



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



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

**CARRERA DE ALIMENTOS**

---

Identificación de proteínas en concentrados de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.)

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Emily Andrea Núñez Pérez

**Tutor:** PhD. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

**Ambato - Ecuador**

**Febrero - 2024**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Rubén Darío Vilcacundo Chamorro Ph.D

### **CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero del 2024

---

Rubén Darío Vilcacundo Chamorro Ph.D

1802738102

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo Emily Andrea Núñez Pérez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Emily Andrea Núñez Pérez

1805103361

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, proceso de integración, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y realice respetando mis derechos de autor.



---

Emily Andrea Núñez Pérez

1805103361

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:

---

Presidente del tribunal

---

Ing. Diego Manolo Salazar Garcés Ph.D

1803124294

---

Ing. M.Sc. Liliana Patricia Acurio Arcos

1804067088

Ambato, 06 de febrero de 2024

## DEDICATORIA

*Esta tesis está dedicada en primer lugar a Dios, quien ha sido mi guía y soporte a lo largo de toda mi vida. Su presencia constante en esta montaña rusa de emociones llena de alegrías y tropiezos, me ha dejado valiosos conocimientos no solo en el ámbito académico, sino también en lo personal.*

*A mis padres, Consuelo y Luis quiénes han sido mi ejemplo e impulso para superar obstáculos, seguir adelante y no rendirme ante la adversidad. Gracias por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por enseñarme a ser una persona excepcional, y por brindarme todo su amor, comprensión y apoyo incondicional para cumplir cada una de mis metas.*

*A mis hermanos, Belén y José por brindarme risas, palabras de aliento y abrazos en los momentos en que más lo necesitaba. A mi prima Damaris por su apoyo emocional constante y a mi abuelita Olivia por enseñarme que, con trabajo, sacrificio y mucha dedicación, puedo lograr cualquier cosa que me proponga.*

*También me la dedico a mí, por el esfuerzo diario empleado, las largas horas de trabajo, sacrificio, dedicación y entrega puesta en cada una de las páginas de esta tesis.*

**Emily Núñez**

## AGRADECIMIENTO

*A Dios por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles. Con todo mi corazón, agradezco a mis padres por el arduo trabajo y sacrificio para apoyarme y así continuar con mis estudios.*

*A mis hermanos, primos, tíos y abuelita les agradezco profundamente por incentivar-me a cumplir mis metas y aspiraciones.*

*A la Universidad Técnica de Ambato a través de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por abrirme las puertas y darme la oportunidad de adquirir los conocimientos necesarios para formarme y ser una gran profesional.*

*A mi tutor Dr. Rubén Vilcacundo por su tiempo, guía y paciencia en el desarrollo de este trabajo; a mis docentes Dr. Mayra Paredes y Dra. Jaqueline Ortiz por su apoyo incondicional.*

*A mis amigos, Carlitos, Andre, Jessi y Jefferson quiénes han sido mi soporte fundamental a lo largo de mi formación universitaria. Mi agradecimiento también se extiende a mis amigos del colegio y aquellos amigos que hice a través del tiempo. Les estoy totalmente agradecida por los momentos de ayuda cuando más los necesitaba, por las experiencias y aventuras compartidas; así como por los momentos divertidos que hemos vividos juntos. Siempre llevaré en mi corazón la valiosa contribución que han hecho a mi vida.*

**Emily Núñez**

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
RESUMEN EJECUTIVO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes de la investigación .....	1
1.1.1. Sambo ( <i>Cucurbita ficifolia</i> B.).....	1
Taxonomía del sambo .....	1
Morfología del Sambo.....	2
Composición nutricional del sambo.....	2
Beneficios del consumo de sambo .....	3
Producción de sambo en Ecuador .....	4
Aplicaciones del sambo.....	5
1.1.2. Semillas de sambo.....	5



Obtención de las semillas de sambo.....	5
Composición nutricional de las semillas de sambo.....	6
Beneficios de las semillas de sambo .....	7
Aplicaciones de las semillas de sambo .....	7
1.1.3. Consumo de sambo y sus derivados en Ecuador .....	7
1.1.4. Proteína .....	8
1.1.5. Concentrados proteicos .....	8
1.1.6. Métodos de extracción de proteína .....	8
1.1.7. Métodos de determinación de proteínas.....	9
1.1.8. Métodos de análisis de proteína .....	9
1.2 Objetivos .....	10
1.2.1 Objetivo general.....	10
1.2.2 Objetivos específicos .....	10
1.3 Hipótesis.....	10
CAPÍTULO II .....	11
METODOLOGÍA .....	11
2.1 Materiales.....	11
2.1.1 Materia prima.....	11
2.1.2 Materiales de laboratorio.....	11
2.1.3 Equipos.....	12
2.2 Métodos.....	12
2.2.1 Obtención de la harina de semillas de sambo .....	12
2.2.2 Obtención de los concentrados proteicos .....	13
2.2.3 Diseño experimental.....	13
2.2.4 Determinación de proteína por el método Dumas.....	14

2.2.5 Análisis de proteínas en los concentrados bajo condiciones reductoras .....	15
CAPÍTULO III.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
3.1 Análisis y discusión de resultados.....	17
3.1.1 Extracción y rendimiento de concentrados proteicos de las semillas de sambo ( <i>Cucurbita ficifolia</i> B.).....	17
3.1.2 Cantidad de proteína en los concentrados proteicos de semillas de sambo .....	21
3.1.3 Análisis de proteína en los concentrados proteicos de semillas de sambo .....	25
3.2 Verificación de hipótesis.....	27
CAPÍTULO VI.....	28
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
4.1 Conclusiones .....	28
4.2 Recomendaciones.....	29
MATERIALES DE REFERENCIA .....	30
Referencias bibliográficas.....	30
Anexos.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del sambo.....	1
<b>Tabla 2.</b> Composición nutricional del sambo (Cucurbita ficifolia B.) (100 g de sambo). 3	3
<b>Tabla 3.</b> Contenido nutricional de las semillas de sambo (100 g de semillas).....	6
<b>Tabla 4.</b> Diseño factorial A*B.....	14
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento de concentrados a diferentes pHs por cada 25 g de muestra. ....	18
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de proteína en los concentrados proteicos de semillas por el método Dumas. ....	21
<b>Tabla 7.</b> Análisis de proteína por el método de electroforesis SDS-PAGE de los concentrados proteicos de las semillas de sambo, bajo condiciones reductoras. ....	25
<b>Tabla 8.</b> Datos obtenidos de concentrados proteicos de semillas de sambo liofilizadas.	59
<b>Tabla 9.</b> Análisis estadístico para el porcentaje de rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo.....	59
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo.....	60
<b>Tabla 11.</b> Prueba de rangos múltiples (Tukey) para el Factor A.....	60
<b>Tabla 12.</b> Prueba de rangos múltiples (Tukey) para el Factor B.....	61
<b>Tabla 13.</b> Prueba de rangos múltiples (Tukey) del porcentaje de rendimiento para cada tratamiento.....	61
<b>Tabla 14.</b> Datos obtenidos de la cuantificación de proteína en porcentaje de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas. ....	61

<b>Tabla 15.</b> Análisis estadístico de la cuantificación de proteína (%) de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas. ....	62
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de proteína de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas. ....	63
<b>Tabla 17.</b> Prueba de rangos múltiples del porcentaje de rendimiento para el Factor A por el método Dumas.....	63
<b>Tabla 18.</b> Prueba de rangos múltiples del porcentaje de rendimiento para el Factor B por el método Dumas.....	64
<b>Tabla 19.</b> Prueba de rangos múltiples Tukey del porcentaje de rendimiento para cada tratamiento por el método Dumas. ....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sambo tierno ( <i>Cucurbita ficifolia</i> B.).....	2
<b>Figura 2.</b> Ubicación geográfica de la producción de sambo.....	4
<b>Figura 3.</b> Semilla de sambo con corteza .....	5
<b>Figura 4.</b> Semilla de sambo sin corteza (fresca) .....	6
<b>Figura 5.</b> Semillas de sambo sin corteza (secas).....	6
<b>Figura 6.</b> Medición del rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo expresado en porcentaje a diferentes pHs de solubilización (8.0, 12.0) y pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0 y 5.0). Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre tratamientos.....	18
<b>Figura 7.</b> Medición de cantidad de proteína en los concentrados proteicos de las semillas de sambo expresado en porcentaje a diferentes pHs de solubilización (8.0, 12.0) y pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0 y 5.0). Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre tratamientos.....	21
<b>Figura 8.</b> Gráfico de interacciones del factor A que representa los pHs de solubilización (8.0, 12.0) y el factor B que representa los pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0, 5.0) en función de sus medias del porcentaje de proteína extraída. ....	24
<b>Figura 9.</b> Electroforesis SDS-PAGE de harina y concentrados proteicos bajo condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) de semillas de sambo. En el pocillo 1 se colocó el estándar, en el pocillo 2 se colocó la harina, mientras que en los pocillos 3,4,5,6,7,8, 9 y 10 se colocaron las muestras 8.0-2.0, 8.0-3.0, 8.0-4.0, 8.0-5.0, 12.0-2.0, 12.0-3.0, 12.0-4.0 y 12.0-5.0 respectivamente. Gel visualizado en el fotodocumentaor y software Vision Works.....	25

<b>Figura 10.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo - <b>R1</b> .....	41
<b>Figura 11.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo – <b>R2</b> .....	42
<b>Figura 12.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 2 de precipitación - <b>R1</b> .....	43
<b>Figura 13.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 2 de precipitación – <b>R2</b> .....	44
<b>Figura 14.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 3 de precipitación – <b>R1</b> .....	45
<b>Figura 15.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 3 de precipitación – <b>R2</b> .....	46
<b>Figura 16.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación – <b>R1</b> .....	47
<b>Figura 17.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación – <b>R2</b> .....	48
<b>Figura 18.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 5 de precipitación – <b>R1</b> .....	49
<b>Figura 19.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 5 de precipitación – <b>R2</b> .....	50
<b>Figura 20.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 2 de precipitación – <b>R1</b> .....	51
<b>Figura 21.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 2 de precipitación – <b>R2</b> .....	52
<b>Figura 22.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 3 de precipitación – <b>R1</b> .....	53

<b>Figura 23.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 3 de precipitación – <b>R2</b> .....	54
<b>Figura 24.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 4 de precipitación – <b>R1</b> .....	55
<b>Figura 25.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 4 de precipitación – <b>R2</b> .....	56
<b>Figura 26.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 5 de precipitación – <b>R1</b> .....	57
<b>Figura 27.</b> Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 5 de precipitación – <b>R2</b> .....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Obtención de harina y concentrados de las semillas de sambo.....	38
<b>Anexo 2.</b> Gráficas de cuantificación de proteína en el equipo Dumas .....	41
<b>Anexo 4.</b> Resultados obtenidos de la fase experimental.....	59

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> .....	13
--------------------------	----



## RESUMEN EJECUTIVO

El consumo de proteína vegetal ha cobrado importancia dentro de la industria alimentaria, debido a la escasez global de proteína animal y la creciente demanda de alimentos más saludables. Asimismo, el crecimiento de la población pone en riesgo la seguridad alimentaria, por lo cual se están optando por nuevas alternativas basadas en proteínas vegetales como las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.).

