



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA DE
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: “CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE FLORES DE GERANIO (*Geranium*) Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL COMO FUENTE DE PÉPTIDOS CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DURANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*”

Autor: Ing. Edwin Santiago Tapia Sanchez

Director: Ing, Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD

Ambato — Ecuador

Mayo - 2022



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
INFORMACIÓN GENERAL**

TEMA: “CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE FLORES DE GERANIO (*Geranium*) Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL COMO FUENTE DE PÉPTIDOS CON CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DURANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*”

AUTOR: Edwin Santiago Tapia Sanchez
Ingeniero Agroindustrial
edwin.tapia2@utc.edu.ec

DIRECTOR: Ing, Rubén Darío Vilcacundo Chamorro, PhD

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

- Seguridad y Soberanía Alimentaria.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

**A LA UNIDAD ACADÉMICA DE TITULACION DE LA FACULTAD DE
CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

El tribunal receptor del Trabajo de Titulación presidida por la Doctora Mirari Yosune Arancibia Soria, e integrado por los señores: PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis, Dr. Mario Daniel García Solís, PhD, designados por la Unidad Académica de Titulación 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: “Caracterización de proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*”, elaborado y presentado por el señor Ingeniero Edwin Santiago Tapia Sanchez, para optar por el Grado Académico de Magister 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.

PhD. Mirari Yosune Arancibia Soria
1802142461
Presidenta del tribunal

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis
1804256905
Miembro del tribunal

Dr. Mario Daniel García Solís, PhD.
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: “Caracterización de proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*”, le corresponde exclusivamente al Ingeniero Edwin Santiago Tapia Sanchez, Autor 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.

Ing. Edwin Santiago Tapia Sanchez

C.C. 0503777732

AUTOR

Ing. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro PhD

C.C. 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 un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

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

Ing. Edwin Santiago Tapia Sanchez
C.C. 0503777732



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

DEDICATORIA

A Dios por darme salud, vida, sabiduría, fuerza, comprensión para poder avanzar en el trayecto del Programa de Maestría con felicidad el cual culmina aquí, pero más sueños y metas quedan intactas para un futuro.

A mi padre Teodomiro Tapia que desde el cielo me brindaste la bendición para poder seguir en este duro camino gracias a mi esfuerzo, dedicación y tu bendición papito he logrado una de mis metas más anheladas.

A mi madre Nila Sánchez, mi esposa Josselyn Tarco y mi familia, por brindarme su apoyo y motivación día a día en mis estudios de posgrado, siendo así mis pilares fundamentales en este anhelado logro que estoy alcanzando, por su amor y cariño diario guiándome de manera correcta durante toda mi vida, por la paciencia y el amor brindado y los consejos para tomar decisiones acertadas llevando a la culminación de este proyecto.

A mis compañeros de maestría Gaby, Xavier, Renato, Paulina, Iván, Jessica quienes fueron mi guía en todo el curso de la maestría, juntos logramos llegar a esta meta, luchamos frente a múltiples adversidades que nos llevó a formar una amistad verdadera y nueva familia en el G8.

A la Universidad Técnica de Ambato y Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) por creer en mí y brindarme ese apoyo necesario para llevar a cabo uno de mis sueños más anhelados el posgrado.

Al Dr. Rubén Vilcacundo Chamorro tutor y gran amigo, que gracias a su ayuda y sus conocimientos se alcanzó la culminación del proyecto y maestría.

Ing. Edwin. S. Tapia. S



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme salud, sabiduría, comprensión, lucha de cada día durante todo el camino de constante proceso de aprendizaje académico.

A mi madre Nila Sánchez, mi esposa Josselyn Tarco y mi familia, por brindarme su apoyo y motivación día a día en mis estudios de posgrado, siendo así mis pilares fundamentales en este anhelado logro que estoy alcanzando, por su amor y cariño diario formando una persona en alta calidad y valores y que lucha frente a las adversidades, gracias a su esfuerzo.

Al Dr. Rubén Vilcacundo Chamorro tutor y amigo, un gran docente que me supo guiar en el trabajo cada día, brindándome sus valiosos conocimientos para la culminación de este proyecto.

A la Universidad Técnica de Ambato por permitir formar parte de esta noble Institución en la realización de mi posgrado, brindándome docentes de calidad y altos conocimientos académicos para poder llegar a la culminación de este programa de maestría.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) por creer en mí y brindarme ese apoyo necesario para llevar a cabo uno de mis sueños más anhelados el posgrado.

Al Proyecto CEDIA bajo resolución COP-AL-30-19 CEPRA-XII-2019-09.

A mis compañeros de maestría Gaby, Xavier, Renato, Paulina, Iván, Jessica quienes fueron mi guía en todo el curso de la maestría.

A la Universidad Estatal de Bolívar y a la Dirección de Investigación y Vinculación.

Ing. Edwin. S. Tapia. S



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

ÍNDICE GENERAL

Pág.

PORTADA.....	i
INFORMACIÓN GENERAL.....	ii
A LA UNIDAD ACADEMICA DE TITULACION DE LA FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.....	iii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 General	3
1.3.2 Específicos	3
CAPÍTULO II	4
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	4



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

2.1	Antecedentes investigativos	4
2.1.1	Geranio	5
2.1.2	Proteínas alimentarias	6
2.1.3	Aislados proteicos	6
2.1.4	Métodos de cuantificación de proteína	7
2.1.4.1	Método de Dumas (Nitrógeno total)	7
2.1.5	Simulación de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	7
2.1.6	Electroforesis de proteínas alimentarias.....	8
2.1.7	Péptidos bioactivos	8
2.1.8	Actividad antiinflamatoria	8
CAPÍTULO III		11
MARCO METODOLÓGICO		11
3.1	Ubicación.....	11
3.2	Equipos y materiales	11
3.2.1	Recursos humanos.....	11
3.2.2	Materia prima	11
3.2.3	Materiales de oficina	12
3.2.4	Materiales de laboratorio.....	12
3.2.5	Material biológico	13
3.2.6	Equipos que se empleó en la investigación.....	13
3.2.7	Reactivos	13
3.2.8	Metodología	14
3.2.8.1	Liofilizado de flores de geranio (<i>Geranium</i>)	14
3.2.8.2	Obtención de la harina liofilizada de flores de geranio (<i>Geranium</i>)....	15
3.2.8.3	Obtención del concentrado proteico de flores de geranio (<i>Geranium</i>) 15	



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

3.2.8.4	Determinación de proteína en la flor y concentrado proteico del geranio.....	16
3.2.8.4.1	Cuantificación proteica.....	16
3.2.8.5	Simulación <i>in vitro</i> de la digestión gastrointestinal del concentrado proteico de flores de geranio (<i>Geranium</i>).....	16
3.2.8.5.1	Preparación de los fluidos de la digestión	16
3.2.8.5.2	Simulación de la digestibilidad gástrica y duodenal <i>in vitro</i> de los concentrados proteicos.....	17
3.2.8.6	Caracterización proteica de la matriz, concentrado y digeridos gastroduodenales por SDS- PAGE	18
3.2.8.7	Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	18
3.3	Tipo de investigación	19
3.3.1	Investigación experimental	19
3.3.2	Investigación exploratoria.....	19
3.3.3	Investigación de laboratorio.....	20
3.4	Prueba de hipótesis o prueba científica	20
3.4.1	Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de aislados proteicos de (<i>Geranium</i>)... ..	20
3.4.2	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de proteínas de flores de geranio (<i>Geranium</i>).....	20
3.5	Población o muestra	20
3.6	Recolección de información	21
3.6.1	Observación.....	21
3.6.2	Entrevista.....	21
3.7	Procesamiento de la información y análisis estadístico	21
3.8	Variables respuesta o resultados alcanzados	21



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

CAPÍTULO IV.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Cuantificación y caracterización de las proteínas presentes en las flores y el concentrado proteico del geranio (<i>Geranium</i>).....	22
4.1.1 Rendimiento del concentrado proteico de geranio (<i>Geranium</i>).....	23
4.2 Evaluación de la digestibilidad de las proteínas de flores de geranio (<i>Geranium</i>) tras someterse a un proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> simulando condiciones fisiológicas.....	23
4.2.1 Simulación de la digestión gástrica y duodenal <i>in vitro</i> de los concentrados proteicos provenientes de la flor de geranio (<i>Geranium</i>).....	23
4.2.2 Caracterización de proteínas de la flor, concentrado proteico y digeridos gástrico y duodenal mediante electroforesis SDS- PAGE.....	24
4.3 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	26
CAPÍTULO V.....	30
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	30
5.1 Comprobación de las hipótesis.....	30
5.2 Conclusiones	30
5.3 Recomendaciones.....	31
5.4 BIBLIOGRAFÍA.....	31
5.5 ANEXOS.....	40



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Taxonomía del geranio	5
Tabla 2: Cuantificación de la flor de geranio comestible y concentrado proteico de geranio.....	22
Tabla 3: Caracterización de proteínas e identificación del peso molecular del geranio. A: Estándar B: Flor liofilizada C: Concentrado Proteico D: Tiempo 0 E: Digestión gástrica 120 min F: Digestión duodenal 120 min.....	25
Tabla 4: Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de la matriz, concentrado proteico y de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	27



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Electroforesis SDS – PAGE de flor liofilizada, concentrado e hidrolizados proteicos. Estándar; A: flor de geranio; B: concentrado proteico; C: Digestión a tiempo 0; D: Digestión gástrica 120 min; E: Digestión duodenal 120 min.	25
Figura 2. Comparación de medias de la actividad antiinflamatoria de la flor de geranio, digestión duodenal, blanco de la digestión, digestión gástrica, concentrado proteico y diclofenaco. Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$, Test de Tuckey).	28
Figura 3. Obtención de la harina de las flores de geranio.....	45
Figura 4. Pesado de las muestras	45
Figura 5. Precipitación de la muestra con agua destilada.	45
Figura 6. Proceso de agitación y ajuste de pH a 8.0 de geranio (2N NaOH).	45
Figura 7. Centrifugación de la muestra a 8000 rpm por 20 min.	46
Figura 8. Presentación del sólido y sobrenadante después de la centrifugación.....	46
Figura 9. Proceso de filtración	46
Figura 10. Proceso de agitación y ajuste de pH 3.0 de precipitación con HCL 2N	46
Figura 11. Secado por liofilización del aislado proteico de geranio a un pH de 3,0	46
Figura 12. Pesado de muestras para cada tratamiento de digestión in vitro: Tiempo 0, Digestión gástrica y duodenal.	47
Figura 13. Simulación de la digestión in vitro en Tiempo 0, Digestión gástrica a 120 min y duodenal a 120 min.	47
Figura 14. Agitación orbital de las muestras de digestión in vitro por 120 min de digestión gástrica y duodenal.	47
Figura 15. Pesado de reactivos para elaboración de los geles de acrilamida.	48
Figura 16. Elaboración de buffers y ajuste de pHs.	48
Figura 17. Preparación del buffer running para la cámara electroforética.....	48
Figura 18. Elaboración del gel mayor y menor a un espesor de 1 mm, inserte de peine para elaboración de pocillos.....	48



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Figura 19. Preparación de la muestra.....	49
Figura 20. Inyección de 10 µl de muestra y 10 µl de estándar de proteína (BIO-RAD) en los pocillos del gel para corrida electroforética.....	49
Figura 21. Corrida electroforética a 200 V por 45 min del gel con las muestras. ...	49
Figura 22. Teñido con azul de Coomassie al gel obtenido por una noche.....	49
Figura 23. Gel obtenido en solución de desteñido.	50
Figura 24. Imagen obtenido en el Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.....	50
Figura 25. Preparación de los reactivos para la evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	51
Figura 26. Solución hiposalina y isosalina, buffer fosfato.....	51
Figura 27. Muestra de sangre humana con anticoagulante.	51
Figura 28. Centrifugado de la muestra de sangre con solución isosalina	51
Figura 29. Reconstitución de la sangre para la evaluación de la actividad antiinflamatoria	52
Figura 30. Preparación de la muestra (1 ml de buffer fosfato, 2 ml de solución hiposalina, 1 ml de extracto de geranio y 0,5ml de sangre reconstituida.....	52
Figura 31. Agitación de la muestra de sangre reconstituida con solución isosalina.	52
Figura 32. Incubación de la muestra de reacción a 37 °C por 30 min.	52
Figura 33. Centrifugado y obtenido del sobrenadante de la muestra de reacción para medición de absorbancias.	53
Figura 34. Lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro para cálculos de la actividad antiinflamatoria del geranio.....	53



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

INDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1: Certificado de análisis de cuantificación de proteína en la matriz y concentrado de proteína de flores de geranio liofilizado.	40
Anexo 2: Curva de calibración de cuantificación de proteína en las flores de geranio. Liofilizadas.....	41
Anexo 3: Curva de calibración de cuantificación de proteína en el concentrado proteico de flores de geranio.	42
Anexo 4: Curva de calibración de EDTA para el equipo Dumas.....	43
Anexo 5: Equipo Dumas.....	44
Anexo 6: Evidencias prueba de laboratorio.....	45



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

RESUMEN

En la presente investigación se ha llevado a cabo la caracterización de las proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Se estableció las condiciones del proceso de extracción de los concentrados proteicos que alcanzaron un porcentaje de rendimiento de 9,40 y un contenido proteico del 18 por ciento, mediante solubilización de las proteínas a pH 8,0 y posterior precipitación a pH 3,0. En dicho concentrado se realizó la caracterización mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, evidenciando la presencia de siete proteínas con pesos moleculares entre 5,56 y 57,64 kDa, además se logró identificar fracciones proteicas como Globulinas 7S, Globulinas 11S y Albúminas 2S.

