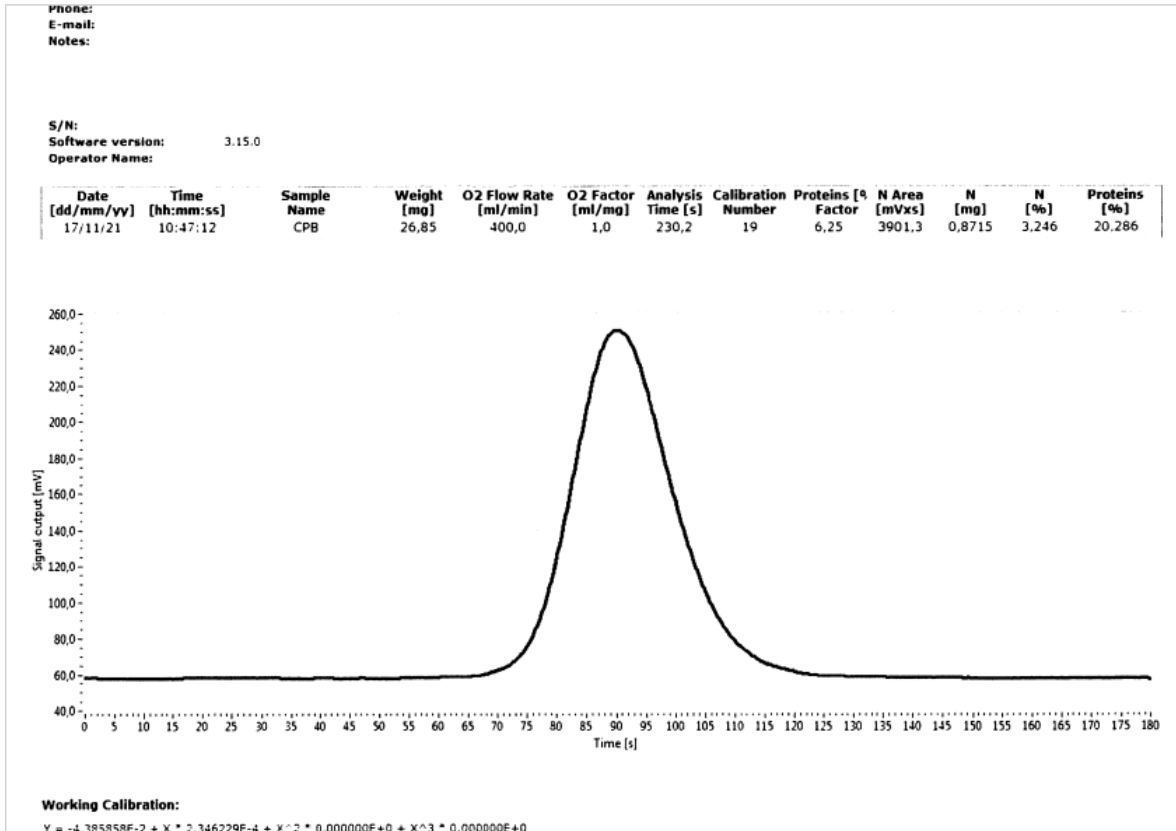
Working Calibration:

$$Y = -4,385858E-2 + X * 2,346229E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$