El desarrollo de esta investigación se centró en determinar el rendimiento, cantidad e identificación de proteínas en concentrados de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.). Los concentrados se obtuvieron mediante extracción alcalina-precipitación isoelectrica a diferentes pHs de solubilización con dos niveles: pH 8.0 y pH 12.0 y pHs de precipitación con cuatro niveles: 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0. Mediante análisis estadísticos se logró identificar que el mayor rendimiento fue a pH 12.0 de solubilización y pH 2.0 de precipitación con un valor de 21.48 por ciento.

Con relación a la cuantificación de proteína se realizó mediante el método Dumas, obteniendo la mayor concentración de proteína a pH 12.0 de solubilización y pH 5.0 de precipitación con un valor de 81.87 por ciento. Para el análisis proteico se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), evidenciándose la presencia de cinco tipos de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 4 y 50 kDa.

**Palabras clave:** proteína vegetal, seguridad alimentaria, semillas de sambo, concentrados proteicos.

## ABSTRACT

The consumption of vegetable protein has gained importance within the food industry, due to the global shortage of animal protein and the growing demand for healthier foods. Also, population growth puts food security at risk, so new alternatives based on vegetable proteins such as sambo seeds (*Cucurbita ficifolia* B.) are being chosen.

This research focused on determining the yield, quantity, and identification of proteins in sambo (*Cucurbita ficifolia* B.) seed concentrates. The concentrates were obtained by alkaline extraction-isoelectric precipitation at different solubilization pHs with two levels: pH 8.0 and pH 12.0 and precipitation pHs with four levels: 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0. Statistical analysis showed that the highest yield was at pH 12.0, solubilization, and precipitation at pH 2.0, with a value of 21.48 percent.

Protein quantification was carried out using the Dumas method, obtaining the highest protein concentration at pH 12.0 solubilization and pH 5.0 precipitation with a value of 81.87 percent. For protein analysis, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used, which revealed the presence of five types of proteins with molecular weights between 4 and 50 kDa.

**Keywords:** plant protein, food safety, sambo seeds, protein concentrates.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes de la investigación

#### 1.1.1. Sambo (*Cucurbita ficifolia* B.)

El origen del sambo se remonta a Mesoamérica, cultivado probablemente desde el centro de México hasta América Central y América del Sur, así como algunas regiones de Asia (Zhang et al., 2021). La producción de sambo se realiza en zonas montañosas de clima templado, a altitudes entre 1000 y 3000 msnm, ya que este es el ambiente propicio para su desarrollo. Hoy en día, el cultivo de sambo se ha extendido alrededor de todo el mundo, adaptándose a diferentes climas y condiciones (Moreno-Quiroga, Alba-Jiménez, Aquino-Bolaños, & Chávez-Servia, 2023). En Ecuador, esta fruta se lo nombra de diferentes maneras como “zambo”, “zambu”, “tambo” y en idioma kichwa se lo conoce con el nombre de “sampu” (Álvarez, 2019).

#### Taxonomía del sambo

A continuación, se presenta la clasificación taxonómica del sambo.

#### Tabla 1.

*Clasificación taxonómica del sambo*

Clasificación	Denominación
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Ficifolia</i>

**Fuente:** (Álvarez, 2019; Lim, 2012).

## Morfología del Sambo

El sambo es una planta enredadera de fruto ovalado, que puede medir entre 25 y 50 centímetros de largo y de 15 a 25 centímetros de ancho. Presenta una cáscara rígida (epicarpio) de coloración verde claro u oscuro con franjas longitudinales blancas. En algunos casos es visible un moteado de color blanco o verde con colores blanco o crema. El mesocarpio (pulpa), se caracteriza por tener una textura granular-fibrosa de color blanco y sabor ligeramente dulce y, en función de la madurez del fruto, puede albergar semillas blancas o negras. El sambo está formado por una raíz principal de textura fibrosa, tallos vellosos que pueden medir de 5 a 25 metros de largo, hojas grandes de color verde oscuro, zarcillos y flores de pétalos grandes normalmente amarillos de 7.5 centímetros de diámetro (Moya-Hernández, Bosquez-Molina, Serrato-Díaz, Blancas-Flores, & Alarcón-Aguilar, 2018).



**Figura 1.** Sambo tierno (*Cucurbita ficifolia* B.).

**Fuente:** (Rodríguez-Ramírez, Barragán-Iglesias, Ramírez-Palma, & Méndez-Lagunas, 2023).

## Composición nutricional del sambo

El sambo posee una composición nutricional importante en la dieta de las personas presentándose dicha información en la Tabla 2.

**Tabla 2.***Composición nutricional del sambo (Cucurbita ficifolia B.) (100 g de sambo)*

<b>Nutrientes</b>	<b>Sambo tierno</b>	<b>Sambo maduro</b>	<b>Unidad</b>
<b>Humedad</b>	94.5	91.4	%
<b>Proteína</b>	0.3	0.2	%
<b>Grasa</b>	0.1	0.5	%
<b>Carbohidratos totales</b>	4.4	6.9	%
<b>Fibra cruda</b>	0.5	0.6	%
<b>Cenizas</b>	0.2	0.4	%
<b>Calcio</b>	24	21	mg
<b>Fósforo</b>	13	6	mg
<b>Hierro</b>	0.3	0.5	mg
<b>Vitamina A</b>	0.04	-	mg
<b>Vitamina B1</b>	0.02	0.01	mg
<b>Vitamina B2</b>	0.01	0.02	mg
<b>Vitamina B3</b>	0.26	0.22	mg
<b>Vitamina C</b>	18	4	mg

**Fuente:** FUNIBER (como se citó en Colobón, 2021).

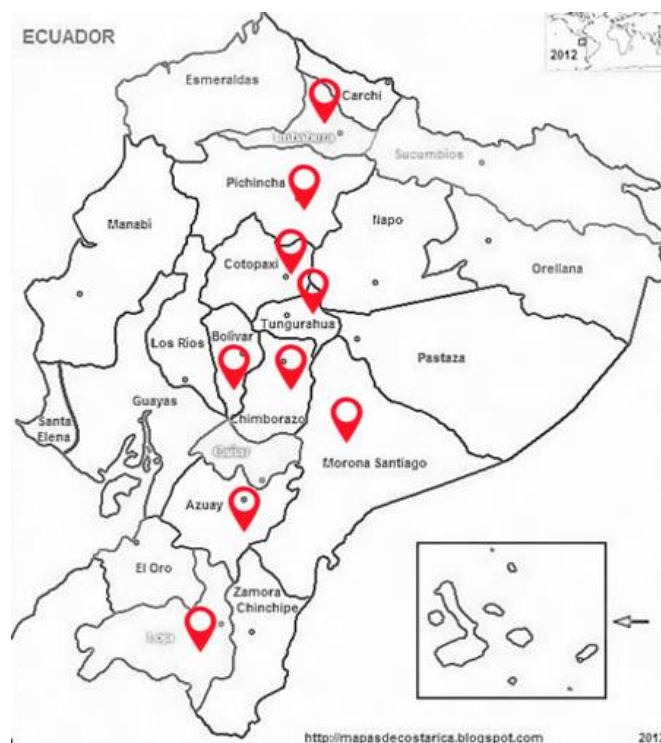
### **Beneficios del consumo de sambo**

El sambo se ha empleado como tratamiento en la curación de heridas, cataplasmas y ungüentos para reducir las hemorroides y la fiebre. Dicha planta ha sido reconocida como super alimento debido a los componentes bioactivos que presenta, tales como sustancias antiinflamatorias, cardiovasculares, hepatoprotectoras e hipoglucemiantes. De igual manera, mediante estudios se ha evaluado su citotoxicidad frente a células cancerosas,

proporcionando datos positivos, sin embargo, es necesaria una mayor investigación acerca de sus efectos y potenciales aplicaciones en el área médica (Alshammari, Balakrishnan, Alshatwi, & Al-Khalifa, 2020).

### **Producción de sambo en Ecuador**

En Ecuador el sambo se cultiva en varias provincias, concentrándose principalmente en Azuay (2731 hectáreas), Bolívar (4489 hectáreas), Chimborazo (2977 hectáreas), Cotopaxi (23198 hectáreas), Imbabura (2100 metros cuadrados), Loja (23536 hectáreas), Morona Santiago (6734 hectáreas), Pichincha (5393 hectáreas) y Tungurahua (10956 hectáreas). De las provincias anteriormente mencionadas, Cotopaxi, Loja y Tungurahua se destacan por producir la mayor cantidad de sambo (Cepeda, 2021).



**Figura 2.** Ubicación geográfica de la producción de sambo.

**Fuente:** Adaptado de (Ecuador Noticias, 2015).

## **Aplicaciones del sambo**

De las partes que forman el sambo, las más utilizadas como alimentos son los tallos jóvenes y hojas, servidos en sopas y guisos, mientras que, los frutos inmaduros se consumen cocidos. Asimismo, la pulpa del fruto maduro se emplea en la preparación de bebidas alcohólicas, dulces, refrescos y cocidos (Ntui, Uyoh, Udensi, & Enok, 2007). En nuestro país, el fruto del sambo se emplea generalmente en la elaboración de sopas como “locro de sambo”, servido conjuntamente con papas, legumbres y hortalizas, aportando un sabor y textura incomparables. De igual manera, puede ser transformado en mermeladas y coladas con alto sabor y nutrientes (Arévalo & Arias, 2008).

### **1.1.2. Semillas de sambo**

Las semillas de sambo son subproductos de la transformación de la pulpa de sambo a nivel artesanal o industrial, constituyendo el 2.9% en peso de fruta fresca y el 32% en base seca. Se caracterizan por su forma ovalada-elíptica, aplanada y coloración marrón oscuro a negro o blanco cremoso, con una longitud de 17.88 mm, 11.34 mm de ancho y 2.59 mm de grosor. Tanto el fruto como las semillas poseen ácidos grasos insaturados, fitoesteroles, oligoelementos, antioxidantes y vitaminas (carotenoides, tocoferoles) (Rodríguez-Miranda et al., 2016; Srivastava, Sahu, & Banerjee, 2021).