Se evaluó la digestibilidad de las proteínas de flores de geranio tras simular el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. En el transcurso de la fase gástrica las proteínas fueron hidrolizadas parcialmente por la pepsina, mientras que en la fase duodenal fueron degradadas completamente por acción de la pancreatina.

Finalmente se determinó la actividad antiinflamatoria mediante el método potencial de estabilidad de membrana, demostrándose que el concentrado proteico y los péptidos liberados durante la etapa de hidrólisis gástrica son responsables de dicha actividad, con una protección del 38,01 y 31,77 por ciento respectivamente. El digerido duodenal no presentó capacidad antiinflamatoria.

De esta forma se podría considerar al extracto de la proteína de flores de geranio como fuente de compuestos bioactivos utilizables en la elaboración de productos alimenticios funcionales y nutraceúticos.

Palabras claves: Geranio, proteínas, concentrado e hidrolizado proteico, digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, electroforesis (SDS-PAGE), actividad antiinflamatoria.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

ABSTRACT

In the present investigation, the characterization of the proteins of geranium flowers (*Geranium*) and evaluation of their potential as a source of peptides with anti-inflammatory capacity during the simulation of gastrointestinal digestion *in vitro* have been carried out. The conditions of the protein concentrate extraction process were established, which reached a yield percentage of 9.40 and a protein content of 18 percent, by solubilizing the proteins at pH 8.0 and subsequent precipitation at pH 3.0. In said concentrate, the characterization was carried out using the SDS-PAGE electrophoresis technique, evidencing the presence of seven proteins with molecular weights between 5.56 and 57.64 kDa, in addition, it was possible to identify protein fractions such as 7S Globulins, 11S Globulins and 2S Albumins.

The digestibility of geranium flower proteins was evaluated after simulating the gastrointestinal digestion process *in vitro*. During the gastric phase, the proteins were partially hydrolyzed by pepsin, while in the duodenal phase they were completely degraded by the action of pancreatin.

Finally, the anti-inflammatory activity was determined by the potential method of membrane stability, showing that the protein concentrate, and the peptides released during the gastric hydrolysis stage are responsible for said activity, with a protection of 38.01 and 31.77 percent, respectively. The duodenal digest did not present anti-inflammatory capacity.

In this way, the protein extract of geranium flowers could be considered as a source of bioactive compounds that can be used in the production of functional food products and nutraceuticals.

Keywords: *Geranium*, proteins, protein concentrate and hydrolyzate, *in vitro* gastrointestinal digestibility, electrophoresis (SDS-PAGE), anti-inflammatory activity.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Introducción

El geranio (*Geranium*) es una planta perenne de características erguidas y ramificadas, originaria de África (**Hernández-Guerrero y col., 2018**). **Lara-Cortés y col. (2013)** manifiestan que estas flores además de aportar estética a los alimentos aportan sustancias biológicas como proteínas, vitaminas y minerales entre ellos calcio, fósforo, hierro y potasio. Presentan distintos colores como el blanco, tonos crema, rosado, naranja, violetas, rojas y azules.

Dentro de su composición química **Sanchez (2015)** y **Vergara (2019)** manifiestan que las flores de geranio poseen compuestos bioactivos como las antocianinas (presente en las zonas interiores de los pétalos destacándose la presencia de delfinidina, petunidina y malvidina y responsables de la mayoría de los colores en los alimentos), flavonol y taninos, que han demostrado poseer una buena capacidad antioxidante, despertando el interés farmacológico, terapéutico, y a nivel de la industria alimentaria como preservante en alimentos para evitar la oxidación lipídica. Así mismo, **Sánchez (2015)** reporta en su estudio que el aceite esencial del geranio contiene como constituyentes mayoritarios citronelol y geraniol responsables de la actividad antiinflamatoria (eficaz para inflamaciones, infecciones y cicatrizaciones).

Por otra parte, **Zuta (2019)** reporta que el extracto etanólico de geranio posee una alta cantidad de antocianinas, flavanoides, cardenolidos, taninos, azúcares reductores y fenoles, con lo cual se puede deducir que el geranio puede brindar beneficios nutricionales y funcionales, ya que contiene sustancias bioactivas responsables de actividades como la antiinflamatoria y antioxidante.

En los últimos años se ha realizado investigaciones relacionadas con la digestibilidad de macronutrientes; es así como **Quinteros y col. (2016)** sostienen que el método de digestión gastrointestinal *in vitro* es de gran importancia para conocer las bondades



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

nutricionales de los alimentos, entre ellas la calidad de las proteínas, formación de péptidos bioactivos, etc. Por esta razón se observa un notable interés por la utilización de concentrados e hidrolizados proteicos derivados de fuentes vegetales para elaborar productos como: barras, bebidas energéticas, suplementos dietéticos, entre otros; siendo considerados como ingredientes funcionales (**Vergara, 2019**).

El objetivo de esta investigación fue la caracterización de proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

1.2 Justificación

En la actualidad el uso de la medicina tradicional a partir de fuentes vegetales nuevas ha avanzado a grandes pasos, así, se evidencia el alcance de las dos terceras partes de la población mundial en la utilización de los productos naturales con una mayor importancia en los países con una economía periférica de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (**WHO, 2018**).

El Ecuador es un país rico en fauna, flora y comunidades que conservan sus saberes ancestrales, especialmente la utilización de plantas y sus flores que actúan farmacológicamente sobre algunas enfermedades y dolencias. La gran mayoría de la población da uso únicamente a una determinada parte de la planta sea por desconocimiento o falta de credibilidad. Varios de estos saberes ancestrales son actualmente reconocidos y difundidos, pero también existen otros estudios que se le ha dado poca importancia o simplemente no han sido publicados (**Rengifo-Salgado y col., 2017**).

En nuestro país podemos ubicar una diversidad de plantas ornamentales entre ellas el geranio (*Geranium*), distribuida en regiones templadas y en zonas tropicales; su deliciosa fragancia floral hace que sea un placer utilizar su aceite ya sea sola o junto con otros aromas. Se menciona que ayuda a equilibrar la naturaleza (pasiva-agresiva), mejora las relaciones e incrementa la percepción de tiempo y espacio (**Ibáñez, 2003**).



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

En la actualidad este tipo de flores son catalogadas como comestibles por ser ricas en proteínas, almidones, aminoácidos, retinol, ácido ascórbico, riboflavina, niacina y minerales como calcio, fósforo, hierro y potasio (**Lara-Cortes y col., 2013**). Además, encontramos compuestos bioactivos como alcaloides, quinonas, saponinas, flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol), compuestos fenólicos, antocianidinas y azúcares (**Vergara, 2019; Pombo y col., 2016**).

Argueta- Villamar (1994), Mendoza y Lugo (2010) y Carrasco-Hernández (2011) sostienen que las flores de geranio (*Geranium*) han sido utilizadas con fines medicinales en varias localidades de México, para tratar diversos malestares, entre ellos, el dolor de estómago, la bilis, los cólicos, la diarrea, el dolor de muelas, la inflamación de estómago, la urticaria infantil, las escaldaduras de niños, la sarna, las heridas y la tos.

Sin embargo, no se dispone de estudios científicos sobre concentrados e hidrolizados proteicos de las flores de geranio tras un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, que nos permita conocer la degradación proteica producida por las enzimas digestivas y el efecto biológico de las secuencias peptídicas liberadas en dicho proceso.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

1.3.1.1 Caracterizar las proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluar su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

1.3.2 Específicos

1.3.2.1 Aislar y caracterizar las proteínas presentes en las flores de geranio (*Geranium*).

1.3.2.2 Evaluar la digestibilidad de las proteínas de flores de geranio (*Geranium*) tras someterse a un proceso de digestión gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas.

1.3.2.3 Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

2.1 Antecedentes investigativos

La flora, fauna y diversidad étnica son tres indicadores fundamentales que hacen que el Ecuador sea catalogado como diverso; estos factores a más de influir en la economía del país también han dado lugar a conocimientos ancestrales sobre propiedades medicinales, atribuidos a las diferentes partes de las plantas como sus hojas y flores. La ciencia en la actualidad revela un incremento notable sobre el estudio de especies florales utilizadas en la terapia farmacológica, así mismo, en el área de los alimentos se tiene evidencia de la incorporación de hidrolizados proteicos de fuentes vegetales que fueron consideradas solo de uso casero y ornamental, aumentando el valor biológico de dichas materias primas.

Un caso de ello son las flores de geranio (*Geranium*), que además de sus propiedades nutricionales poseen compuestos bioactivos como los fenólicos conocidos como pigmentos antociánicos, responsables del color de las flores y a su vez han provocado un gran interés por sus propiedades terapéuticas (**Lara y col., 2013**).

Rizzello y col (2016) manifiestan que la mayoría de los estudios relacionados con macronutrientes, se han interesado por las proteínas de origen animal, sin embargo, en los últimos años se ha mostrado un creciente interés por péptidos de proteínas vegetales y la evaluación de actividades biológicas de estos compuestos. Los péptidos bioactivos se pueden generar a partir de una proteína precursora tras la acción de enzimas digestivas durante la digestión gastrointestinal, durante el procesado de alimentos (maduración, fermentación, cocción o hidrólisis *in vitro* con enzimas proteolíticas) o durante el almacenaje (**Vilcacundo, 2017**).

Según **Arhewoh y col (2015)** los péptidos liberados durante el proceso de digestión o que han resistido al mismo y llegan intactos al intestino, pueden ejercer una función local como relajantes de la mucosa gástrica o inhibidores de la secreción de enzimas,

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

o bien pueden atravesar el epitelio intestinal y pasar al torrente sanguíneo para alcanzar los órganos diana y actuar a nivel sistémico. Sin embargo, las diferencias metabólicas y las variaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que se presentan en las diferentes partes del sistema digestivo repercuten en la absorción de estos (**Lee, 2002**).

Por otro lado, existen muchos trabajos sobre la actividad antiinflamatoria atribuida a flavonoides presentes en extractos de plantas como *Vitis vinifera* (uva) (**Marchi, 2014**), *Passiflora ampullacea* (granadilla) (**Peñaherrera, 2016**), *Prunus persica rosaceae* (durazno) (**Kim, 2013**), *Morinda citrifolia L.*, (noni) (**Huang y col., 2015**) entre otros, llamando la atención de varios investigadores que buscan fuentes naturales de nuevos componentes con actividad biológica.

2.1.1 Geranio

Nombre común: Geranio

Fotografía 1: *Geranio*



Fuente: Tapia, E. (2022)

Nombre científico: *Geranium*

Taxonomía

Tabla 1: Taxonomía del geranio

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Geraniales
Familia	Geraniaceae
Género	Geranium

Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Sanchez (2015)



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

El Geranio conocido por su valor ornamental, es considerado como una planta cuya floración se extiende entre los meses de mayo a septiembre dependiendo de ciertas condiciones como: cuidados mínimos, época invernal, sitio luminoso y una temperatura que oscile entre los 15 y 20°C. Puede catalogarse como una flor comestible muy aromática y con un sabor afrutado que recuerda a la manzana verde. De origen africano, destacándose desde hace tiempo atrás por sus variedades con distintos colores y su aportación de fragancias y actualmente por su uso en la gastronomía, principalmente en la elaboración de postres, pasteles, bebidas, ensaladas, agua de flores, o como guarnición **(Lara-Cortés y col., 2013)**.