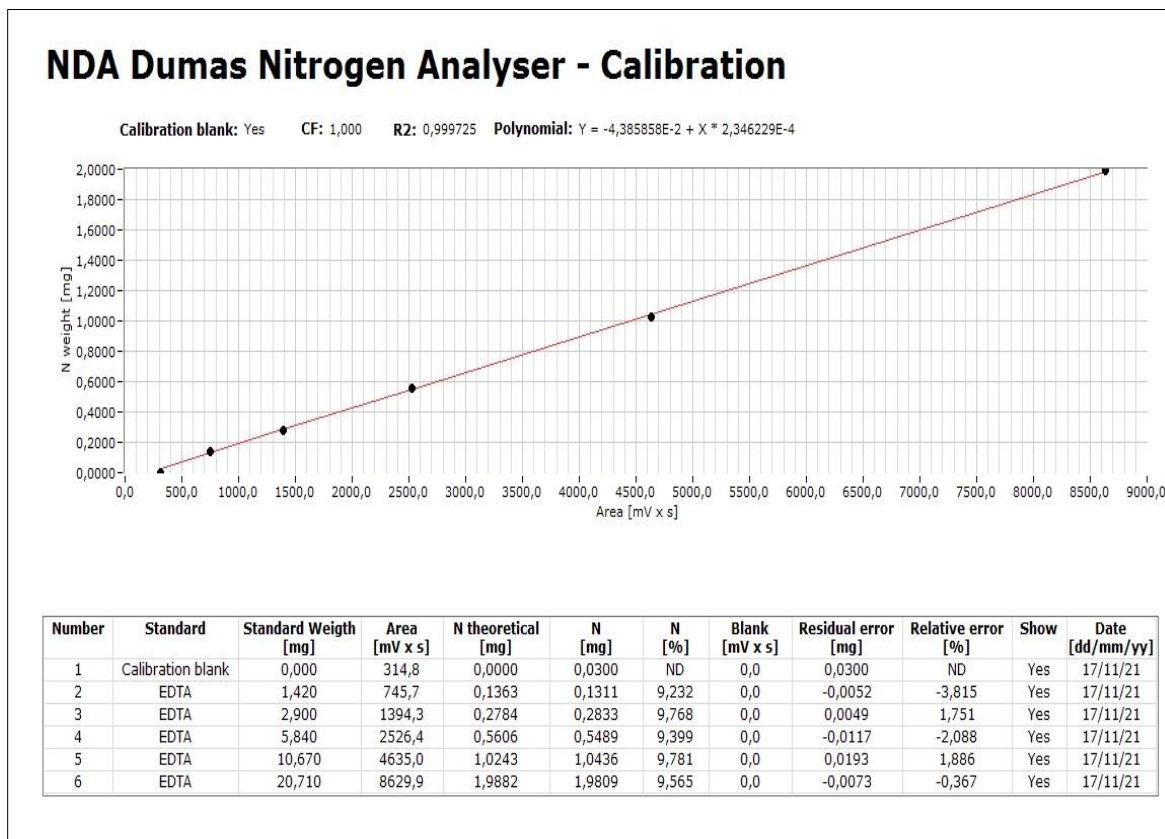
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS

ANEXO C: Curva de calibración de cuantificación de proteína en el concentrado proteico de flores de *Begonia x semperflorens-cultorum* (Begonia doublet)



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**ANEXO D: Curva de calibración de EDTA para el equipo Dumas**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

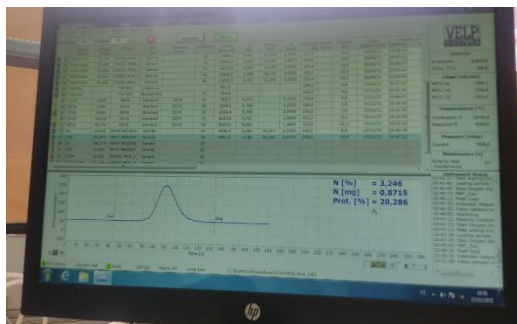
**ANEXO E: Fotografías de la parte experimental realizada durante la fase experimental**

 <p><b>Fotografía 1.</b> Flores <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> obtenidas de la empresa Florestible.</p>	 <p><b>Fotografía 2.</b> Flores <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i> Ultracongeladas -80 °C.</p>
 <p><b>Fotografía 3:</b> Liofilización de la flor de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i></p>	 <p><b>Fotografía 4.</b> Obtención de la harina de las flores de <i>Begonia x semperflorens-cultorum</i></p>
	



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**Fotografía 5.** Extracción de concentrados proteicos de *Begonia x semperflorens-cultorum*

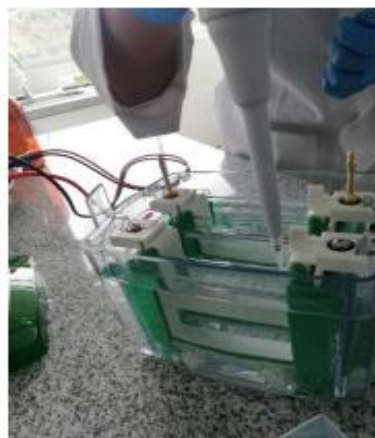


**Fotografía 7.** Cuantificación del contenido de proteína en harina de begonia por el método Dumas.

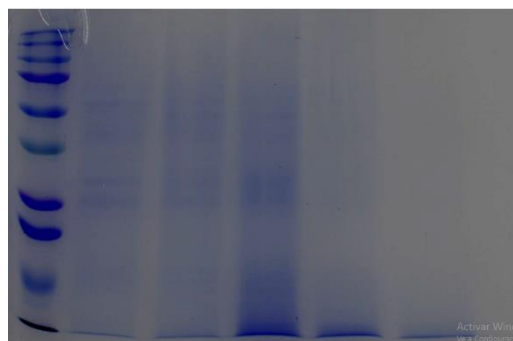
**Fotografía 6.** Proteína liofilizada de harina de *Begonia x semperflorens-cultorum*