**Figura 3.**Semilla de sambo con corteza.

### **Obtención de las semillas de sambo**

Las semillas de sambo se obtienen por medio del corte mecánico del fruto, retirándoles la pulpa sobrante que puede encontrarse adherida cuidadosamente. Posterior a ello, las semillas se someten a secado expuestas al sol, controlando minuciosamente el punto de secado. Esto a fin de evitar que las semillas se endurezcan; y, al momento de

descortezarlas se rompan fácilmente debido a su fragilidad. Lo adecuado es que las semillas se encuentren en un estado de secado intermedio, entre húmedas y secas, para lograr un exitoso descortezado. Una vez descortezadas, las semillas se exponen nuevamente al sol para eliminar la parte restante de humedad y así después ser tostadas, almacenadas y distribuidas (La Hora, 2020).



**Figura 4.** Semilla de sambo sin corteza (fresca).



**Figura 5.** Semillas de sambo sin corteza (secas).

### Composición nutricional de las semillas de sambo

**Tabla 3.**

*Contenido nutricional de las semillas de sambo (100 g de semillas)*

Nutrientes	Semillas crudas	Semillas tostadas	Unidad
<b>Energía</b>	573.00	600.00	Kcal
<b>Proteína</b>	29.20	28.60	g
<b>Grasa total</b>	53.10	56.40	g
<b>Glúcidos</b>	6.70	7.10	g
<b>Fibra</b>	1.70	2.10	g
<b>Calcio</b>	91.00	92.00	mg
<b>Hierro</b>	15.50	11.60	mg
<b>Vitamina A</b>	5.00	5.00	mg

**Fuente:** FUNIBER (como se citó en Campoverde, 2020).



## **Beneficios de las semillas de sambo**

Las semillas de sambo podrían tener potenciales propiedades funcionales beneficiosas para la salud humana. Algunas investigaciones llevadas a cabo *in vitro*, *in vivo* y estudios preclínicos han demostrado que las semillas de sambo poseen efectos antioxidantes, los cuales protegen a las células contra los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (radicales libres) (Lestari & Meiyanto, 2018).

Es preciso señalar que, de las semillas puede extraerse aceite, el cual presenta los cuatro ácidos grasos principales (ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico). Contribuyendo a mantener en niveles bajos el colesterol LDL, como terapia a trastornos en la glándula prostática y vejiga a causa de la hiperplasia. Por su parte, el ácido linoleico ayuda en la coagulación de la sangre, inhibe la respuesta inflamatoria y mejora el sistema inmune, mientras que el ácido oleico reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares (Tran & Dang, 2023).

## **Aplicaciones de las semillas de sambo**

Los frutos de sambo en estado maduro brindan semillas de alta calidad, que son utilizadas como aperitivo o aditivo alimentario de alto valor nutritivo y textura suave en bocadillos, salados, dulces o tostados (Hussain et al., 2022). De igual modo, se emplea en la elaboración de postres, al mezclar con almíbar de azúcar para hacer pasteles conocidos con el nombre de palanquetas en México (Salehi et al., 2019). En Ecuador, las semillas de sambo en estado tierno se someten a tostado y se consumen acompañadas de chulpi, tostado y chocho. También se las incluye en ensaladas, salsas, ají e incluso puede utilizarse como un sustituto del maní, asimismo, cuando el sambo se encuentra en estado maduro se elabora dulce tanto con la pulpa como con las semillas (La Hora, 2020).

### **1.1.3. Consumo de sambo y sus derivados en Ecuador**

El uso y consumo de sambo ha ido disminuyendo con el paso del tiempo, captando el interés mayoritario de las comunidades que se dedican a su cultivo y cosecha. Esto se debe, a la falta de información disponible sobre este fruto. Además, posibles consumidores de productos derivados del sambo desconocen acerca del alto valor nutritivo que poseen

sus semillas, lo que conlleva a que se consuma principalmente el fruto y se desechen las semillas o se destinen a consumo animal (A., G., N., & M., 2020; Silva, 2017).

#### **1.1.4. Proteína**

El término “proteína” fue acuñado por primera vez por Gerardus Johannes Mulder en 1838, derivada de la palabra griega *proteos* que significa “de vital importancia”. Las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos que son los encargados de determinar su estructura y funciones biológicas. Se encuentran en diferentes partes del cuerpo humano, como en los músculos, esqueleto, células, órganos, piel y sangre. A su vez, cumplen varias funciones como proporcionar inmunidad al cuerpo en forma de inmunoglobulinas para combatir enfermedades (Manickavasagan, Lim, & Ali, 2022).

#### **1.1.5. Concentrados proteicos**

La producción de concentrados proteicos ha sido considerada como la alternativa más acertada para cubrir las necesidades nutricionales de poblaciones vulnerables (personas de la tercera edad, niños en etapa de crecimiento). Asimismo, se han utilizado en la elaboración de productos para determinados grupos de población que por razones personales pretenden llevar una alimentación rica en nutrientes (Serrano, 2020). Los concentrados proteicos se representan por su alto contenido de proteína (60-80%); obteniéndose mediante un proceso de extracción en el que se reducen o eliminan azúcares totales, fibras y otros compuestos no proteicos (carbohidratos, factores antinutricionales) dando como resultado una harina homogénea de partículas pequeñas (Cruz & Valencia, 2020).

#### **1.1.6. Métodos de extracción de proteína**

La extracción de proteínas se enfoca en someter la muestra a distintas condiciones (alcalinas y ácidas) con la finalidad de separar las proteínas por su peso molecular y carga. La muestra se expone a un medio alcalino para inducir la solubilización de proteínas eliminando materiales insolubles y conservando el material proteico soluble. La solubilidad de las proteínas depende principalmente del pH, es decir, cuando llega a pH isoelectrico (carga neta es cero) la solubilidad de la proteína es mínima (Acuña, 2017).

Al encontrarse las proteínas en pH isoeléctrico no interaccionan con las cargas del medio, sin embargo, a medida que el valor del pH se aleja de dicho punto, las proteínas adquieren tanto cargas negativas como positivas favoreciendo la solubilización. Para la recuperación de proteínas, el extracto se expone a un medio ácido provocando que las proteínas se vuelvan insolubles, precipiten y puedan ser recuperadas mediante procesos como centrifugación, filtración o secado (Adame-Arana, Weber, Zaburdaev, Prost, & Jülicher, 2020).

#### **1.1.7. Métodos de determinación de proteínas**

El método Dumas es el más utilizado para la determinación de proteínas por su facilidad de uso, rapidez y automatización que garantiza la seguridad del analista, evitando el uso de productos químicos potencialmente nocivos. De igual manera, es considerado un método absoluto para la determinación del contenido total de nitrógeno en una matriz. El nitrógeno se convierte cuantitativamente en N<sub>2</sub> y mediante un detector de conductividad térmica se cuantifica en porcentaje o en mg de nitrógeno, a partir del cual utilizando factores de conversión se determina la cantidad de proteína (Müller, 2017).

#### **1.1.8. Métodos de análisis de proteína**

La técnica de electroforesis, específicamente SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico), desempeña un papel fundamental en la separación y análisis de proteínas. Esto se debe a su capacidad para separar mezclas complejas de proteína y permitir la movilidad de las moléculas en un campo eléctrico; y, su habilidad para separar proteínas según su peso molecular y carga (Isani et al., 2023).

La separación de proteínas, se logra gracias a la inclusión del compuesto dodecilsulfato sódico, tratamiento térmico y agentes reductores, como el 2-mercaptoetanol (2-ME) y ditiotreitól (DTT). Dichos parámetros pueden desnaturalizar la proteína y romper los enlaces disulfuro intermoleculares presentes en las proteínas (Shen, 2019). Para fijar una muestra en el gel (soporte sólido), se pueden utilizar sustancias como glicerina o sacarosa. Al concluir la electroforesis, las moléculas se hacen visibles mediante tinción con el colorante azul de Coomassie (CBB), lo que facilita su posterior revelado (Rodríguez, 2022).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

- Identificar proteínas en concentrados de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.).

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Extraer concentrados proteicos de las semillas de sambo a diferentes pHs de solubilización y precipitación.
- Establecer el rendimiento y cantidad de proteína en los concentrados proteicos.
- Analizar las proteínas en los concentrados bajo condiciones reductoras.

## 1.3 Hipótesis

**Hipótesis nula (Ho):** El pH de solubilización y precipitación no incide en el porcentaje de proteína de los concentrados proteicos de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.).

**Hipótesis alternativa (Ha):** El pH de solubilización y precipitación si incide en el porcentaje de proteína de los concentrados proteicos de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.)

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1 Materiales**

##### **2.1.1 Materia prima**

- Semillas de sambo

##### **2.1.2 Materiales de laboratorio**

- Espátula
- Micro espátula
- Pocillo
- Frascos de liofilización
- Frascos de vidrio con tapa
- Tubos falcon
- Barra de agitación magnética
- Puntas micropipeta
- Vasos de precipitación
- Pinza
- Balón de aforo
- Embudo
- Cernidor metálico
- Mortero
- Piseta
- Papel filtro
- Papel film

### **2.1.3 Equipos**

- Ultracongelador
- Equipo Liofilizador
- Molino eléctrico
- Plancha eléctrica de calentamiento
- Centrífuga Eppendorf
- Balanza analítica
- Plancha magnética
- Equipo de electroforesis
- Medidor de pH
- Microondas
- Agitador
- Congelador
- Micropipeta
- VELP SCIENTIFICA Dumas
- Micro incubadora

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Obtención de la harina de semillas de sambo**

Las semillas de sambo se recolectaron en la parroquia Quisapincha ubicada en el cantón Ambato provincia de Tungurahua. Para la determinación se tomó como referencia la metodología utilizada por Palma & Quilambaqui (2023) la cual consta de cuatro pasos:

- Ultracongelación: Una vez obtenidas las semillas, se sometieron a selección eliminando cualquier impureza presente (polvo, cáscaras). Posteriormente, se guardaron aproximadamente 1 kg de semillas lavadas en fundas ziploc en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- Liofilización: Las semillas ultracongeladas se liofilizaron en un liofilizador marca BenchTop Pro, el equipo trabajó a una presión de 25 Pa y a temperatura de -50°C por 1 semana.
- Trituración y tamizado: Las semillas liofilizadas se trituraron con un molino eléctrico y se tamizaron hasta obtener la harina de semillas de sambo.
- Congelación: La harina de semillas se almacenó en fundas ziploc cada una con 150g y en congelación a -20 °C conservando sus propiedades para los análisis posteriores.