Este tipo de planta aporta principalmente proteínas, almidones, vitaminas A, B, C, E y varios elementos minerales que son indispensables para el cuerpo humano **(Lara-Cortés y col., 2013)**.

Según **Vergara (2019) y Pombo y col. (2016)**, en la composición química del geranio destaca la presencia de alcaloides, quinonas, saponinas, flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol), compuestos fenólicos, antocianidinas y azúcares.

Vergara (2019) menciona que el geranio posee ciertas propiedades medicinales que ayudan a tratar enfermedades en personas o animales como inflamaciones, dolores, cólicos entre otras, destacándose además la presencia de compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, etc.

2.1.2 Proteínas alimentarias

Cobo (2016) menciona que las proteínas son biomoléculas cuya función principal en el organismo es de tipo estructural; están constituidas por largas cadenas de aminoácidos unidas unas con otras por enlaces covalentes.

2.1.3 Aislados proteicos

Martínez y col. (2011) manifiestan que un aislado proteico de origen vegetal es producto de la aplicación de un tratamiento de solubilización alcalina seguida de una



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

precipitación acida, lo cual se logra mediante el ajuste del pH hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la proteína. Este método es el más usual debido a su facilidad de aplicación, alto rendimiento y el mejoramiento de la digestibilidad. Además, permite la eliminación de factores antinutritivos o la presencia de componentes que no son de origen peptídicos por ejemplo fibra, azúcares y lípidos no deseados en el producto final.

2.1.4 Métodos de cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína vegetal es de gran importancia al momento de la purificación. Existen numerosos métodos de cuantificación de proteína, pero por criterios técnicos como: cantidad de proteína total, concentración de proteína, especificidad del método, presencia de otras sustancias y la facilidad y reproductibilidad del método (Cárdenas, 2016; Cobo, 2016), en el presente trabajo investigativo se aplicó el método de Dumas.

2.1.4.1 Método de Dumas (Nitrógeno total)

De acuerdo con Müller (2017), el método de combustión Dumas es catalogado como un método completo para la determinación del contenido total de nitrógeno en una matriz de origen biológico, el cual se basa en la reducción del óxido de nitrógeno formado durante la combustión de las muestras a altas temperaturas, mediante la medición volumétrica del gas nitrógeno de dicha reducción; indicándonos los resultados en forma de porcentaje y mg de Nitrógeno y, tras conversión el porcentaje de la proteína presente en dicha muestra.

2.1.5 Simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*

En el campo de la nutrición y salud humana es muy importante tomar en cuenta a los nutrientes hidrolizados mediante la digestión gastrointestinal. Tras la ingesta de los alimentos puede observarse una serie de cambios fisicoquímicos que permiten su desintegración, transporte y absorción en el cuerpo; el primer paso es la trituración y corte en la boca con la saliva para posteriormente someterse a la fase de digestión



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

gástrica a un pH entre 2,0 y 4,0. Este pH dependerá del volumen, contenido de alimentos, presencia o ausencia de antiácidos y el consumidor final, en donde, en una etapa final entra al intestino delgado para neutralizarse y posteriormente someterse a una etapa de digestión duodenal previo el ingresar al intestino grueso (**Cárdenas, 2016**).

2.1.6 Electroforesis de proteínas alimentarias

Carvajal y Catucuamba (2019) manifiestan que la electroforesis en gel conocida como SDS- PAGE es un método que nos permite separar macromoléculas en relación a su tamaño, carga eléctrica y propiedades físicas. Se basa en la movilidad de las biomoléculas en un campo eléctrico, pasando de una carga negativa a un lado positivo y viceversa. Esta técnica se usa principalmente para el análisis de la composición proteica (pesos moleculares) de una determinada muestra. Cuando ya se ha completado la electroforesis, se puede observar que las moléculas más pequeñas llegan al conocido ánodo y con el apoyo de una solución de tinción se harán visibles en el revelado. El agente más utilizado en la tinción de las proteínas es la solución es el azul de Coomassie,

2.1.7 Péptidos bioactivos

Para **Cobo (2016)** los péptidos bioactivos son unos fragmentos cortos de la proteína (entre 2–20 aminoácidos) que poseen una multitud de funciones corporales. Contienen residuos más hidrofóbicos que la proteína media (cadena de 200 aminoácidos) y pueden ser resistentes a las peptidasas presentes en la digestión.

2.1.8 Actividad antiinflamatoria

Gómez Estrada y col. (2011) sostienen que la actividad antiinflamatoria es el punto de partida de algunos estudios en el área farmacológica, actualmente también de interés en la industria alimentaria, ya que muchos de sus productos naturales poseen compuestos que pueden interferir en procesos inflamatorios y por tanto en la evolución de ciertas enfermedades. Dicho proceso da lugar al enrojecimiento e hinchazón con



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

calor y dolor, en respuesta del tejido vivo a una lesión causada por agentes químicos, físicos o biológicos. En el desarrollo inflamatorio se involucra la liberación de sustancias como prostaglandina, histidina, bradiquina y serotonina, ya que estas actúan liberando la conocida “sopa algogénica” responsables de generar dolor por su actuación en las terminaciones nerviosas (**Vilcacundo y col., 2017**).

Cárdenas (2016) menciona que en los tratamientos inflamatorios se utilizan antiinflamatorios no esteroideos capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación conocidos como AINE. Sin embargo, existe estudios que relevan que producen efectos indeseables como toxicidad renal y gastrointestinal, por esta razón, actualmente se están realizando estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad antiinflamatoria de metabolitos y extractos aislados de fuentes vegetales principalmente plantas, con el fin de disminuir los efectos negativos de los AINE.

Una posible alternativa natural ante este problema es el geranio; según **Cobo (2016) y Pombo y col. (2016)** esta planta y en especial sus flores, poseen compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por otro lado, **Muñoz y Velásquez (2018)** determinaron el contenido de fenoles y flavonoides totales de infusiones comerciales de hierbabuena, limón, manzanilla, árnica y boldo mediante técnicas espectrofotométricas y HPLC. Además, midieron la actividad antiinflamatoria mediante el método de inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2). Con los resultados obtenidos concluyen que las infusiones de boldo presentan un mayor número de compuestos fenólicos seguidas de la infusión de hierba buena, mientras que la infusión de té verde, manzanilla y limón presentan una mayor actividad antiinflamatoria medida por la inhibición de COX2.

Huang y col (2015), dio a conocer los resultados del efecto de los extractos de fruta fermentada de noni sobre la microflora y la inflamación de células epiteliales del colon, para lo cual evaluaron la actividad antiinflamatoria de los extractos en etanol y acetato de etilo en células Caco-2, IL-8 y COX-2. Con los resultados obtenidos concluyen que el crecimiento de las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fue promovido por extracto en etanol, mientras que el extracto en acetato de etilo suprimió



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

significativamente la producción de COX-2, IL-8 y PGE2. La quercetina fue el principal contribuyente a la actividad antiinflamatoria, mientras que la fruta fermentada de noni promovió el crecimiento probiótico y disminuyó la oxidación e inflamación intracelular en células Caco-2. Con estos resultados sugieren que la fruta fermentada de noni podría proteger contra enfermedades inflamatorias del colon.

Hernández - Guerrero y col (2018) realizaron un análisis fotoquímico preliminar, y evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *G. seemanii* mediante el modelo del granuloma en ratas; en donde, se observó que las tres dosis evaluadas (125, 250 y 500 mg/kg de p.c.), mostraron actividad antiinflamatoria, evidenciada con una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del peso húmedo y seco del granuloma.



**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 BIOPROPEPTI de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato y el Centro de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

3.2 Equipos y materiales

Los materiales, equipos y reactivos para la caracterización de proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* se detallan a continuación:

3.2.1 Recursos humanos

Autor:

- Ingeniero, Tapia Sanchez Edwin Santiago

Director del proyecto de investigación:

- Ingeniero, Vilcacundo Chamorro Rubén Darío, PhD

3.2.2 Materia prima

Se trabajó con 1000 gramos de flores orgánicas comestibles de geranio (*Geranium*) que se adquirió a la empresa Florestibles. Ec. Se realizó un proceso de ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizado, molienda y finalmente un tamizado. Estas muestras liofilizadas fueron conservadas en fundas ziploc a temperatura de refrigeración.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

3.2.3 Materiales de oficina

- Computadora.
- Memory flash.
- Cámara fotográfica.
- Calculadora.
- Hojas de papel bond.
- Anillados.
- Impresora.
- Copiadora.
- Esferos.
- Libretas de campo.
- Marcadores.

3.2.4 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de 10, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraz aforado de 5, 10, 15, 25 ml.
- Probetas de 10, 100, 500 ml.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Magnetos.
- Puntas de 200 y 1000 μL .
- Micropipetas de 100- 100 μL .
- Gradillas.
- Espátulas.
- Tubos para muestras de sangre
- Barillas de agitación.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

3.2.5 Material biológico

- Muestras de sangre (Tubos de 4 ml con anticoagulante)

3.2.6 Equipos que se empleó en la investigación

- Agitador (VWR)
- Balanza Analítica (VWR-224AC)
- Plancha de agitación y calentamiento (Isotemp Fisher Scientific)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Microcentrífuga (Labnet 5702 eppendorf)
- Girador Orbital (Thermo Scientific)
- pH-metro (Thermo Scientific)
- Congelador (Panasonic)
- Ultracongelador (Panasonic)
- Refrigerador (Indurama Modelo RI-470 y Mabe)
- Agitador vórtex (VWR)
- Liofilizador de sobremesa (Bench Top Pro with Omnitronics)
- Equipo de electroforesis (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System)
- Equipo Dumas (ELEMENTAR)
- Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.
- Vortex Mixer VWX

3.2.7 Reactivos

- Hidróxido de sodio NaOH (Merck)
- Ácido clorhídrico HCl (Merck)
- Pancreatina (Sigma- Aldrich)
- Pepsina porcina (Sigma- Aldrich)
- Persulfato de amonio (PSA) (BIO-RAD)



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

- 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
- Bicarbonato de sodio NaHCO_3 (Merck)
- Cloruro de sodio NaCl
- Cloruro de calcio CaCl_2
- Diclofenaco de sodio (concentración: 75mg/ml)
- Tris- HCl (Sigma- Aldrich)
- Tris-base (Merck)
- SDS (Bio-Rad)
- Glicerol (Invitrogen)
- Glicerina (ISOLAB)
- Azul de bromofenol (Thermo Scientific™)
- Azul de Coomassie- R250 (BIO-RAD)
- β - mercaptoetanol (Merck)
- Tetramethylethylenediamine Temed (Merck)
- Estándar de proteínas (BIO-RAD 10 a 250 kDa)
- Metanol (Merck)
- Ácido acético (Merck)

3.2.8 Metodología

3.2.8.1 Liofilizado de flores de geranio (*Geranium*)

Una vez obtenida la materia prima, las flores comestibles de geranio (*Geranium*) en cantidad de un kilogramo fueron transportadas hacia el Laboratorio de Alimentos Funcionales de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato en cadena de frío. Posteriormente se realizó el pesado y se colocó en fundas ziploc a ultracongelación -80°C por dos días. Seguidamente se efectuó el proceso de liofilización en un Liofilizador de mesa de la marca Bench Top



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Pro with Omnitronics por tres días aproximadamente, para garantizar una materia prima de calidad.

3.2.8.2 Obtención de la harina liofilizada de flores de geranio (*Geranium*)

Para esta etapa se procedió a pesar una cantidad aproximada de 89,44 g, posteriormente se trituró en una licuadora marca Oster, obteniéndose un polvo libre de impurezas apto para los siguientes procesos. El peso del polvo de flores de geranio fue de 88,44 g, el mismo que fue almacenado en fundas herméticas ziploc para evitar el contacto con la humedad, y su conservación fue en refrigeración a una temperatura de 4°C. El contenido de proteína de la matriz fue determinado a través del método Dumas.

3.2.8.3 Obtención del concentrado proteico de flores de geranio (*Geranium*)

El concentrado proteico de flores de geranio se obtuvo siguiendo el protocolo de **Toapanta y col (2016)** con ligeras modificaciones. Se pesó 10 g de harina y se diluyó en 450 ml de agua destilada, ajustando el pH de la suspensión a 8,0 con NaOH 2N. Después de agitar la misma durante 30 minutos se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos a 25°C. El sobrenadante se ajustó a un pH 3,0 con HCl 2N y se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se disolvió en un pequeño volumen de agua, y se neutralizó con NaOH 0,1 M, se liofilizó y almaceno a 20 °C hasta su análisis. El contenido de proteína del concentrado proteico fue determinado usando el método de cuantificación Dumas.