**Fotografía 8.** Simulación de la digestión in vitro a Tiempo 0, Digestión gástrica a 120 min y duodenal a 120 min de concentrados proteicos de flores de Begonias

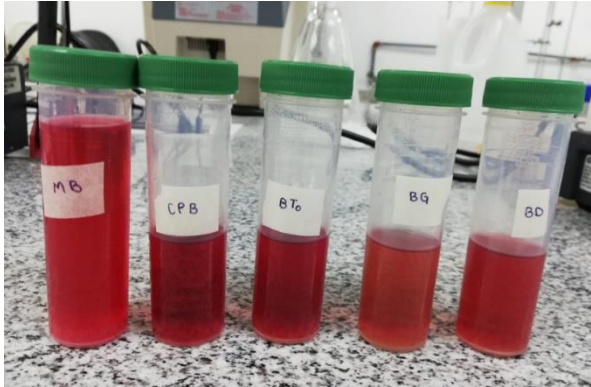


**Fotografía 9.** Caracterización de la proteína de las flores de begonias, técnica SDS - PAGE

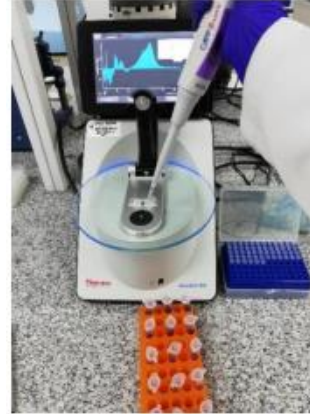


**Fotografía 10.** Imagen obtenida en el Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**



**Fotografía 11.** Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de los aislados proteico y matriz de harina de begonia



**Fotografía 12.** Determinación de la actividad antioxidante in vitro. Equipo espectrofotómetro UV/Vis-NANODROP, método ABTS



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS**

**ANEXO F:** Datos obtenidos y respuestas experimentales de la determinación de la actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de la flor de *Begonia x semperflorens-cultorum*

**Tabla 5:** Datos y resultados obtenidos de la actividad antioxidante expresa en  $\mu\text{mol ET/g}$  muestra de los aislados proteicos obtenidos de la flor *Begonia*. Método ABTS

	Muestras		Absorbancia			Promedio	Abs neta $\lambda=734\text{nm}$	Concentración $\mu\text{M/ml}$	Factor de dilución	Peso [gr]	Volumen de Aforo [L]	$\mu\text{mol Trolox/g}$	PROMEDIO $\mu\text{moles trolox/g}$	DESV. EST. $\mu\text{moles trolox/g}$	ERRO R ESTÁN DAR
MB	1	R1	0,35	0,34	0,35	0,35	0,77	379,8828	25	0,3089	0,025	768,62	812,03	48,8137 375	28,1826 245
		R2	0,33	0,32	0,33	0,33	0,79	396,6723	25	0,3089	0,025	802,59			
		R3	0,29	0,3	0,28	0,29	0,82	427,4532	25	0,3089	0,025	864,87			
CPB	2	R1	0,19	0,18	0,19	0,19	0,93	514,1993	25	0,3014	0,025	1066,27	1068,21	3,35015 029	1,93421 0172
		R2	0,19	0,18	0,19	0,19	0,93	514,1993	25	0,3014	0,025	1066,27			
		R3	0,18	0,18	0,19	0,18	0,93	516,9975	25	0,3014	0,025	1072,08			
BDG	3	R1	0,19	0,2	0,2	0,20	0,92	505,8045	25	0,3013	0,025	1049,21	1047,28	3,35126 219	1,93485 2127
		R2	0,2	0,21	0,19	0,20	0,91	503,0062	25	0,3013	0,025	1043,41			
		R3	0,19	0,21	0,19	0,20	0,92	505,8045	25	0,3013	0,025	1049,21			
BDD	4	R1	0,16	0,16	0,15	0,16	0,96	539,3836	25	0,3033	0,025	1111,49	1146,09	32,1052 904	18,5359 9804
		R2	0,13	0,14	0,13	0,13	0,98	558,9715	25	0,3033	0,025	1151,85			
		R3	0,12	0,12	0,12	0,12	0,99	570,1645	25	0,3033	0,025	1174,92			
Blanco digestión	5	R1	0,61	0,61	0,63	0,62	0,50	153,2237	10	0,3001	0,025	127,64	118,32	8,40492 491	4,85258 5659
		R2	0,63	0,65	0,64	0,64	0,47	133,6358	10	0,3001	0,025	111,33			
		R3	0,64	0,64	0,62	0,63	0,48	139,2324	10	0,3001	0,025	115,99			