### 2.2.2 Obtención de los concentrados proteicos

El concentrado proteico se obtuvo a partir de la metodología utilizada por Palma & Quilambaqui (2023) con modificaciones. La harina de semillas de sambo se suspendió en agua a una concentración de 25 g de harina por cada 250 mL de agua destilada, a continuación, se ajustó a pHs de solubilidad 8.0 y 12.0 con NaOH 2N por un tiempo estimado de 35 a 40 minutos con agitación intensa y un control minucioso de pH.

Posteriormente se centrifugó la muestra en un equipo marca Eppendorf por 35 minutos a 4400 rpm. El sobrenadante obtenido, se llevó a pHs de precipitación 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 con una solución HCl 2N por un tiempo estimado de 35 a 40 minutos con agitación a fin de precipitar las proteínas, luego se llevó a refrigeración a 4°C y después se centrifugó por 35 minutos a 4400 rpm.

Finalmente, la muestra se resuspendió con una mínima cantidad de agua destilada hasta alcanzar un pH 7 con NaOH 0.1N. Luego se ultracongeló a -80°C por 72 horas y liofilizó a -50°C. El liofilizado que se obtuvo se almacenó en congelación hasta su uso.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso final del concentrado (g)}}{\text{peso inicial de la harina (g)}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1.}$$

### 2.2.3 Diseño experimental

Para el diseño experimental se empleó la metodología utilizada por Romero (2023) con modificaciones. Se trabajó con dos factores, aplicando un diseño A\*B en el cual se dispuso

para el factor A, el pH de solubilización con dos niveles: pH 8.0 y pH 12.0; mientras que, para el factor B, se dispuso el pH de precipitación con cuatro niveles: pH 2.0, pH 3.0, pH 4.0 y pH 5.0. Se analizaron ocho tratamientos y con ensayos por duplicado.

**Tabla 4.**

*Diseño factorial A\*B*

<b>Factor A:</b> pH de solubilización	<b>Factor B:</b> pH de precipitación
a <sub>0</sub> : 8.0	b <sub>0</sub> : 2.0
a <sub>1</sub> : 12.0	b <sub>1</sub> : 3.0
	b <sub>2</sub> : 4.0
	b <sub>3</sub> : 5.0

## 2.2.4 Determinación de proteína por el método Dumas

La determinación de proteína por el método Dumas se obtuvo a partir de la metodología utilizada por Romero (2023). En la cual, antes de comenzar se verificaron los parámetros de configuración del equipo: temperatura del reactor de combustión a 1030 °C, temperatura del reactor de reducción a 650 °C, caudal MFC1 He a 190 mL/min, caudal MFC2 He a 220 mL/min. Adicionalmente, se acondicionó el sistema probando 2 EDTA estándar y de 2 a 3 láminas de estaño vacías y se verificó la curva de calibración con una o más pruebas como estándar probando el mismo estándar utilizado para la creación de la curva.

Las muestras obtenidas de los concentrados proteicos se homogeneizaron con ayuda de una espátula y después fueron colocadas aproximadamente entre 30 a 50 mg de muestra en papel de aluminio cerradas y comprimidas en forma de cápsula.

Se utilizó el equipo de cuantificación de proteína marca VELP SCIENTIFICA, el cual mediante un primer reactor de combustión quemó las muestras sólidas convirtiéndolas en gas a una temperatura de 1030 °C. Dicha reacción generó dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), oxígeno y agua indeseada ya que interfiere en el análisis, por



ello, se empleó trampas de agua y un colector de cenizas que eliminaron productos no deseados.

Posteriormente, una corriente de gases impulsada por He, se dirigió a un segundo reactor de reducción lleno de cobre a una temperatura de 650°C el cual redujo el NO<sub>2</sub> a N elemental, importante en la cuantificación de proteína. A continuación, se posicionó una trampa de agua para eliminar residuos de agua y un colector que captó CO<sub>2</sub> producido en las reacciones. Una vez que la muestra pasó por ambos reactores, pasa a un último detector, el cual detectó la señal de N que fue incrementándose al llegar al detector en conjunto con el gas He. Finalmente se cuantificó el N contenido en la muestra por diferencias entre el flujo inicial y final de He. El porcentaje de proteína lo determinó el equipo mediante el factor de conversión 6.25.

### **2.2.5 Análisis de proteínas en los concentrados bajo condiciones reductoras**

La determinación se realizó mediante electroforesis en el Laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar-UEB, tomando como referencia la metodología utilizada por Romero (2023) con modificaciones, estableciendo que:

La proteína de los concentrados se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), con adición de agentes reductores (2-mercaptoetanol), usando el equipo Bio-Rad, modelo Mini PROTEAN.

Para la preparación de la muestra se utilizó una solución con 10 mg de concentrado proteico y 1 mL de agua destilada que se mezcló y homogeneizó en tubos eppendorf. Posteriormente, se mezcló 200 uL de solución proteica y 200 uL de buffer. Dicho buffer se constituyó por 4.8 mL de agua destilada, 1.2 mL de Tris-HCL 0.5 M, pH 6.8, 1 mL de glicerol puro, 2 mL de SDS al 10%, 0.6 mL de 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol. A continuación, la mezcla se sometió a calentamiento en un micro incubador a 90°C, por 5 minutos a 400 rpm. Este proceso se realizó para cada concentrado proteico a diferentes pHs de precipitación. se

La solución buffer running estuvo conformada por 3 g de Tris-HCL, 15 g de glicina, 1 g de SDS, la solución para tñido por 0.5 g de azul Coomassie, 90 mL de ácido acético, 450

mL de agua destilada y 450 mL de metanol, la solución para desteñido estuvo constituida por 90 mL de ácido acético, 450 mL de agua destilada y 450 mL de metanol.

Para la preparación de geles, se utilizaron: gel separador al 10% conformado por 2.1 mL de agua destilada, 1.25 mL de Tris-HCl 1.5 M con pH 8.8, 1.6 mL de acrilamida: Bis acrilamida 30:0.8, 50 uL de SDS al 10%. La mezcla se realizó evitando la formación de burbujas para después añadir 40 uL de Persulfato de amonio (APS) al 10% y 5 uL de Tetrametiletilendiamina (TEMED) para dar inicio al proceso de polimerización el cual duró alrededor de 20 minutos. También se utilizó gel concentrador al 4% compuesto por: 1.5 mL de agua destilada, 0.625 mL de Tris-HCl 0.5 M con pH 6.8, 0.325 mL de acrilamida: Bis acrilamida 30:0.8, 1.6 uL de SDS al 10%. La mezcla se realizó evitando la formación de burbujas para después añadir 20 uL de Persulfato de amonio (APS) al 10% y 4 uL de Tetrametiletilendiamina (TEMED) para dar inicio al proceso de polimerización el cual duró alrededor de 20 minutos.

Cuando se obtuvo el gel, se cargaron los pocillos del equipo con 15 uL de cada muestra proteica y 10 uL de estándar de proteínas. Se añadió el buffer running dentro del equipo, entre las placas de vidrio y fuera de éstos. La corrida del gel se realizó por un tiempo de al menos 45 minutos a 200 V constante. La electroforesis terminó cuando la línea azul de bromofenol haya llegado a la parte inferior del gel. Se sacaron y separaron los vidrios del gel y se procedió a depositar en una cubeta con la solución de tinción correspondiente, luego se calentó en un microondas por 15 segundos y agitó durante 15 minutos. Finalmente se destiñó el gel en un tiempo de 15 minutos y se obtuvieron los resultados.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Extracción y rendimiento de concentrados proteicos de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.).

Los concentrados proteicos de las semillas de sambo se obtuvieron a partir de su harina empleando un proceso de extracción alcalina - precipitación isoelectrica. Basándose en la solubilización a pHs básicos de 8.0 y 12.0, los cuales se combinaron con pHs ácidos de 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 para obtener los concentrados.

Kusumah, Andoyo, & Rialita (2020) mencionan que una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH) producirá una mayor cantidad de proteínas debido a que aumenta la solubilidad de las mismas, facilitando y mejorando el rendimiento de extracción. Sin embargo, según Momen, Alavi, & Aider (2021) el uso de bases fuertes pueden desnaturar las proteínas al romper las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de las proteínas, así como la degradación de las mismas al romper los enlaces peptídicos que mantienen unidas las cadenas de aminoácidos e incluso reducir la solubilidad de las proteínas al provocar su agregación.

Por otro lado, desde el punto de vista de Nolsøe & Undeland (2009) un pH ácido permite que los aminoácidos presentes en las proteínas se carguen positiva o negativamente, minimizando su interacción e incrementando su solubilidad. No obstante, los ácidos fuertes como el ácido clorhídrico (HCl) pueden alterar la estructura tridimensional al disminuir el pH del medio interrumpiendo las interacciones no covalentes que mantienen la estructura tridimensional, como los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de las proteínas al desnaturarlas, provocando la pérdida de su actividad enzimática.

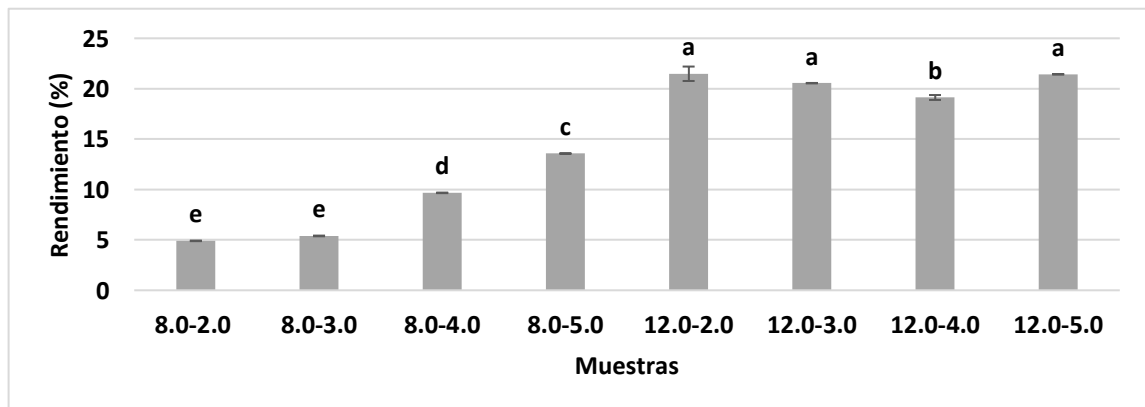
En cuanto al rendimiento expresado en porcentaje para cada muestra se estableció por duplicado, como se puede observar en la Tabla 5. Dicho rendimiento se determinó realizando una comparación entre el peso inicial de la harina antes de la extracción y el peso final del concentrado después del proceso de liofilización. Los resultados muestran el promedio de rendimiento para cada muestra, desviación estándar y coeficiente de variación, evaluados mediante ANOVA multifactorial y la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 5.**

*Rendimiento de concentrados a diferentes pHs por cada 25 g de muestra*

Valores de alcalinidad y acidez (pH)		Rendimiento de concentrado
pH de solubilización	pH de precipitación	proteico (%)
8.0	2.0	4.9043 <sup>e</sup> ± 0.03
	3.0	5.3927 <sup>e</sup> ± 0.04
	4.0	9.6663 <sup>d</sup> ± 0.03
	5.0	13.5677 <sup>c</sup> ± 0.003
12.0	2.0	21.4833 <sup>a</sup> ± 0.72
	3.0	20.5495 <sup>a</sup> ± 0.02
	4.0	19.1303 <sup>b</sup> ± 0.24
	5.0	21.4291 <sup>a</sup> ± 0.01

El ± representa la desviación estándar. Superíndices comunes denotados por letras minúsculas, señalan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ , prueba de Tukey).