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



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Pf: Peso final del precipitado después del proceso de liofilización

Pi: Peso inicial de la harina del geranio liofilizada

3.2.8.4 Determinación de proteína en la matriz y concentrado proteico del geranio

3.2.8.4.1 Cuantificación proteica

La cuantificación de proteína en la matriz y el concentrado proteico se realizó mediante el método Dumas de acuerdo con **Cobo (2016) y Bellomonte y col. (1987)**. Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos LACONAL.

Se elaboró una curva de calibración con EDTA a concentraciones de 10 a 100 miligramos, véase Anexo 5 y 6. Finalmente se procedió a pesar 25 miligramos de la matriz y concentrado, se colocó en el equipo y se analizó.

3.2.8.5 Simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal del concentrado proteico de flores de geranio (*Geranium*)

Se realizó siguiendo el protocolo de **Minekus y col. (2014)** con ligeras modificaciones, el mismo que simula condiciones del proceso gastrointestinal en el ser humano (hidrolisis gástrica y duodenal).

3.2.8.5.1 Preparación de los fluidos de la digestión

- 1. Simulador fluido salival (SFS):** En esta fase se elaboró el SFS a un pH 7,0; para ello se mezcló con la ayuda de una micropipeta de volumen variable la cantidad de 302 μl de KCl, 74 μl de KH_2PO_4 , 136 μl de NaHCO_3 , 10 μl de $\text{MgC}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, y se aforo a 10 ml con agua tipo 2 ajustando el pH.
- 2. Simulador de fluido gástrico (SFG):** Se preparó el SFG a un pH 3,0 mezclando con la ayuda de una micropipeta la cantidad de 345 μl de KCl, 45 μl de KH_2PO_4 , 625 μl de NaHCO_3 , 590 μl de NaCl, 20 μl de $\text{MgC}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, y



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

se aforo a 25 ml con agua tipo 2 ajustando el pH.

- 3. Simulador de fluido intestinal (SFI):** Se obtuvo el SFI a un pH 7,0; se mezcló con una micropipeta la cantidad de 340 μ l de KCl, 40 μ l de KH_2PO_4 , 2125 μ l de NaHCO_3 , 480 μ l de NaCl, 55 μ l de $\text{MgC}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$, y se aforo a 25 ml con agua tipo 2 ajustando a un pH.

3.2.8.5.2 Simulación de la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro* de los concentrados proteicos.

- 1. Fase oral:** 5 g de concentrado proteico se disolvió en 5 ml de SFS, el mismo que contiene la enzima α -amilasa a una concentración de 75 U/ml a un pH 7.0. Finalmente se agitó la muestra por 2 minutos a 37°C y 500 rpm.
- 2. Digestión gástrica del concentrado proteico de geranio (pH 2,0):** Se empleó la enzima pepsina de origen porcino (SIGMA ALDRICH) y el fluido gástrico (SGF: NaCl 0,35 M). A la muestra ensayada en la fase oral se añadió el SFG y la enzima pepsina a una concentración de 2000 U/ml, dando una relación de mezcla de digestión de 1: 1 (v/v). El digerido gástrico se ajustó a un pH 2,0 y se incubó a 37°C por 120 minutos y 200 rpm en el Termoagitador Orbital Termo Scientific.
- 3. Digestión duodenal del concentrado proteico de geranio (pH 7,0):** Se empleó las enzimas pancreáticas (SIGMA ALDRICH) y el SFI. Una vez obtenido el hidrolizado gástrico se añadió el SFI, una solución de pancreatina (100 U/ ml) y bilis 10 mM. Finalmente se agitó la muestra por 2 horas a 37°C y 200 rpm en el Termoagitador Orbital Termo Scientific. Las enzimas fueron inactivadas mediante tratamiento térmico (80°C por 15 min).

Cada uno de los hidrolizados fue guardado en frascos herméticos y llevados al ultracongelador a - 80°C por dos días, seguidamente liofilizados y conservados a -20°C.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

3.2.8.6 Caracterización proteica de la matriz, concentrado y digeridos gastroduodenales por SDS- PAGE

Para la caracterización de proteínas provenientes de las flores de *Geranium*, se empleó la técnica de análisis electroforética en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, de acuerdo con el método propuesto por **Laemmli (1970)** con ligeras modificaciones. Las muestras fueron colocadas en un campo eléctrico de 200V durante 30 minutos en presencia de un buffer Tris-HCl, usando un equipo BIO-RAD modelo Mini Protean II; el gel fue teñido durante 12 horas con azul de coomassie y luego fue desteñido con una solución de metanol y ácido acético. Dicho gel fue fotografiado y el cálculo del peso molecular de las proteínas encontradas se realizó utilizando el equipo de fotodocumentación AnalytikJena Geltower y el software Vision Works versión 8.20.

3.2.8.7 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó a través del método potencial de estabilidad de membrana de la flor de geranio, concentrado proteico y los digeridos de acuerdo con **Kero Jemal y Sudhakar (2016)**; **Gandhisan y col., (1991)**; **Murugan y Parimelazhagan (2014)** y **Bouhlali y col., (2016)** con ciertas modificaciones. Se recogió sangre de voluntarios sanos que no hayan consumido antiinflamatorios al menos quince días antes en tubos con anticoagulante. Posteriormente se mezcló la sangre en una relación 1:1 con la solución ALSEVER que se preparó disolviendo dextrosa al 2%, citrato de sodio al 0,8%, ácido cítrico al 0,05% y cloruro de sodio al 0,42% disueltos en agua destilada. La mezcla fue centrifugada a 3000 rpm y se lavó con solución isosalina al 9%. La sangre fue reconstituida con solución isosalina y suspendida en 10% (V/V) final. La reacción contiene 1,0 ml de tampón fosfato (0,15M, pH= 7,4), 1ml del extracto de la muestra, 0,5 ml de suspensión de sangre o RBC (10 % v/v de glóbulos rojos suspendidos en solución isosalina) y 2 ml de solución hiposalina al 3,6% (**Sadique y col., 1989** y **Sakat y col., 2010**). La mezcla sin el extracto sirvió de control. Las muestras fueron incubadas a 37°C por 30 min y centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos; la solución sobrenadante es decir el



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

contenido de hemoglobina se midió a una longitud de onda de 560 nm. El estándar fue el diclofenaco sódico a una de concentración de 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados fueron expresados en porcentaje de protección % PP, calculado mediante la siguiente fórmula (Sakat y col., 2010; Reshma y col., 2014):

$$\%PP = 100 - \frac{Ab1}{Ab2} \times 100$$

Donde Ab1 es la absorbancia de la muestra, y Ab2 es la absorbancia del control.

3.3 Tipo de investigación

Este tipo de estudio fue experimental con enfoque cuantitativo, destacándose los siguientes tipos de investigación:

3.3.1 Investigación experimental

Este tipo de investigación se centró en la manipulación de las variables de estudio en condiciones controladas, replicando el fenómeno absoluto y con esto pudiéndose observar el grado en que las variables implicadas producen un efecto determinado.

Se controló una o más variables en el proceso de la caracterización de las proteínas de flores de geranio (*Geranium*) y evaluación de su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*; a partir de ello se recopiló la suficiente información para generar el experimento deseado en medio de un escenario como los Laboratorios de Investigación (UODIDE-ICIA, Proyecto de Canje de Deuda) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato y los Laboratorios de Investigación (Biofabrica) de la Universidad Estatal de Bolívar.

3.3.2 Investigación exploratoria

Se enfocó en el análisis e investigación de los aspectos de la realidad que no han sido investigados con profundidad.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Se examinó un tema poco investigado, buscando estudios relacionados sobre el objeto de investigación, conceptos, criterios y alternativas que nos permitan dar resolución al problema de investigación planteado.

3.3.3 Investigación de laboratorio

Este tipo de investigación se desarrolló en un ambiente real, puesto que ejecutó en el laboratorio bajo condiciones y el equipamiento necesario.

3.4 Prueba de hipótesis o prueba científica

3.4.1 Digestión gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de (*Geranium*)

Hipótesis

H₀= El concentrado proteico de *Geranium* no es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

H_a= El concentrado proteico de *Geranium* es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

3.4.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de proteínas de flores de geranio (*Geranium*)

Hipótesis

H₀= Los digeridos gástricos y duodenales no presentan actividad antiinflamatoria.

H_a= Los digeridos gástricos y duodenales presentan actividad antiinflamatoria.

3.5 Población o muestra

La población será 1000 gramos de flores de geranio liofilizadas.

La muestra será 1 gramo para cada ensayo que se realizó.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

3.6 Recolección de información

En la recolección de información se utilizó las siguientes técnicas de investigación:

3.6.1 Observación

La observación es la técnica de investigación básica, sobre las que se sustentan todas las demás, ya que establece la relación básica entre el sujeto que observa y el objeto que es observado, que es el inicio de toda comprensión de la realidad.

Esta técnica se utilizó con el fin de observar los distintos contrastes en la experimentación sobre la caracterización de proteínas de las flores de geranio y su potencial como fuente de péptidos con capacidad antiinflamatoria durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

3.6.2 Entrevista

Es una técnica de investigación que ocupa un lugar muy destacado dentro de las técnicas aplicadas para la recolección de datos, ya que es una de las más utilizadas en investigaciones.

Esta técnica se utilizó para la obtención de información sobre la ubicación y disponibilidad de la materia prima.

3.7 Procesamiento de la información y análisis estadístico

Los resultados se presentan con una media \pm desviación estándar de tres réplicas para cada ensayo. Estos valores fueron determinados mediante un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de Tuckey, aplicados a un nivel de confianza del 95% en el programa estadístico Infostat Student para la identificación de diferencias significativas.

3.8 Variables respuesta o resultados alcanzados

Variable independiente: digestión gastrointestinal *in vitro*

Variable dependiente: péptidos bioactivos con actividad antiinflamatoria.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación y caracterización de las proteínas presentes en las flores y el concentrado proteico del geranio (*Geranium*)

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

Muestra	Parámetros	Unidad	Resultados	Método
Flor de geranio comestible	Proteína	% (N x 6,25)	13,20	Dumas
Concentrado proteico de geranio	Proteína	% (N x 6,25)	18,00	Dumas

Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos LACONAL

En la tabla 2 se puede observar que la matriz tiene un contenido de proteína de 13,20 % cuantificado a través del método Dumas. **Palate (2021)** en su estudio denota que las flores comestibles como el diente de león (*Taxacum officiale*) y el tronador (*Tecoma stans*) contienen 31,3 y 26,68 g/100 g de proteína respectivamente, deduciendo que en las flores comestibles se puede encontrar un alto porcentaje de proteína y el geranio no es la excepción. Sin embargo, en el concentrado proteico de geranio a un pH de precipitación de 3,0 se obtuvo un porcentaje de 18,0 %, lo cual significa que el método utilizado para la separación de proteínas puede ser mejorado utilizando diferentes pHs de solubilidad y precipitación.

Por otra parte, **Palate (2021)** establece que para que una flor sea considerada proteica debe cumplir ciertos alcances nutricionales como la cantidad y calidad de proteína presente en la flor, por lo cual se puede considerar al geranio como una flor que cumple con estas características.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

4.1.1 Rendimiento del concentrado proteico de geranio (*Geranium*)

El concentrado proteico de flores de geranio (*Geranium*) se obtuvo por precipitación isoeléctrica y posterior se liofilización, con el fin de determinar su rendimiento.

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

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

$$\% R = \frac{4,7 \text{ g de concentrado proteico liofilizado}}{50 \text{ g de harina de flores de geranio liofilizada}} \times 100$$

$$\% R = 0,094 \times 100$$

$$\% R = 9,40$$

El rendimiento del concentrado de proteína de flor de geranio (*Geranium*) a un pH de precipitación de 3,0 fue de 9,40 %. **Posada (2005) y López (2019)** reportan en su estudio que la extracción de proteínas mediante la precipitación isoeléctrica se encuentra asociado principalmente con la variedad y pureza de los reactivos que son utilizados para el ajuste del pH, además un factor primordial es la concentración de nitrógeno en el suelo, puesto que una disminución de este significaría un descenso de las síntesis de proteínas en las plantas, en este caso del geranio (*Geranium*).