Elaborado por: Rodríguez, P. (2022)

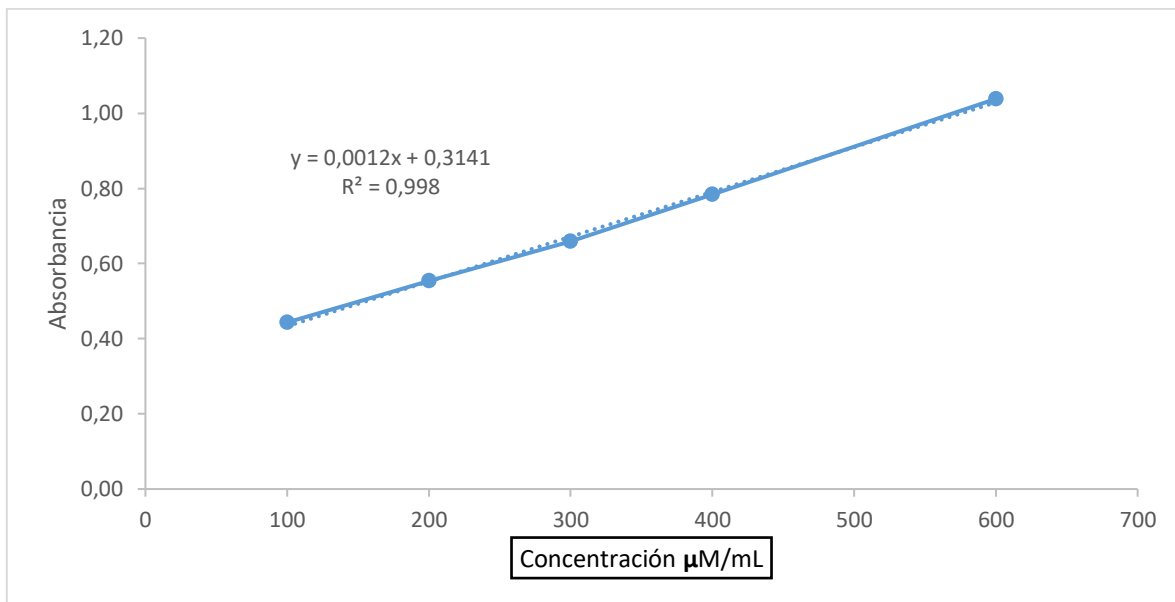
**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**CENTRO DE POSGRADOS**

**Tabla 6:** Datos de absorbancias utilizadas para el análisis de la actividad antioxidante método ABTS

$\mu\text{M/mL}$	Abs $\lambda=734\text{nm}$	Abs Neta $\lambda=734\text{nm}$	Prom
0	0,7	0,41	0,40
	0,72	0,39	
100	0,67	0,44	0,44
	0,68	0,43	
	0,66	0,45	
200	0,57	0,54	0,55
	0,56	0,55	
	0,55	0,56	
300	0,45	0,66	0,66
	0,46	0,65	
	0,45	0,66	
400	0,32	0,79	0,78
	0,34	0,77	
	0,33	0,78	
500	0,15	0,96	0,95
	0,17	0,94	
	0,16	0,95	
600	0,08	1,03	1,04
	0,07	1,04	
	0,07	1,04	

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
CENTRO DE POSGRADOS



**Figura 6:** Curva de calibrado de Trolox (0  $\mu\text{M/mL}$  a 500  $\mu\text{M/mL}$ ) para la determinación de actividad antioxidante de los aislados proteicos obtenidos a partir de harina de begonia por el método ABTS.

**Elaborado por:** Rodríguez, P. (2021)