**Figura 4.** Medición del rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo expresado en porcentaje a diferentes pHs de solubilización (8.0, 12.0) y pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0 y 5.0). Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre tratamientos.

Los rendimientos más altos de la extracción de concentrados se obtuvieron a pH de solubilización de 12.0, como se muestra en la Tabla 5, identificando de tal forma que a pHs más básicos aumenta la solubilidad de las proteínas de semillas de sambo (ver Figura 6). De acuerdo con Gao et al. (2020) a un pH alcalino más alto generalmente mejora la eficiencia de la extracción debido a la neutralización de los grupos amina laterales de los aminoácidos básicos incrementando la carga negativa total y a su vez la solubilidad de la proteína.

En referencia a los pHs de precipitación, los mejores porcentajes de rendimiento se obtuvieron a pHs de 2.0, 3.0 y 5.0 trabajando con un pH de solubilización 12.0, la combinación 12.0 - 2.0 fue la que mayor rendimiento demostró con un valor de 21.4833%, por el contrario, la combinación 8.0 - 2.0 arrojó un menor rendimiento con un valor de 4.9043%, como se observa en la Tabla 5 y Figura 6.

El punto isoelectrico de una proteína, según Bučko et al. (2018) depende de la composición de aminoácidos, pH en el cual la proteína tiene la carga neta igual a cero, dado que, los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos están en equilibrio. Las proteínas de las semillas de calabaza tienen un pH isoelectrico cercado a 5, lo que dificulta la extracción de concentrados debido a su baja solubilidad. Sin embargo, al combinarse con un pH alcalino puede alterar la carga neta de las proteínas aumentando su solubilidad, lo que facilita la extracción de concentrados proteicos.

Atuonwu & Akobundu (2010) en su investigación con la semilla de *Cucurbita pepo*, perteneciente a la familia de las cucurbitáceas, mostraron una alta solubilidad a pH 10 y 4.5 para la extracción y precipitación respectivamente. Asimismo, mencionan que, la solubilidad de la proteína aumenta con la moderada concentración de sal separando las proteínas de otros componentes presentes, facilitando su precipitación. No obstante, a altas concentraciones la estructura y actividad biológica de las proteínas podrían ser afectadas.

En comparación con otras matrices vegetales, Nissen et al. (2021) describen que el concentrado proteico de alfalfa presentó una solubilidad de proteína del 46 al 48% a pH alcalinos entre 7 y 9, sin embargo, a pHs entre 10, 11 y 12 la solubilidad aumentó de 53

al 90%. En adición, al cambiar de pH ácido a pH alcalino determinaron un aumento en la solubilidad de las proteínas, a razón de la hidrólisis parcial causada por el ambiente alcalino que puede llevar a la formación de aminoácidos racémicos y entrecruzamiento de las proteínas. Aquino (2015) en su investigación para la extracción de proteínas de la torta de sachá inchi, describió que a pH de solubilidad 9.5 y pH de precipitación 4.5 con adición de una concentración de NaCl de 1.65 M y 54°C de temperatura se obtuvo un rendimiento de 30.23% de proteína. De igual manera, Stone, Karalash, Tyler, Warkentin, & Nickerson (2015) por extracción alcalina - precipitación isoeléctrica ajustado a pH 9.5 y a pH 4.5 presentaron un rendimiento de extracción entre 15.3 y 16.0%. Dichas investigaciones tuvieron pHs similares a los pHs empleados en la identificación.

Como se puede observar en el análisis de varianza presentado en la Tabla 10, los p-valores para cada factor son inferiores a 0.05 (nivel de significancia), por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, lo que indica diferencias significativas entre el factor A, factor B y su interacción (AB). Lo cual implica que tanto el pH de solubilización como el pH de precipitación tienen un efecto significativo en el porcentaje de rendimiento del concentrado proteico.

De igual forma, en la Tabla 13 se presenta la prueba de múltiples rangos Tukey para el porcentaje de rendimiento por muestra. Los resultados revelaron que las muestras 12.0-2.0, 12.0-3.0 y 12-5.0 arrojaron los valores más altos de rendimiento, sin diferencias significativas entre ellos. En contraste, las muestras 8.0-2.0 y 8.0-3.0 mostraron los valores más bajos, sin diferencias significativas. Como se observa en las Tablas 11 y 12 las pruebas de rangos múltiples para el porcentaje de rendimiento del factor A el nivel con valor 12.0 y del factor B el nivel con el valor 5.0 fueron los más significativo.

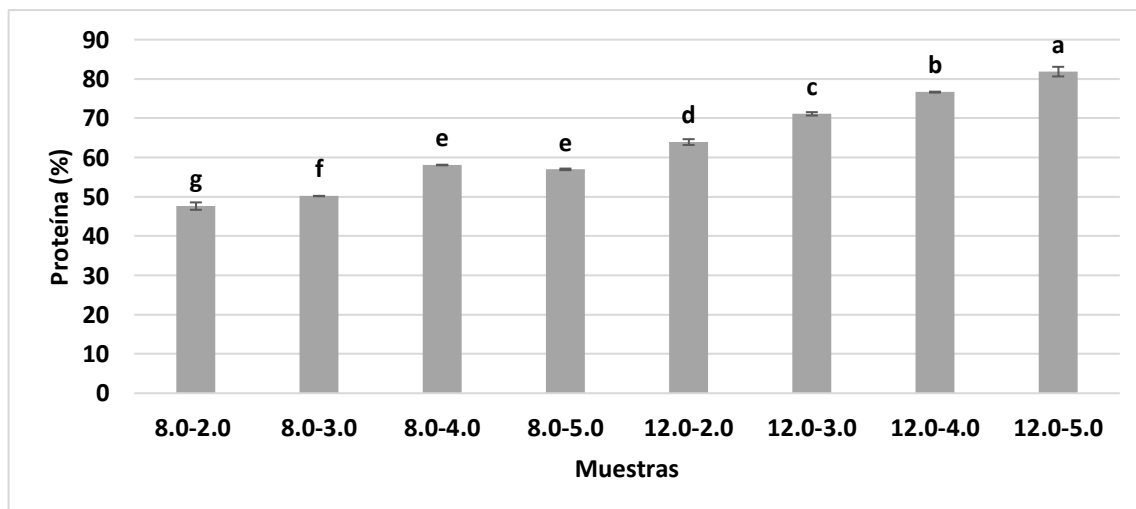
### 3.1.2 Cantidad de proteína en los concentrados proteicos de semillas de sambo

**Tabla 6.**

*Porcentaje de proteína en los concentrados proteicos de semillas por el método Dumas*

Valores de alcalinidad y acidez (pH)		Proteína (%)
pH de solubilización	pH de precipitación	
8.0	2.0	47.6375 <sup>g</sup> ± 0.95
	3.0	50.1930 <sup>f</sup> ± 0.05
	4.0	58.0965 <sup>e</sup> ± 0.07
	5.0	56.9940 <sup>e</sup> ± 0.20
12.0	2.0	63.9390 <sup>d</sup> ± 0.74
	3.0	71.1195 <sup>c</sup> ± 0.43
	4.0	76.6495 <sup>b</sup> ± 0.12
	5.0	81.8665 <sup>a</sup> ± 1.22

El ± representa la desviación estándar. Superíndices comunes denotados por letras minúsculas, señalan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ , prueba de Tukey).



**Figura 5.** Medición de cantidad de proteína en los concentrados proteicos de las semillas de sambo expresado en porcentaje a diferentes pHs de solubilización (8.0, 12.0) y pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0 y 5.0). Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre tratamientos.

La cuantificación de proteína expresada en porcentaje se estableció por el método de Dumas avalado por la AOAC 992.23, cada muestra se estableció por duplicado, como se puede observar en la Tabla 14. Por otra parte, en la Tabla 15 se pueden visualizar los

resultados del promedio de cantidad de proteína para cada muestra, desviación estándar y coeficiente de variación, evaluados mediante ANOVA multifactorial y la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Das, Devi, & Badwaik (2022) hacen mención que para las semillas de sambo el factor de conversión tiene un valor de 6.25, dicho factor se basa en la suposición de que la proteína promedio contiene aproximadamente un porcentaje del 16% de nitrógeno, por lo cual, se lo utiliza como una constante, para convertir el contenido de nitrógeno arrojado por el equipo automatizado en cantidad de proteína (%) presente en las muestras de concentrados de semillas de sambo.

Los valores presentados en la Tabla 6 reportan que la muestra con mayor cantidad de proteína fue determinada a pH de solubilidad 12.0 y pH de precipitación 5.0 con un porcentaje de proteína del 81.8668%. Cabe señalar que las muestras 12.0-3.0 y 12.0-4.0 tienen un valor aproximado a este, pero con diferencias estadísticamente significativas. Pese a ello, se sugiere que dichas muestras poseen cantidades altas de proteína. Chang (2010) describe que el porcentaje total de proteína va en función de la cantidad de nitrógeno que se encuentra en el alimento, ya que el nitrógeno es el elemento más distintivo de las proteínas. El contenido de nitrógeno en las proteínas alimenticias puede variar debido a la composición específica de aminoácidos de las proteínas.

Ahora bien, las muestras 8.0-2.0 con 47.6375% y 8.0-3.0 con 50.1930% presentaron un porcentaje de proteína relativamente bajo (ver Figura 7). Cabe señalar que los valores de rendimiento obtenidos previa a la cuantificación de proteína no denota necesariamente los porcentajes de proteína obtenidos. En este caso no fue proporcional, ya que el tratamiento con mayor rendimiento fue 12.0-2.0, pero no tuvo el mayor contenido de proteína. Pese a ello, el tratamiento 8.0-2.0 demostró menor porcentaje de rendimiento y contenido proteico. En conformidad con Chang & Zhang (2017), el porcentaje de proteína de las semillas de sambo puede variar significativamente dependiendo de varios factores como la variedad de semilla, condiciones de crecimiento, contenido de nitrógeno en el suelo y el clima.