4.2 Evaluación de la digestibilidad de las proteínas de flores de geranio (*Geranium*) tras someterse a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

4.2.1 Simulación de la digestión gástrica y duodenal *in vitro* de los concentrados proteicos provenientes de la flor de geranio (*Geranium*)

Poveda (2016), López (2019) y Zuta (2019) manifiestan que las proteínas son macronutrientes presentes en alimentos cuya función es la aportación de aminoácidos, su valor nutricional depende de la digestibilidad y biodisponibilidad. Por su parte,



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Minikus y col. (2014) sostienen que el método de la digestibilidad *in vitro* simula las condiciones fisiológicas *in vivo*, siendo de importancia la presencia de enzimas digestivas, las concentraciones, el pH gástrico, tiempo de digestión, concentraciones de sal entre otros. Por esta razón, en este estudio se determinó el posible grado de digestibilidad *in vitro* del concentrado proteico (Ajustado el pH del precipitado a 3,0) tras ser sometido a 120 minutos de digestión gástrica y 120 minutos de digestión duodenal de manera secuencial.

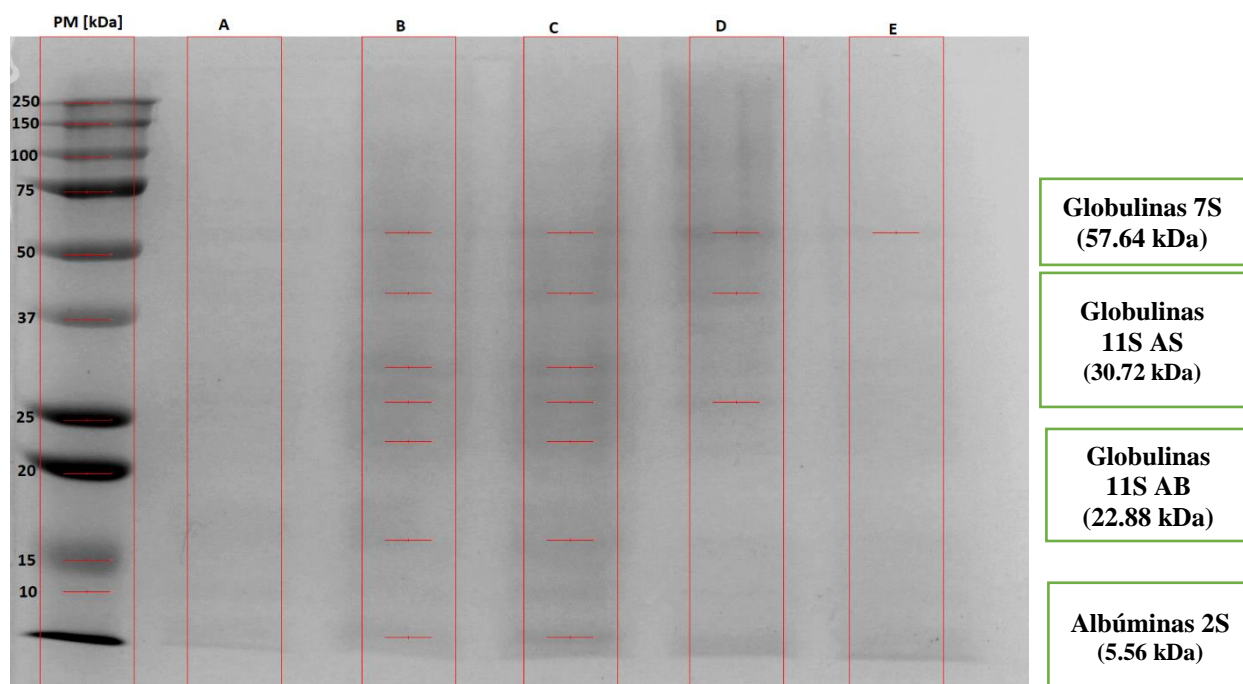
4.2.2 Caracterización de proteínas de la flor, concentrado proteico y digeridos gástrico y duodenal mediante electroforesis SDS- PAGE

La técnica empleada para este estudio fue la electroforética en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Dicha técnica se aplicó para el análisis de la matriz, concentrado proteico a un pH 3,0 y los hidrolizados provenientes de la digestión gastroduodenal *in vitro*.

Se utilizó un estándar de proteína de precisión de pesos moleculares comprendido entre 10 a 250 kDa (**BIO RAD**). Se pudo identificar visualmente la presencia de proteínas en el concentrado e hidrolizado proteico, por medio de la tinción con azul de coomassie.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Figura 1: Electroforesis SDS – PAGE de flor liofilizada, concentrado e hidrolizados proteicos. Estándar; A: flor de geranio; B: concentrado proteico; C: Digestión a tiempo 0; D: Digestión gástrica 120 min; E: Digestión duodenal 120 min.



Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorios de investigación e Innovación UEB

Tabla 3: Identificación del peso molecular de las proteínas. **A:** Estándar **B:** Flor de geranio **C:** Concentrado proteico **D:** Digestión a tiempo 0 **E:** Digestión gástrica 120 min **F:** Digestión duodenal 120 min.

Banda	A	B	C	D	E	F
1	250 kD	57.64	57.64	57.64	57.64	-
2	150 kD	41.81	41.81	41.81	41.81	
3	100 kD	30.72	30.72	30.72	26.82	
4	75 kD	26.82	26.82	26.82		
5	50 kD	22.88	22.88	22.88		
6	37 kD	16.03	16.03	16.03		
7	25 kD	5.56	5.56	5.56		
8	20 kD					
9	15 kD					
10	10 kD					

Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorio de investigación e Innovación UEB



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

En la figura 1 y tabla 3 se puede observar el perfil de proteínas de las flores de geranios con bandas que se encuentran entre pesos moleculares de 5.56 a 57.64 kDa. Se observa la presencia de 7 tipos de proteínas en la flor, concentrado proteico y digerido a tiempo 0 con pesos moleculares de 57.64, 41.81, 30.72, 26.82, 22.88, 16.03 y 5.56 kDa; en el hidrolizado proteico proveniente de la digestión gástrica se evidenciaron 3 tipos de proteínas con pesos moleculares de 57.64, 41.81, 26.82 kDa. En el digerido duodenal no se observa la presencia de proteínas puesto que han sido hidrolizadas, indicando que se ha producido una digestión total.

Según **Tarone y col. (2013)** manifiestan que las globulinas 7S son un conocido grupo de glicoproteínas con pesos moleculares entre 42 a 58 kDa, asociadas principalmente a interacciones hidrofóbicas. Por otra parte, **Vilcacundo (2017)** manifiesta que las globulinas 11S se caracterizan por poseer conjuntos heterogéneos de polipéptidos de tamaño variable comprendido en dos tipos: subunidad ácida o AS (30-40 kDa) y una unidad básica o AB (20-25 kDa). Así mismo, **Quinteros y col. (2016)** manifiestan que las globulinas 11S son glicoproteínas con pesos moleculares de 28,1 kDa a 30 kDa, mientras que las albuminas 2S con un peso molecular < 15 kDa son consideradas proteínas de bajo peso molecular. Por lo tanto, se evidencia en el estudio que las proteínas identificadas podrían corresponder al grupo de las Globulinas 7S (57.64 kDa), 11S AS (30.72 kDa), 11S AB (22.88 kDa) y Albuminas 2S (5.56 kDa) (Figura 1)

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

López (2019), Borja (2014) y Sánchez y col. (2016) manifiestan que los péptidos además de su valor nutricional ofrecen una amplia gama de actividades biológicas, las mismas que pueden verse favorecidas por la secuencia aminoacídica, propiedades de hidrofobicidad, características estructurales y su capacidad para enlazar elementos.

En el presente estudio se evaluó la capacidad antiinflamatoria de la matriz, concentrado proteico y los digeridos gástrico y duodenal, mediante el método del potencial de estabilización de membrana (Tabla 4). Además, se utilizó como patrón el

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

diclofenaco de sodio Merck, fármaco ampliamente utilizado en el área de la medicina para tratar diferentes dolencias como las inflamaciones. Todas las muestras se prepararon a la misma concentración (400 µg/ml), evidenciando el control positivo (Diclofenaco de sodio) un porcentaje de protección de $93,0 \pm 0,005$, la matriz $0,00 \% \pm 0,045$, el concentrado proteico $38,91 \% \pm 0,039$, y el digerido gástrico un porcentaje de $31,77 \pm 0,02$. El digerido duodenal no presentó actividad antiinflamatoria ($0,00 \% \pm 0,045$), lo cual demuestra que a medida que avanza la digestión se pierde la bioactividad de los péptidos generados en la fase gástrica.

Tabla 4: Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de la flor, concentrado proteico y de los péptidos liberados durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Tratamientos	Concentración µg/ml	% de protección
Diclofenaco	400	$93,05 \pm 0,005^D$
Flor de geranio	400	$0,00 \pm 0,045^A$
Concentrado proteico de geranio	400	$38,91 \pm 0,039^C$
Blanco de la digestión	400	$0,00 \pm 0,045^A$
Digestión gástrica a 120 min	400	$31,77 \pm 0,021^B$
Digestión intestinal a 120 min	400	$0,00 \pm 0,028^A$

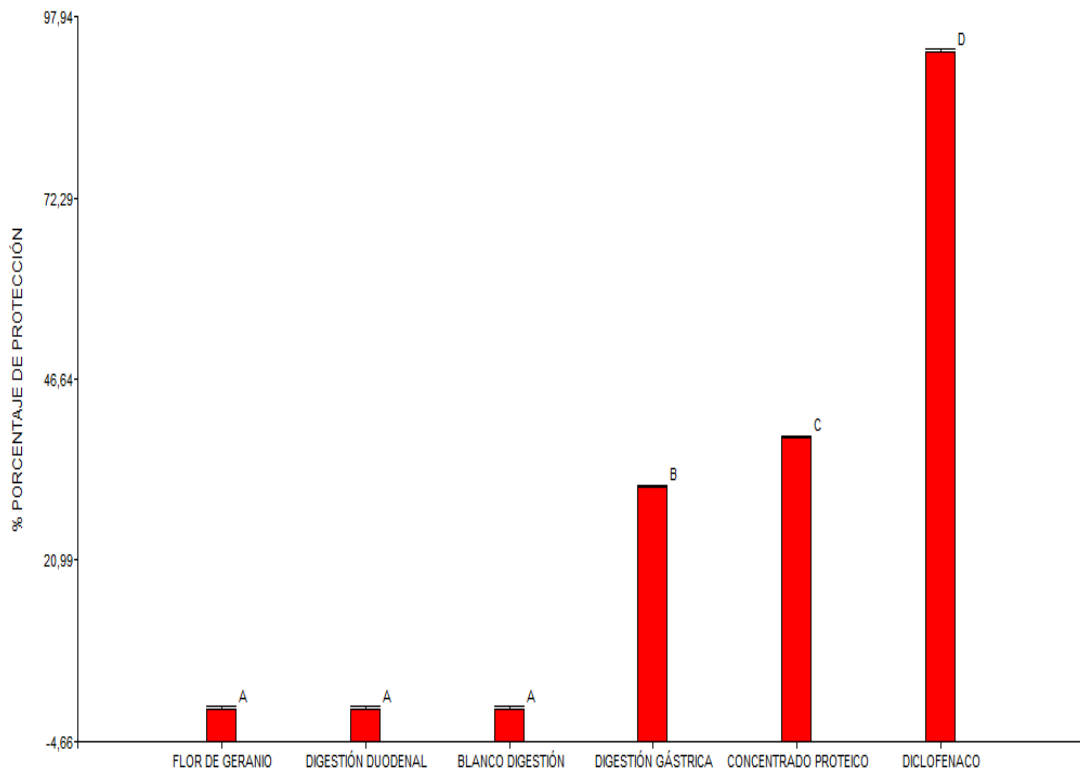
Cada uno de los valores presentados en la tabla representa la media de 3 mediciones \pm la desviación estándar (SD). Letras diferentes indican para cada tratamiento diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los porcentajes de protección de actividad antiinflamatoria de las muestras analizadas.

Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorios de investigación e Innovación UEB

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Figura 2. Comparación de medias de la actividad antiinflamatoria de la flor de geranio, digestión duodenal, blanco de la digestión, digestión gástrica, concentrado proteico y diclofenaco. Diferentes letras indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$, Test de Tuckey).



Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorios de investigación e Innovación UEB

De acuerdo con los resultados (Figura 3) se puede deducir que el concentrado proteico (38.01% de protección) y los péptidos liberados durante la etapa de hidrólisis gástrica (31,77%) serían los responsables de la actividad antiinflamatoria. **Sanchez (2015)** en su estudio relacionado con la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* del geranio, determinó un alto potencial antiinflamatorio en las hojas y flores, atribuyendo esta actividad a los constituyentes flavónicos. Sin embargo, no se experimentó con proteínas y biopéptidos.

En los últimos años se observa una serie de estudios relacionados con la evaluación de la actividad antiinflamatoria de productos naturales, aislados e hidrolizados proteicos



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

de: cúrcuma, geranio, extractos de frutos, semillas, hojas, flores, entre otros. **Yanza (2017)** reporto en su estudio, que el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Oreocallis grandiflora* poseen actividad antiinflamatoria al compararlo con el ácido acetilsalicílico usado como estándar o patrón. Por otra parte, **Hernández- Guerrero y col. (2018)** en su estudio evaluaron farmacológicamente la actividad antiinflamatoria del geranio, encontrando que, a concentraciones de 125, 250 y 500 mg/kg de peso corporal (p.c.), fue capaz de disminuir ($P < 0,05$) la inflamación sin producir daño gastroduodenal macroscópico.

Así mismo, existen estudios en los cuales se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de fuentes vegetales. **Quinteros y col. (2016)** mencionan que el aislado de *Plukenetia volubilis* L. a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ presentó una actividad protectora de 21,87%; **Cobo (2016)** reportó que el aislado proteico de *Ilex Guayusa* a un pH de precipitación de 5,0 y una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, presenta un porcentaje de inhibición de 67,89% y **Vergara (2019)** reporto en su estudio, que el gel elaborado al 1% de extracto etanólico de flores de geranio (*Peleargonium zonale*) tiene un 90.5% de protección disminuyendo así la inflamación en un tiempo de 5 horas, lo que significó que el gel obtenido tiene efecto antiinflamatorio.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Comprobación de las hipótesis

Digestión gastrointestinal *in vitro* de aislados proteicos de (*Geranium*)

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, ya que el concentrado proteico de geranio (*Geranium*) es hidrolizado en su totalidad durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de proteínas de flores de geranio (*Geranium*)

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, puesto que el digerido gástrico obtenido durante la digestión gastrointestinal presentan actividad antiinflamatoria.

5.2 Conclusiones

- Se han establecido condiciones para el proceso de extracción de los concentrados proteicos de las flores de geranio (*Geranium*), alcanzando un rendimiento de 9,40% y un contenido proteico de 18% mediante solubilización de las proteínas a pH 8,0 y posterior precipitación a pH 3,0. En dicho concentrado se evidenció la presencia de siete proteínas con pesos moleculares entre 5,56 y 57,64 kDa, logrando identificar fracciones proteicas como Globulinas 7S, Globulinas 11S y Albúminas 2S.
- Se evaluó la digestibilidad de las proteínas de flores de geranio tras simular el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. En el transcurso de la fase gástrica las proteínas fueron hidrolizadas parcialmente por la pepsina, mientras que en la fase duodenal fueron degradadas completamente por acción de la pancreatina.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

- Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro*, demostrando que el concentrado proteico y los péptidos liberados durante la etapa de hidrólisis gástrica son responsables de dicha actividad, con una protección del 38,01% y 31,77% respectivamente. El digerido duodenal no presentó capacidad antiinflamatoria.
- El extracto de proteína de geranio podría ser considerado como fuente de compuestos bioactivos para el desarrollo de productos alimenticios funcionales y nutraceúticos.

5.3 Recomendaciones

- Realizar el aislamiento de proteína de las flores de geranio a diferentes pHs de solubilización y precipitación, con la finalidad de mejorar el rendimiento y la concentración de proteína.
- Determinar el perfil de aminoácidos presentes en la proteína de flores de *Geranium*.
- Llevar a cabo un estudio de la digestibilidad gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas a diferentes pHs.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria utilizando modelos *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos.
- Evaluar la citotoxicidad de las proteínas en modelos celulares.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Identificación de proteínas aisladas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio con agua y disolventes de NaCl 0,1 M. Revista Asiática de Investigación Clínica y Farmacéutica, 9(3).



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Argueta-Villamar, A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional. (vol. 2). México D. F.: Instituto Nacional Indigenista.

Arhewoh. J. F., Ahonkhai. E. I., y Okhamafe, A. O. (2005). Optimización de los sistemas orales para el suministro de proteínas y péptidos terapéuticos. Revista Africana de biotecnología, 4, 1591-1597.

Borja, J. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus sp.* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú]. Recuperado el 21 de Octubre del 2021 de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3924/Borja_lj.pdf?sequence=1

Bellomonte, G., Costantini, A. y Giammarioli, S. (1987). "Comparación del método Dumas automático modificado y el método Kjeldahl tradicional para la determinación de nitrógeno en alimentos infantiles". Journal - Association of Official Analytical Chemists: 227-229.

Bouhlali, E., Sellam, K., Bammou, M., Alem, C. y Filalizehzouti, Y. (2016). Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias *in vitro* de plantas medicinales marroquíes seleccionadas. Journal of Applied Pharmaceutical Science 6 (05); 156-162

Cárdenas, M. (2016). Obtención de aislados proteicos de chía (*Salvia hispánica L.*) y evaluación *in vitro* de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23819/1/AL606.pdf>

Carvajal, D y Catucuamba, E. (2019). Determinación *in vitro* de la digestibilidad gástrica y duodenal en concentrados proteicos de *Moringa Oleifera*. [Tesis de pregrado, Universidad Estatal de Bolívar].

Carrasco-Hernández, B. (2011). Estudio etnobotánico de los huertos familiares del Ejido Tezoncualpan, Municipio de Cuauhtepic de Hinoja, Hidalgo (Tesis de



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Carrasco-Castilla, J., Hernández-Alvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., y Dávila-Ortiz, G. (2012). Uso de métodos de proteómica y peptidómica en la ciencia e ingeniería de péptidos bioactivos de alimentos. *Reseñas de Ingeniería en Alimentos*, 4, 224-243.

Cobo, P. (2016). Determinación de la actividad antioxidante, polifenoles, actividad antiinflamatoria y digestión gastrointestinal *in vitro* en proteínas de hoja de *Ilex guayusa*. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24099/1/AL615.pdf>

De la Torre Lucia, N. H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito & Aarhus: HERBARIO QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Obtenido de TRAMIL. Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe.

FAO (2013). Evaluación de la calidad de las proteínas alimentarias en la nutrición humana. Documento sobre alimentación y nutrición 92.

Fatma, A.; Sokindra, K.; Shah, A. (2014). Estimación del contenido de fenoles totales, actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de flores de *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 3:623-627

Filho, A., Pirozi, M., Borges, J., Pinheiro, H., Chaves, J & Coimbra, J. (2017). Quinoa: Nutritional, functional, and antinutritional aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1618-1630. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.1001811>

Gandhisan, R., Thamarachelvan, A. y Baburaj. (1991). Acción antiinflamatoria de la estabilización de la membrana de *Lanea coromandelica* Hrbc. *Fitoterapia*.62, 82- 83.

Gómez Estrada, H., Gómez Ruiz, K. y Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales*



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

y Aromáticas 10 (3): 182 – 217.

Guerrero, J., Ortiz, Z., Peralta, L. y Perez, F. (2013). Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a clorhexidina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 224-236. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n2/pla06213.pdf>

Hernández-Guerrero, V. G., Meléndez-Camargo, M. E., Márquez-Flores, Y. K., & Arreguín-Sánchez, M. de la L. (2018). Estudio etnobotánico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Geranium seemanii* PEYR. (MUNICIPIO DE OZUMBA, ESTADO DE MÉXICO). *Polibotánica*, 0(46), 287–303. DOI: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.19>

Huang, H. L., Liu, C. T., Chou, M. C., Ko, C. H. y Wang, C. K. (2015). Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extracts improve colon microflora and exert antiinflammatory activities in caco-2 cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(6), 663– 676. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3213>

Ibáñez, L. (2003). Caracterización química y efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Pelargonium robertianum* L. *Ciencia e Investigación*, 2(ISSN 1561-0861), 3–9.

Jiménez, R., Martos, G., Carrillo, W., López, R & Molina, E. (2012). "Susceptibility of lysozyme to in vitro digestion and immunoreactivity of its digests". *Food Chem*, 127(4), 1719 1726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>

Kero Jemal, B.V. y Sudhakar, P. (2016). Propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas *in vitro* de los extractos de hoja de *Allophylus serratus*. *Revista International Journal of Advanced Research (IJAR)*, 5(3), 71-80. DOI: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/3487>

Kim, GJ. (2013). Efectos antialérgicos inflamatorios de los glucósidos cianogénicos y fenólicos de la semilla de *Prunus persica*. *Comunicaciones de Productos Naturales*,



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

1739-1750.

Lara- Cortés, E., Osorio-Díaz, P., Jiménez- Aparicio, A. y Bautista- Baños, S. (2013). Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. Revista ALAN (Archivos Latinoamericanos de Nutrición), 63 (3). Obtenido de <https://www.alanrevista.org/ediciones/2013/3/art2/#:~:text=Las%20flores%20comestibles%20contribuyen%20al,salud%20de%20quien%20las%20consume>.

Laemmli, U. (1970). Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblaje del bacteriófago térmico T4. Nature, 227:680-685

López, K. (2019). Evaluación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro, actividades antiinflamatoria y antioxidante en concentrados e hidrolizados proteicos extraídos de harina de gandul (*Cajanus cajan*). [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/29421/1/BQ%20183.pdf>

Lee, H. (2002). Administración oral de fármacos proteicos: el progreso reciente. Archives of Pharmacal Research, 25 (5), 572-584

Marchi , P. (2014). El jugo de uva concentrado (G8000 TM) reduce la inmunoexpresión de iNOS, TNF-alfa, COX-2 y el daño del ADN en la colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico. TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA AMBIENTAL 37, 819-827.

Martínez, J. J., Medina, O. J., & Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuyá (*Pasiflora edulis f.*). Revista de la Facultad de Ciencia Básicas, 9, 70-76.

Mendoza, C. G. y Lugo, P. R. (2010). Farmacia viviente, conceptos, reflexiones y aplicaciones. Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia.

Mitani, H., Takimoto, M., Hughes, T. E., & Kimura, M. (2002). La inhibición de la



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

dipeptidil peptidasa IV mejora la tolerancia a la glucosa alterada en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas: estudio utilizando una subcepa de rata Fischer 344 deficiente en su actividad enzimática. *Revista Japonesa de Farmacología*, 88, 442–450.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). Un método de digestión in vitro estático estandarizado adecuado para alimentos: un Consenso Internacional. *Comida y Función*, 5, 1113–1124.

Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M. G. F., Mendoza Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., & Ramos-Gómez, M. (2018). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 481–495. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i3.1443>

Müller, J. (2017). ¿Dumas o Kjeldahl para el análisis de referencia?. *FOSS*, 1-5.

Murugan, R. y Parimelazhagan, T. (2014) Evaluación comparativa de diferentes métodos de extracción de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de *Osbeckia parvifolia Arn in vitro*. *J King Saud Univ Sci*; 26(4): 267-275.

Palate, K. (2021). Estudio de la composición nutricional de flores comestibles Diente de león (*Taraxacum officiale*), Tronadora (*Tecoma stans*), Mastuerzo (*Tropaeolum majus*), Girasol (*Helianthus annuus*) para potenciar su consumo. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32595/1/AL%20779.pdf>

Peñaherrera, E. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Cuenca*, 1390 -1869

Pombo, L., Matulevich, J., Borrego, P., Castrillón, W. y Barajas, L. (2016). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Pelargonium odoratissimum* (L) L`Hér (Geraniaceae). *Revista Facultad Ciencias Básicas*, 12(1), 74-



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

83. DOI: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1856>

Posada, J. (2005). Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros (Antioquía, U d Ed.). Colombia.

Poveda, T. (2016). Evaluación del grado de Digestibilidad gastrointestinal, Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de Aislados proteicos de torta de sésamo (*Sesamum indicum*). [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23824/1/AL609.pdf>

Quinteros, MF., Vilcacundo, R., Carpio, C. y Carillo, W. (2016). Digestibilidad y actividad antiinflamatoria in vitro de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*). Revista Asian J Pharm Clin Res, 9(3), 303-306.