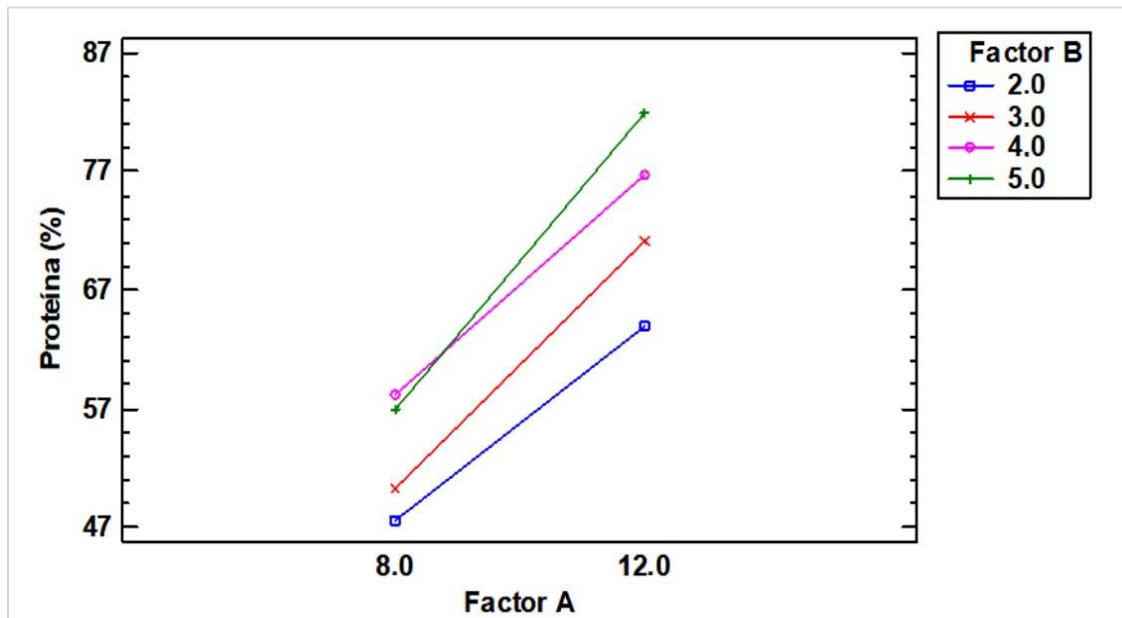
Coşkun & Gülseren (2020) en su estudio acerca de la extracción y funcionalidad de concentrados obtuvieron diferentes cantidades de proteína mediante extracción alcalina-isoeléctrica. Las muestras de semillas de calabaza de la variedad *Cucurbita* sp. a pH 9.5 y a pH 4.5, se encontró un contenido de proteína del 82.99% similar a la cantidad de proteína obtenida para la variedad *Cucurbita ficifolia* B., como se observa en la Tabla 15.

Por otro lado, Giami & Isichei (1999) demostraron en su investigación el contenido de proteína en los concentrados de semillas de calabaza estriada, perteneciente a familia de las cucurbitáceas. El método utilizado fue Kjeldahl con un factor de conversión de 5.30, con el cual encontraron que los concentrados crudos poseían el 61.5% de proteína, mientras que, los concentrados fermentados y germinados presentaron un 69.4% y 70.8% de proteína, respectivamente. Dichos valores se encuentran dentro de los porcentajes analizados en el presente estudio.

En comparación con otras matrices vegetales Chakraborty, Mallik, Sarang, & Lingam (2019) describieron otras fuentes alternativas de proteínas como el concentrado proteico de soja, del cual obtuvieron el 65% de proteína cruda. Contrastando con Vinayashree & Vasu (2021) en su investigación determinaron el 92.59% de proteína en aislados de semillas de calabaza, del mismo modo, los aislados de soja presentaron un contenido de proteína del 90%, siendo valores superiores a los obtenidos en la presente investigación. No obstante, el valor del aislado de semillas de calabaza es mayor al obtenido de la soja medido por el método de Kjeldahl. Esto ocurre debido a que los aislados proteicos son considerados fuentes concentradas de proteína al eliminar casi por completo componentes no proteicos de la matriz alimenticia.

El análisis de varianza presentado en la Tabla 16 muestra p-valores inferiores a 0.05 (nivel de significancia) para cada factor, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula. Dichos resultados señalan diferencias significativas entre el factor A, B y su interacción (AB). Esto implica que al variar los valores de pH de solubilidad y precipitación se verá afectada la variable de respuesta. Además, la interacción entre ambos factores indica que el incremento en un nivel influirá en el aumento del otro nivel.

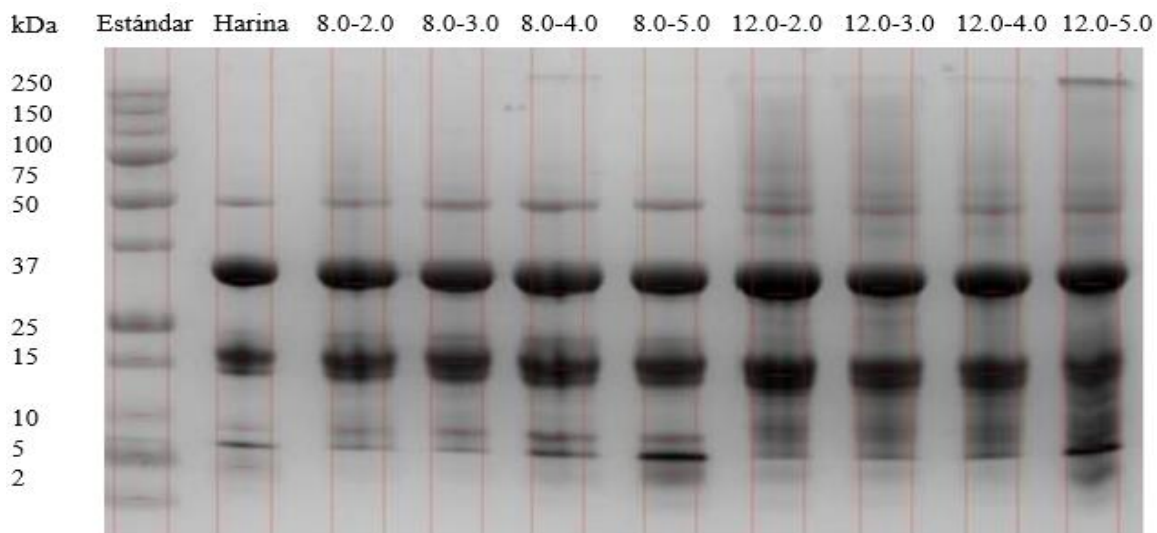
De igual manera, en la Tabla 19 se presenta la prueba de rangos múltiples Tukey, en el cual los resultados revelaron que las muestras 12.0-2.0, 12.0-3.0, 12.0-4.0 y 12.0-5.0 arrojaron los valores más altos de porcentaje de proteína, con diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, las muestras 8.0-2.0 y 8.0-3.0 mostraron los valores más bajos de proteína, con diferencias significativas. Como se observa en las Tablas 17 y 18 las pruebas de rangos múltiples para el porcentaje de proteína del factor A fue el nivel 12.0 y para el factor B fue el nivel 5.0 al igual que en el porcentaje de rendimiento.



**Figura 6.** Gráfico de interacciones del factor A que representa los pHs de solubilización (8.0, 12.0) y el factor B que representa los pHs de precipitación (2.0, 3.0, 4.0, 5.0) en función de sus medias del porcentaje de proteína extraída.

La Figura 8, representa las interacciones entre los factores A y B, observándose claramente los resultados obtenidos. Se identificaron las interacciones 8.0-2.0, 8.0-3.0, 8.0-5.0 y 8.0-4.0 como aquellas que generaron medias más bajas (ver Tabla 19), en base al porcentaje de proteína extraída. De igual manera, se analizaron las interacciones 12.0-5.0, 12.0-4.0, 12.0-3.0 y 12.0-2.0, como aquellas que generaron medias superiores en comparación con las interacciones mencionadas. Es necesario mencionar que, para extraer la mayor cantidad de proteína de la harina de semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.) se deben someterse a un pH de solubilización 12.0 y a un pH 5.0 de precipitación.

### 3.1.3 Análisis de proteína en los concentrados proteicos de semillas de sambo



**Figura 7.** Electroforesis SDS-PAGE de harina y concentrados proteicos bajo condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) de semillas de sambo. En el pocillo 1 se colocó el estándar, en el pocillo 2 se colocó la harina, mientras que en los pocillos 3,4,5,6,7,8, 9 y 10 se colocaron las muestras 8.0-2.0, 8.0-3.0, 8.0-4.0, 8.0-5.0, 12.0-2.0, 12.0-3.0, 12.0-4.0 y 12.0-5.0 respectivamente. Gel visualizado en el fotodocumentaor y software Vision Works.

**Fuente:** Laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar.

**Tabla 7.**

*Análisis de proteína por el método de electroforesis SDS-PAGE de los concentrados proteicos de las semillas de sambo, bajo condiciones reductoras*

Banda	Estándar (kDa)	Harina	8.0-2.0	8.0-3.0	8.0-4.0	8.0-5.0	12.0-2.0	12.0-3.0	12.0-4.0	12.0-5.0
1	250									
2	150									
3	100									
4	75									
5	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
6	37	30	30	30	30	30	30	30	30	30
7	25									
8	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

<b>9</b>	10	8	8	8	8	8	
<b>10</b>	5	4				4	5
<b>11</b>	2						

**Fuente:** Laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar.

El análisis de proteínas en los concentrados de semillas de sambo se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. Esto se realizó con la finalidad de obtener la separación de proteínas en función de su peso molecular, como se detalla en la Tabla 7. Todos los tratamientos, incluida la harina fueron sometidos a dicho análisis, utilizando un estándar de proteínas sintéticas de pesos moleculares conocidos entre 2 y 250 kDa.

De acuerdo con la Figura 9, se reportan bandas con pesos moleculares desde 4 hasta 50 kDa, sugiriendo la presencia de alrededor de 5 tipos de proteínas. González-Pérez & Arellano (2009) mencionan que las principales proteínas de almacenamiento de las semillas oleaginosas son las albúminas, caracterizadas por un bajo peso molecular (coeficiente de sedimentación 2S) y las globulinas (coeficiente de sedimentación de 7S a 11S), caracterizadas por un alto peso molecular. Corroborando lo anteriormente mencionado, Rezig et al. (2013) describen en su investigación con la variedad *Cucurbita maxima*, que las proteínas extraídas de las semillas de sambo incluyen albúminas y globulinas con subunidades de diferentes pesos moleculares.

Coşkun & Gülseren (2020) en su análisis determinaron para los concentrados proteicos de semillas de calabaza (*Cucurbita* sp.) que las bandas principales se situaron entre 25-37 kDa, 20-25 kDa, alrededor de 10 kDa y algunas bandas entre 50-75 kDa, así como la presencia de proteínas de 4.8 kDa, 7.8 kDa y 12.5 kDa. En comparación con otras matrices vegetales como el castaño chino, según Yang et al. (2018) las principales proteínas se encontraron en el intervalo de 5-20 kDa y 27-53 kDa pero, las albúminas de tres proteínas de la castaña estaban formadas por subunidades de pesos moleculares entre 5-32 kDa. Esto les hizo suponer que el menor peso molecular puede ser utilizado para mejorar la hidrosolubilidad y digestibilidad de la proteína. Dichos trabajos mostraron pesos moleculares similares a los obtenidos en la presente investigación.

Según Vilcacundo, Martínez-Villaluenga, & Hernández-Ledesma (2017), las proteínas tipo 11S muestran un peso molecular entre 30 y 40 kDa para subunidades ácidas y 20-25 kDa para subunidades básicas unidas por enlaces disulfuro a la proteína nativa. Por otro lado, las proteínas tipo 7S presentan un peso molecular comprendido entre 42-58 kDa, mientras que, las proteínas tipo 2S podría identificarse al final del gel. Considerando lo citado anteriormente, la Tabla 7 y la Figura 9 sugieren que los pesos moleculares en las bandas 9 y 10 podrían corresponder a la proteína de tipo 2S, mientras que el peso molecular ubicado en la banda 8 podría ser parte de las proteínas de tipo 11S (subunidades básicas) al acercarse a los valores presentados. Además, los pesos moleculares correspondientes a la banda 6 podrían asociarse a la proteína tipo 11S (subunidades ácidas), por el contrario, el peso molecular ubicado en la banda 5 podría corresponder a las proteínas de tipo 7S.

### **3.2 Verificación de hipótesis**

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para el porcentaje de rendimiento, así como para el porcentaje de proteína determinó que para un nivel de confianza del 95% se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, existen diferencias significativas entre los tratamientos. Es decir, el pH de solubilización y precipitación sí incide en el porcentaje de proteína de los concentrados proteicos de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.).

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Los concentrados proteicos fueron obtenidos de la harina de semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia* B.) a distintos pHs de solubilización y precipitación. Identificándose que a valores de pH más elevados (básicos) las proteínas presentes en las semillas mostraron una mayor solubilidad.
- El mayor rendimiento de los concentrados se obtuvo a pH de solubilización 12.0 y pH de precipitación 2.0 con el 21.48%, mientras que, la mayor cantidad de proteína se observó a pH 12.0 de solubilización y pH 5.0 de precipitación, con un valor de 81.87% y un rendimiento del 21.43%, determinándose como el mejor tratamiento la combinación 12.0-5.0.
- El análisis de proteínas en los concentrados mediante electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (utilizando 2-mercaptoetanol) reveló la presencia de cinco tipos de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 4 y 50 kDa.

## 4.2 Recomendaciones

- Utilizar diferentes pH de solubilización y precipitación a los utilizados en la investigación para la respectiva verificación del rendimiento de concentrado y cantidad de proteína.
- Analizar las proteínas de los concentrados mediante otras técnicas de identificación como cromatografía.
- Identificar el perfil de aminoácidos en las proteínas obtenidas de las semillas de sambo para precisar su calidad proteica.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias bibliográficas

- A., K., G., M., N., D., & M., M. (2020). Financial evaluation and its impact on decision-making within the company that produces and markets sambo derivatives (Cucurbita ficifolia) Taoqui Cia Ltda. *Journal of critical reviews*, 7(18). Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Darwin-Nunez/publication/351492056\\_JOURNAL\\_OF\\_CRITICAL\\_REVIEWS\\_Financial\\_evaluation\\_and\\_its\\_impact\\_on\\_decision-making\\_within\\_the\\_company\\_that\\_produces\\_and\\_markets\\_sambo\\_derivatives\\_Cucurbita\\_ficifolia\\_Taoqui\\_Cia\\_Ltda/links/609a8a65299bf1ad8d913ad0/JOURNAL-OF-CRITICAL-REVIEWS-Financial-evaluation-and-its-impact-on-decision-making-within-the-company-that-produces-and-markets-sambo-derivatives-Cucurbita-ficifolia-Taoqui-Cia-Ltda.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Darwin-Nunez/publication/351492056_JOURNAL_OF_CRITICAL_REVIEWS_Financial_evaluation_and_its_impact_on_decision-making_within_the_company_that_produces_and_markets_sambo_derivatives_Cucurbita_ficifolia_Taoqui_Cia_Ltda/links/609a8a65299bf1ad8d913ad0/JOURNAL-OF-CRITICAL-REVIEWS-Financial-evaluation-and-its-impact-on-decision-making-within-the-company-that-produces-and-markets-sambo-derivatives-Cucurbita-ficifolia-Taoqui-Cia-Ltda.pdf)
- Acuña, A. (2017). *Efecto de ultrasonidos en el proceso de extracción de proteínas de co-productos animales y escaldado del proceso* (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo. Recuperado de [https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/43612/TFM\\_AntiaAcu%F1aGonzalez.pdf;jsessionid=96101F18875A11B04BA7A6598C50F8AA?sequence=6](https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/43612/TFM_AntiaAcu%F1aGonzalez.pdf;jsessionid=96101F18875A11B04BA7A6598C50F8AA?sequence=6)
- Adame-Arana, O., Weber, C. A., Ziburdaev, V., Prost, J., & Jülicher, F. (2020). Liquid Phase Separation Controlled by pH. *Biophysical Journal*, 119(8), 1590-1605. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.07.044>
- Alshammari, G. M., Balakrishnan, A., Alshatwi, A. A., & Al-Khalifa, A. (2020). Cucurbita ficifolia Fruit Extract Induces Tp53/Caspase-Mediated Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2020, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/3712536>
- Álvarez, D. (2019). *Análisis del sambo (C. ficifolia) y creación de propuestas gastronómicas de autor* (Tesis de pregrado). Universidad Internacional del



- Ecuador. Recuperado de <https://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/3862/1/T-UIDE-2225.pdf>
- Aquino, E. (2015). *Optimización del proceso de extracción de las proteínas de la torta de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.)* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperado de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/1926/Q02-A65%20-T.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Arévalo, J., & Arias, G. (2008). *Caracterización físico-química del zambo (Cucurbita ficifolia B.) y elaboración de dos productos a partir de la pulpa* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional. Recuperado de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1653/1/CD-1869.pdf>
- Atuonwu, A. C., & Akobundu, E. N. T. (2010). Functional and pasting properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed products. *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 2. Recuperado de <https://www.cenresinjournal.com/wp-content/uploads/2020/03/Page-36-49531.pdf>
- Bučko, S., Katona, J., Petrović, L., Milinković, J., Spasojević, L., Mucić, N., & Miller, R. (2018). The Influence of Enzymatic Hydrolysis on Adsorption and Interfacial Dilatational Properties of Pumpkin (*Cucurbita pepo*) Seed Protein Isolate. *Food Biophysics*, 13(3), 217-225. <https://doi.org/10.1007/s11483-018-9528-5>
- Campoverde, J. (2020). *Elaboración de galletas artesanales mediante sustitución al 100% de grasa animal por pasta de semillas de zambo (grasa vegetal) (Cucurbita ficifolia)* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/18057/1/84T00664.pdf>
- Cepeda, J. (2021). *Caracterización de yogurt tipo III con la adición de mermelada de sambo (Cucurbita ficifolia Bouché) como edulcorante* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/15516/1/27T00468.pdf>
- Chakraborty, P., Mallik, A., Sarang, N., & Lingam, S. S. (2019). A review on alternative plant protein sources available for future sustainable aqua feed production. *International Journal of Chemical Studies*, 7(3), 1399-1404.

- Chang, S. K. C. (2010). Protein Analysis. En S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (pp. 133-146). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_9)
- Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Protein Analysis. En S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (pp. 315-331). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18)
- Colobón, S. (2021). *Evaluación de la aplicación de atmósferas modificadas y temperatura de almacenamiento en la conservación de las propiedades fisicoquímicas, el contenido de fibra y carbohidratos del zambo Cucurbita ficifolia bouche* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte. Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11515/2/03%20EIA%20530%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>
- Coşkun, Ö., & Gülseren, İ. (2020). Aqueous extraction and functionality of protein concentrates manufactured from cold press meals of pumpkin, pomegranate, and grape seeds. *Nutrire*, 45(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s41110-020-00114-4>
- Cruz, A., & Valencia, G. (2020). Nutritional and functional properties of protein concentrate and protein isolates of foods. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Science within Food: Up-to-date Advances on Research and Educational Ideas* (Vol. 1, p. 176). Formatex Research Center. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/339536681\\_Nutritional\\_and\\_functional\\_properties\\_of\\_protein\\_concentrate\\_and\\_protein\\_isolates\\_of\\_foods](https://www.researchgate.net/publication/339536681_Nutritional_and_functional_properties_of_protein_concentrate_and_protein_isolates_of_foods)
- Das, M., Devi, L. M., & Badwaik, L. S. (2022). Ultrasound-assisted extraction of pumpkin seeds protein and its physicochemical and functional characterization. *Applied Food Research*, 2(1), 100121. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100121>
- Ecuador Noticias. (2015). *Mapa de Ecuador en Blanco y Negro*. Recuperado de <https://ecuadornoticias.com/mapa-de-ecuador-en-blanco-y-negro/>
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>
- Giami, S. Y., & Isichei, I. (1999). Preparation and properties of flours and protein concentrates from raw, fermented and germinated fluted pumpkin (Telfairia