Rengifo-Salgado, E., Ríos-Torres, S., Malaverri, L. F., & Vargas-Arana, G. (2017). Saberes ancestrales sobre el uso de flora y fauna en la comunidad indígena Tikuna de Cushillo Cocha, zona fronteriza Perú-Colombia-Brasil. Revista Peruana de Biología, 24(1), 67-78. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13108>

Reshma, Arun, KP. y Brindha, P. (2014). Estudios antiinflamatorios, antioxidantes y nefroprotectores in vitro en hojas de Aegle marmelos y *Ocimum sanctum*. Asian Journal Pharm Clinical Research, 7 (4): 121-129.

Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Sefora-Rutella, G., Taneyo-Sa, D. L., y Gianotti, A. (2016). Péptidos bioactivos de matrices de alimentos vegetales: Tendencias de Investigación y nuevas Biotecnologías para síntesis y recuperación. Revista de Alimentos Funcionales, 17, 549-569.

Sadique, J., Al-Rqobahs, WA., Bughaith y EI-Gindi, AR. (1989). La bioactividad de ciertas plantas medicinales sobre la estabilización del sistema de membranas RBS. Fitoterapia; 60:525-32

Sakat, S., Juvekar, AR. y Gambhire MN. (2010). Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro del extracto metanólico de *Oxalis corniculata Linn.* Int J



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Pharm Pharm Sci;2(1):146-5

Sánchez, A. (2015). Evaluación de la actividad cicatrizante in vitro del Geranio (*Pelargonium x domesticum L.H. Bailey*) mediante inhibición de hialuronidasa. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/4612/1/56T00594%20UDCTFC.pdf>

Sánchez, N., Dávila, G & Jiménez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. In Ramírez, M (Ed.), Alimentos Funcionales de Hoy (pp. 117-142). Barcelona: OmniaScience.

Tarone, A.G., Fasolin, L.H., Perrechil, F.A., Hubinger, M.D., y Cunha, R.L. (2013). Influence of drying conditions on the gelling properties. Food and Bioproducts., 111-120.

Toapanta, A., Carpio, C., Vilcacundo, R. y Carrillo, W. (2016). Análisis de proteína aislada de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 9 (2), 332-334.

Vergara, T. (2019). Efecto antiinflamatorio del gel elaborado a base del extracto etanólico de las flores de *Pelagornium zonale* (GERANIO ROJO) EN *Rattus rattus* var. *Albinus*. [Tesis de pregrado, Universidad Católica Los Ángeles Chimbote, Perú]. http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/14908/ANTIINFLAMATORIO_GEL_TOMAS_VERGARA_GEORGE_JOSHUA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Liberación de péptidos inhibidores de dipeptidil peptidasa IV, α -amilasa y α glucosidasa de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) durante la digestión gastrointestinal simulada in vitro. Revista de alimentos funcionales, 35, 531–539. doi:10.1016/j.jff.2017.06.02

Vilcacundo, R., Miralles, B., Carrillo, W., & Hernández-Ledesma, B. (2018). Propiedades quimiopreventivas in vitro de péptidos liberados de proteína de quinua



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

(*Chenopodium quinoa Willd.*) bajo digestión gastrointestinal simulada. *Internacional de Investigación Alimentaria*, 105, 403–411. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.036

Vilcacundo, R., Barrio, D., Carpio, C., García-Ruiz, A., Rúaless, J., Hernández Ledesma, B., & Carrillo, W. (2017). Digestibilidad del concentrado de proteína de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) y su potencial para inhibir la peroxidación de lípidos en el modelo de larvas de pez cebra. *Alimentos vegetales para la nutrición humana*, 72(3), 294–300.

Vilcacundo, R. y Hernández-Ledesma, B. (2017). Valor nutricional y biológico de la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Opinión actual en Ciencia de los Alimentos*, 14, 1–6.

Vilcacundo, R. (2017). Liberación de péptidos multifuncionales durante la digestión gastrointestinal simulada de proteínas de Quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) y Amaranto (*Amaranthus caudatus*). [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/683691/vilcacundo_chamorro_ruben_dario.pdf?sequence=1&isAllowed=y

WHO. (2018). ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Obtenido de WHO.int: http://www.who.int/topics/traditional_medic

Yanza, M. (2017). Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7929/1/56T00743.pdf>

Zuta, N. (2019). Efectividad antioxidante, antibacteriana y moduladora del extracto alcohólico de hojas de *Pelargonium hortorum* “Geranio” frente a *Staphylococcus aureus* de resistencia múltiple. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Callao]. http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/3991/ZUTA%20ARRIOLA_DOCTORADO_2019r.pdf?sequence=4&isAllowed=y#:~:text=%2D%20Las%20hojas%20de%20Pelargonium%20hortorum,antibi%20del%20ciprofloxacina%20y%20gentamicina



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

5.5 ANEXOS

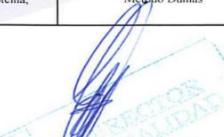
Anexo 1: Certificado de análisis de cuantificación de proteína en la matriz y concentrado de proteína de flores de geranio.



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO DE CONTROL Y ANÁLISIS DE ALIMENTOS**

0000548

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No: 21-109		R01-7.8 03				
Solicitud N°: 21-109	Fecha recepción: 17 de noviembre de 2021	Fecha de ejecución de ensayos: 17 de noviembre de 2021				
Pág.: 1 de 1						
Información del cliente:						
Empresa:	C.I./RUC: 0503777732					
Representante: Edwin Santiago Tapia Sanchez	TIF: O998790441					
Dirección: Latacunga	Email: edwin.tapia2@utc.edu.ec					
Ciudad: Latacunga						
Descripción de las muestras:						
Producto: Geranio 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				
RESULTADOS OBTENIDOS						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados/ Técnica	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Geranio comestible liofilizado	10921262	GL	Proteína,	Método Dumas	%(Nx6,25)	13,2
Concentrado proteico de Geranio Liofilizado	10921263	CPG	Proteína,	Método Dumas	%(Nx6,25)	18,0
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 emitidos 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 referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. 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



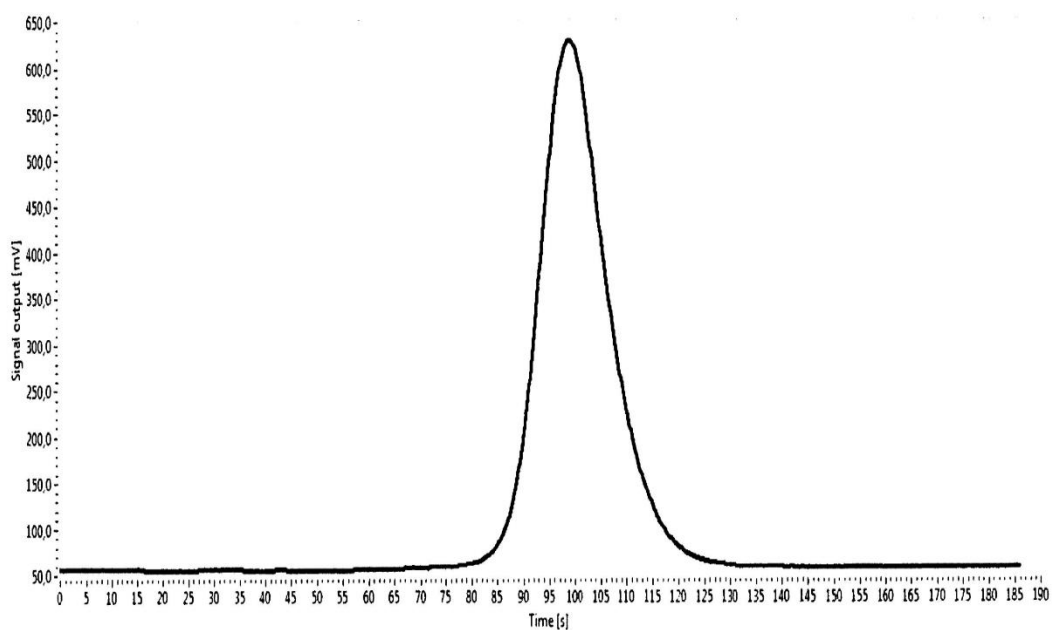
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Anexo 2: Curva de calibración de cuantificación de proteína en las flores de geranio.

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	10:51:48	GL	100,27	400,0	1,0	235,8	19	6,25	9260,4	2,1288	2,123	13,269



Working Calibration:

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



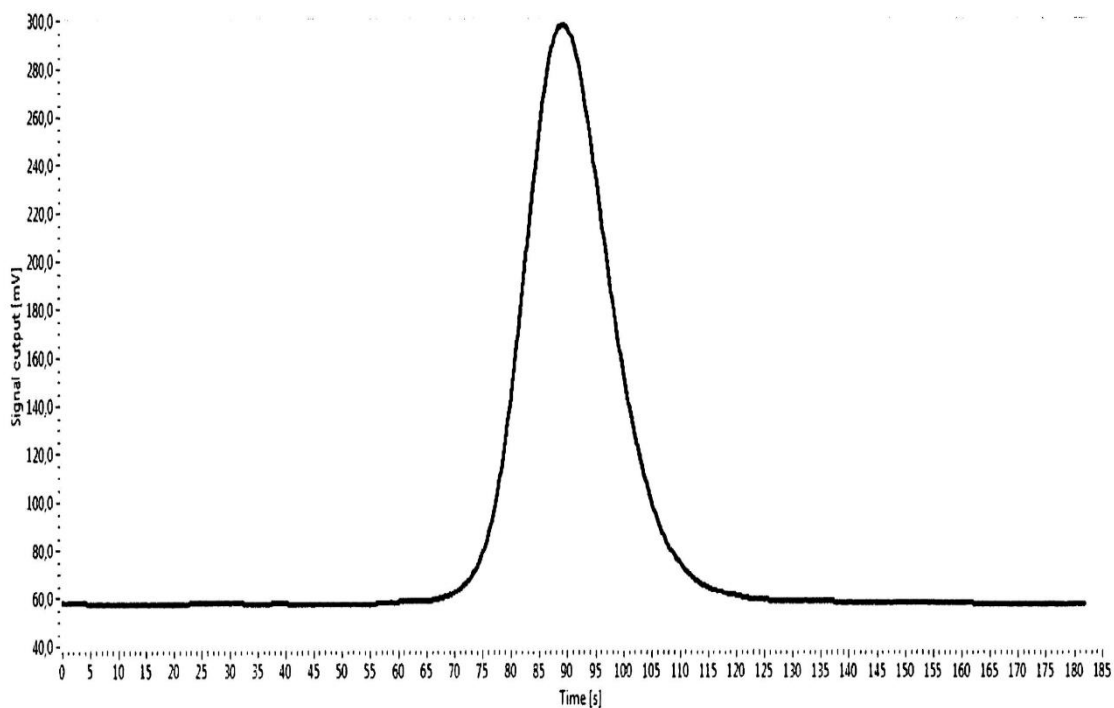
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Anexo 3: Curva de calibración de cuantificación de proteína en el concentrado proteico de flores de geranio.

Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date	Time	Sample Name	Weight	O2 Flow Rate	O2 Factor	Analysis Time	Calibration Number	Proteins [% Factor]	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
17/11/21	10:56:30	CPG	34,88	400,0	1,0	231,8	19	6,25	4473,4	1,0057	2,883	18,021



Working Calibration:

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

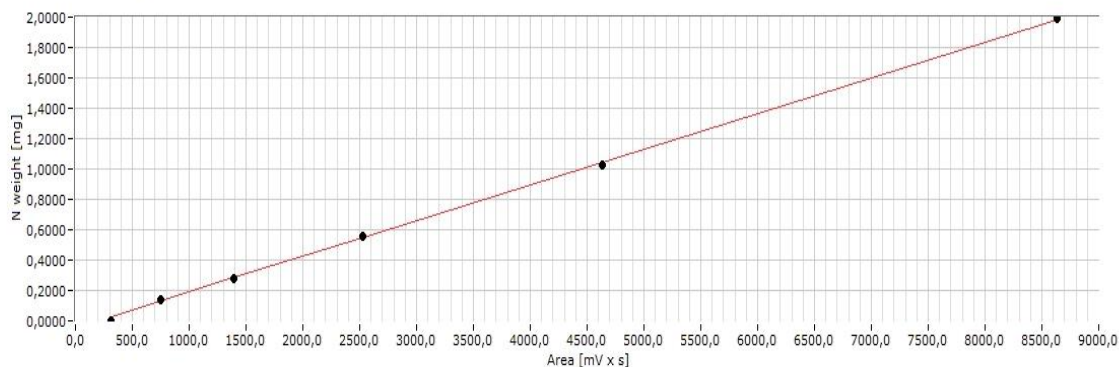


UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Anexo 4: Curva de calibración de EDTA para el equipo Dumas

NDA Dumas Nitrogen Analyser - Calibration

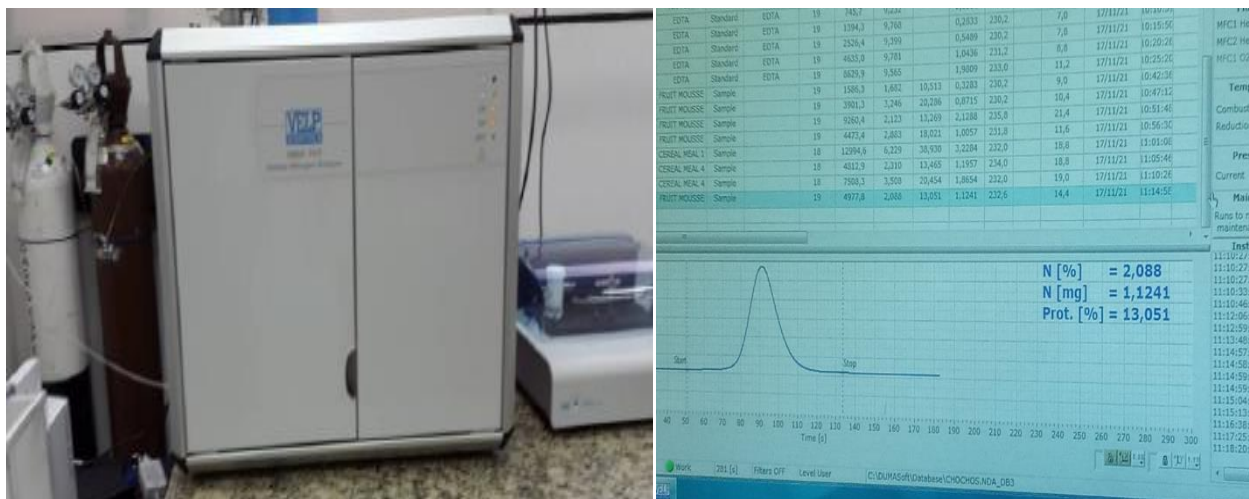
Calibration blank: Yes CF: 1,000 R2: 0,999725 Polynomial: $Y = -4,385858E-2 + X * 2,346229E-4$



Number	Standard	Standard Weigth [mg]	Area [mV x s]	N theoretical [mg]	N [mg]	N [%]	Blank [mV x s]	Residual error [mg]	Relative error [%]	Show	Date [dd/mm/yy]
1	Calibration blank	0,000	314,8	0,0000	0,0300	ND	0,0	0,0300	ND	Yes	17/11/21
2	EDTA	1,420	745,7	0,1363	0,1311	9,232	0,0	-0,0052	-3,815	Yes	17/11/21
3	EDTA	2,900	1394,3	0,2784	0,2833	9,768	0,0	0,0049	1,751	Yes	17/11/21
4	EDTA	5,840	2526,4	0,5606	0,5489	9,399	0,0	-0,0117	-2,088	Yes	17/11/21
5	EDTA	10,670	4635,0	1,0243	1,0436	9,781	0,0	0,0193	1,886	Yes	17/11/21
6	EDTA	20,710	8629,9	1,9882	1,9809	9,565	0,0	-0,0073	-0,367	Yes	17/11/21

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

Anexo 5: Equipo Dumas



Elaborado por: Tapia, E. (2021)

Fuente: Laboratorio de Control y análisis de Alimentos LACONAL (2021)

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

Anexo 6: Evidencias prueba de laboratorio

OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO DE FLORES DE
GERANIO (*Geranium*)



Figura 3. Obtención de la harina de las flores de geranio



Figura 4. Pesado de las muestras



Figura 5. Precipitación de la muestra con agua destilada.



Figura 6. Proceso de agitación y ajuste de pH a 8.0 de geranio (2N NaOH).

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS

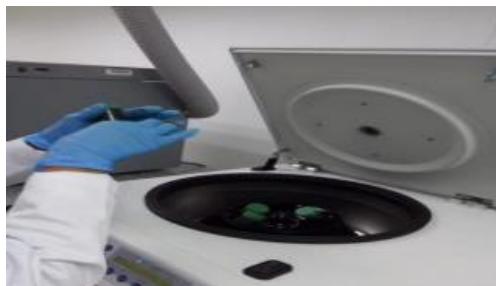


Figura 7. Centrifugación de la muestra a 8000 rpm por 20 min.



Figura 8. Presentación del sólido y sobrenadante después de la centrifugación.



Figura 9. Proceso de filtración



Figura 10. Proceso de agitación y ajuste de pH 3.0 de precipitación con HCL 2N



Figura 11. Secado por liofilización del aislado proteico de geranio a un pH de 3,0.

SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO* DEL AISLADO PROTEICO DE LAS FLORES DE GERANIO (*Geranium*)



Figura 12. Pesado de muestras para cada tratamiento de digestión *in vitro*: Tiempo 0, Digestión gástrica y duodenal.



Figura 13. Simulación de la digestión *in vitro* a Tiempo 0, Digestión gástrica a 120 min y duodenal a 120 min.



Figura 14. Agitación orbital de las muestras de la digestión *in vitro* (120 min de digestión gástrica y 120 min de duodenal).

TÉCNICA DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE



Figura 15. Pesado de reactivos para elaboración de los geles de acrilamida.



Figura 16. Elaboración de buffers y ajuste de pHs.



Figura 17. Preparación del buffer running para la cámara electroforética.

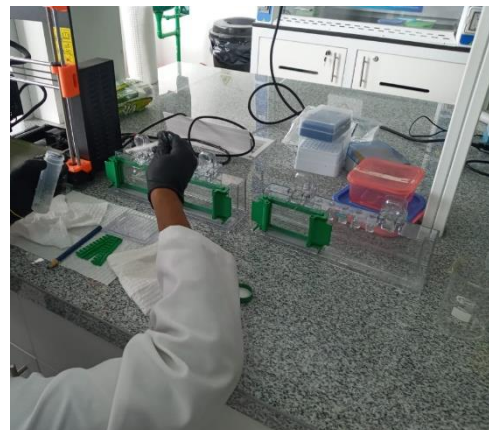


Figura 18. Elaboración del gel mayor y menor a un espesor de 1 mm, inserte de peine para elaboración de pocillos.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**

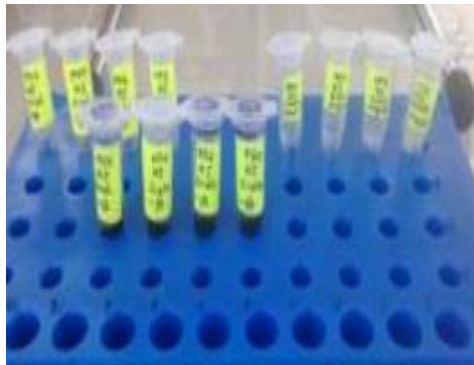


Figura 19. Preparación de la muestra



Figura 20. Inyección de 10 μ l de muestra y 10 μ l de estándar de proteína (BIO-RAD) en los pocillos del gel para corrida electroforética.



Figura 21. Corrida electroforética a 200 V por 45 min del gel con las muestras.



Figura 22. Teñido con azul de Coomassie.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**



Figura 23. Gel en solución de desteñido.

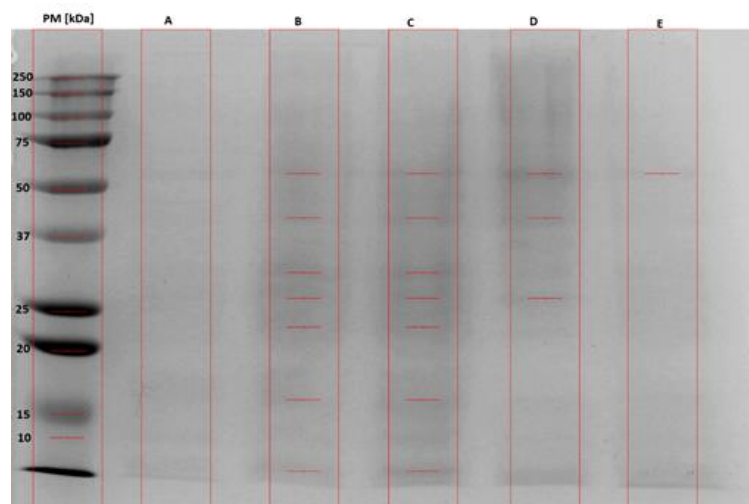


Figura 24. Imagen obtenida en el Fotodocumentador AnalytikJena GelTower y el software Visión Works versión 8.20.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VITRO*



Figura 25. Preparación de los reactivos para la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

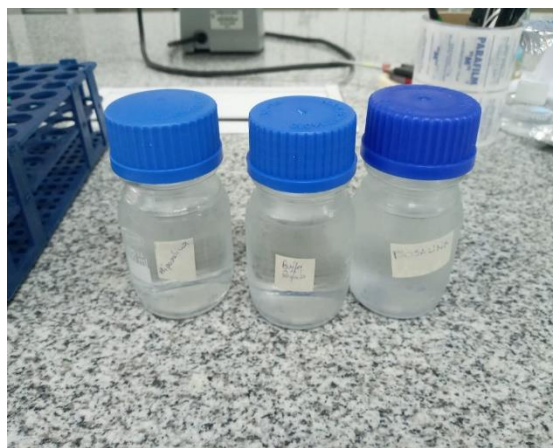


Figura 26. Solución hiposalina y isosalina, buffer fosfato.

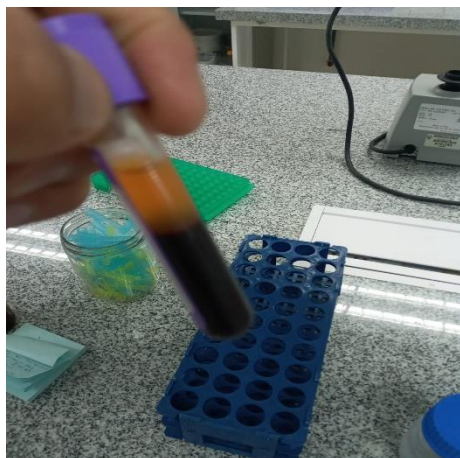


Figura 27. Muestra de sangre humana con anticoagulante.

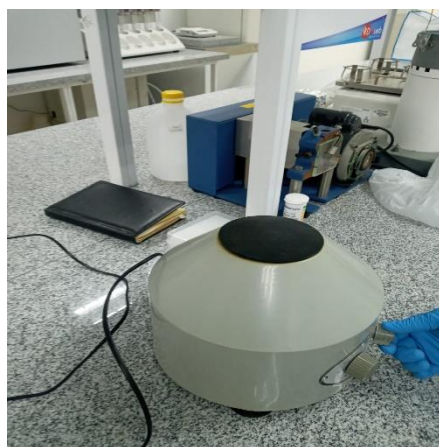


Figura 28. Centrifugado de la muestra de sangre con solución isosalina a 3000 rpm.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**



Figura 29. Reconstitución de la sangre para la evaluación de la actividad antiinflamatoria .



Figura 31. Agitación de la muestra de sangre reconstituida con solución isosalina.



Figura 30. Preparación de la muestra (1 ml de buffer fosfato, 2 ml de solución hiposalina, 1 ml de extracto de geranio y 0,5ml de sangre reconstituida.



Figura 32. Incubación de la muestra de reacción a 37 °C por 30 min.

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
CENTRO DE POSGRADOS**



Figura 33. Centrifugado para obtención del sobrenadante de reacción para medición de absorbancias.

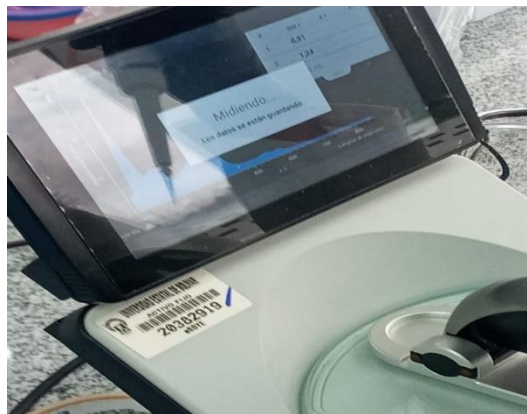


Figura 34. Lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro para cálculos de la actividad antiinflamatoria.