- occidentalis Hook) seeds. *Plants Foods for Human Nutrition*, 54, 67-77.  
<https://doi.org/10.1023/A:1008126117921>
- González-Pérez, S., & Arellano, J. B. (2009). Vegetable protein isolates. En *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 383-419). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1533/9781845695873.383>
- Hussain, A., Kausar, T., Sehar, S., Sarwar, A., Ashraf, A. H., Jamil, M. A., ... Majeed, M. A. (2022). A Comprehensive review of functional ingredients, especially bioactive compounds present in pumpkin peel, flesh and seeds, and their health benefits. *Food Chemistry Advances*, 1, 100067.  
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100067>
- Isani, G., Bellei, E., Rudelli, C., Cabbri, R., Ferlizza, E., & Andreani, G. (2023). SDS-PAGE-Based Quantitative Assay of Hemolymph Proteins in Honeybees: Progress and Prospects for Field Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10216. <https://doi.org/10.3390/ijms241210216>
- Kim, K.-M., Kim, C. K., & Han, J.-S. (2010). In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia* Bouché), a rootstock for Cucurbitaceae. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2), 101-107.  
<https://doi.org/10.1007/s11816-009-0122-7>
- Kusumah, S. H., Andoyo, R., & Rialita, T. (2020). Protein isolation techniques of beans using different methods: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 443(1), 012053. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012053>
- La Hora. (2020). La pepa de sambo integra familias y aporta a la salud. *La Hora*. Recuperado de <https://www.lahora.com.ec/noticias/la-pepa-de-sambo-integra-familias-y-aporta-a-la-salud/#:~:text=Se%20extrae%20la%20pepa%20dentro,para%20descortezarle%E2%80%9D%2C%20explica%20Guti%C3%A9rrez.>
- Lestari, B., & Meiyanto, E. (2018). A Review: The Emerging Nutraceutical Potential of Pumpkin Seeds. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9(2), 92.  
<https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev9iss2pp92-101>

- Lim, T. K. (2012). Cucurbita ficifolia. En T. K. Lim, *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* (pp. 250-255). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0\\_39](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_39)
- Manickavasagan, A., Lim, L.-T., & Ali, A. (Eds.). (2022). *Plant Protein Foods*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-91206-2>
- Momen, S., Alavi, F., & Aider, M. (2021). Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 778-797. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.052>
- Moreno-Quiroga, G., Alba-Jiménez, J. E., Aquino-Bolaños, E. N., & Chávez-Servia, J. L. (2023). Phenolic compounds and antioxidant activity in Cucurbita ficifolia fruits, an underrated fruit. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 1029826. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1029826>
- Moya-Hernández, A., Bosquez-Molina, E., Serrato-Díaz, A., Blancas-Flores, G., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2018). Analysis of genetic diversity of Cucurbita ficifolia Bouché from different regions of Mexico, using AFLP markers and study of its hypoglycemic effect in mice. *South African Journal of Botany*, *116*, 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.409>
- Müller, J. (2017). *Dumas or Kjeldahl for reference analysis?* Recuperado de [https://www.fossanalytics.com/-/media/files/documents/papers/laboratories-segment/the-dumas-method-for-nitrogenprotein-analysis\\_gb.pdf](https://www.fossanalytics.com/-/media/files/documents/papers/laboratories-segment/the-dumas-method-for-nitrogenprotein-analysis_gb.pdf)
- Nissen, S. H., Schmidt, J. M., Gregersen, S., Hammershøj, M., Møller, A. H., Danielsen, M., ... Dalgaard, T. K. (2021). Increased solubility and functional properties of precipitated Alfalfa protein concentrate subjected to pH shift processes. *Food Hydrocolloids*, *119*, 106874. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106874>
- Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. *Food and Bioprocess Technology*, *2*(1), 1-27. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0088-4>
- Ntui, V. O., Uyoh, E. A., Udensi, O., & Enok, L. N. (2007). Response of pumpkin (Cucurbita ficifolia L.) to some growth regulators. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *5*(2), 211-214.

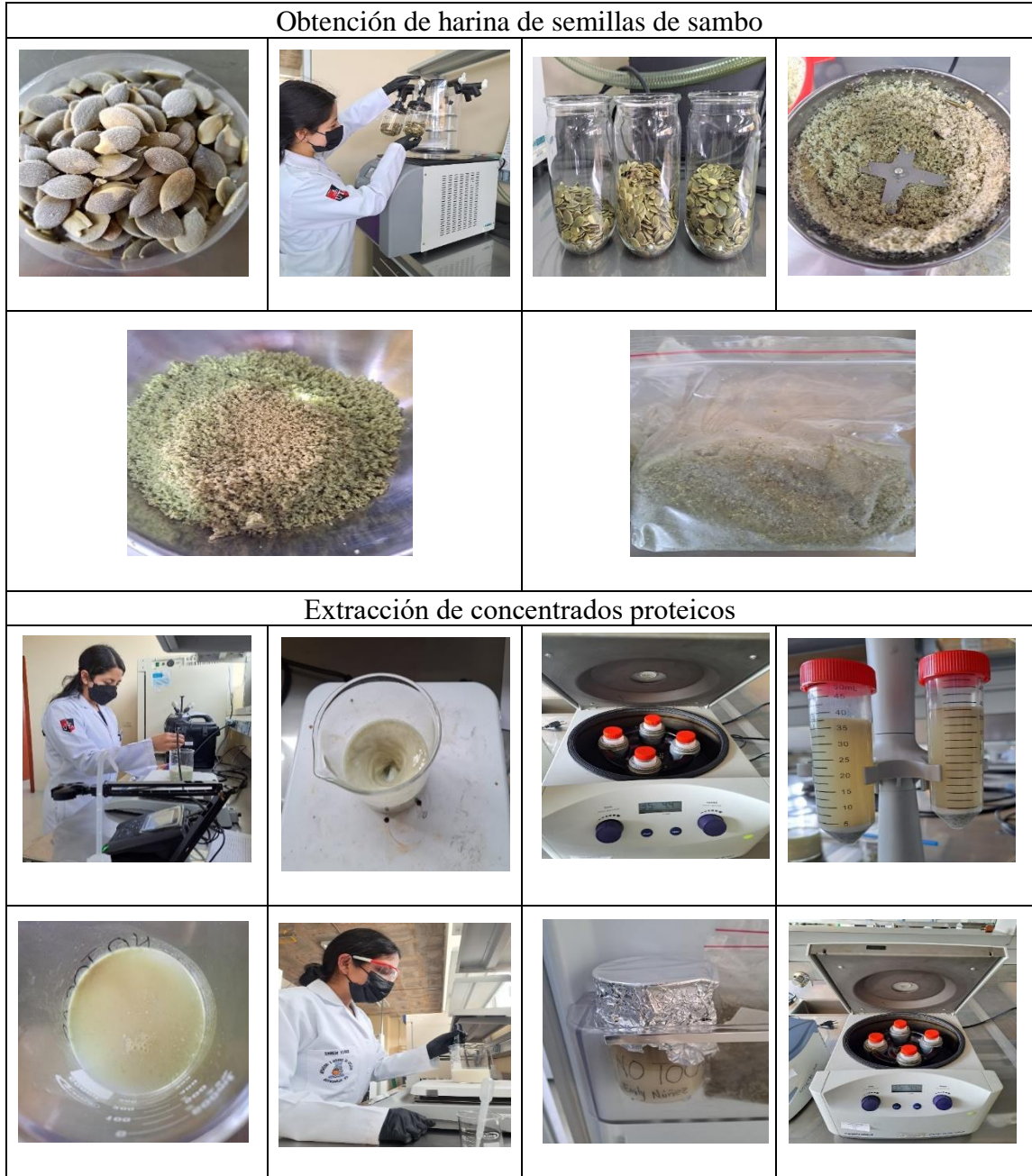
- Palma, A., & Quilambaqui, E. (2023). *Concentrados proteicos de Hormigas Santandereanas (Atta laevigata): Caracterización y evaluación de su capacidad antiinflamatoria tras el proceso de digestión gastrointestinal in vitro* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/37913/1/CAL%20039.pdf>
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarondo, M., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Proteins: Sequential Extraction Processing and Fraction Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7715-7721. <https://doi.org/10.1021/jf402323u>
- Rodríguez, P. (2022). *Liberación de péptidos con capacidad antioxidante a partir de proteínas de flores de begonias (Begonia doublet) durante la siluación de la digestión gastroduodenal in vitro* (Tesis de maestría). Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/35486/1/03%20CC.AL.pdf>
- Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Castro-Rosas, J., Vargas-León, A., Hernández-Ávila, J., Rangel-Vargas, E., ... Falfan-Cortés, R. N. (2016). Physical Properties of *Cucurbita Ficifolia* Seed and Functional Properties of Whole and Defatted Meal. *International Journal of Food Processing Technology*, 3(1), 27-35. <https://doi.org/10.15379/2408-9826.2016.03.01.04>
- Rodríguez-Ramírez, J., Barragán-Iglesias, J., Ramírez-Palma, A. J., & Méndez-Lagunas, L. L. (2023). Effect of Calcium and Osmotic Pretreatments on Mass Transfer and Texture Parameters during Processing of Chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché). *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2023/3873662>
- Roman-Ramos, R., Almanza-Perez, J. C., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T. R., Zamilpa-Alvarez, A., ... Alarcon-Aguilar, F. J. (2012). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of a Hypoglycemic Fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in Streptozotocin-Induced Diabetes Mice. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(01), 97-110. <https://doi.org/10.1142/S0192415X12500085>

- Romero, E. (2023). *Análisis de los concentrados proteicos de la Hormiga Santandereana (Atta laevigata)* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/37917/1/CAL%20043.pdf>
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., ... Cho, W. (2019). Cucurbita Plants: From Farm to Industry. *Applied Sciences*, 9(16), 3387. <https://doi.org/10.3390/app9163387>
- Serrano, M. (2020). *Elaboración de un concentrado proteico a partir de chíá (Salvia hispanica L.) para su uso como ingrediente con actividad biológica en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales fortificados* (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Recuperado de <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/15514/1/T-UCSG-PRE-TEC-CIA-70.pdf>
- Shen, C.-H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. En *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 187-214). Elsevier. Recuperado de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028230000080>
- Silva, S. (2017). *Semillas de sambo aplicadas en la cocina moderna* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas. Recuperado de <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7051/1/UDLA-EC-TTAB-2017-05.pdf>
- Srivastava, N., Sahu, P., & Banerjee, M. (2021). Nutraceutical Potential of pumpkin (Cucurbita sp.) powder, seed, extracts, and oil on diabetes; Mini Review. *Journal of Endocrinology and Disorders*, 5(1), 1-3. <https://doi.org/10.31579/2640-1045/063>
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>
- Tran, H. M., & Dang, T. Q. (2023). Enzyme Assisted Aqueous Extraction of Oil from Fig-Leaf Gourd Seed (Cucurbita ficifolia) and Physico-Chemical and Quality Characteristics of the Oil. *EC NUTRITION*, 18(3), 11-22.

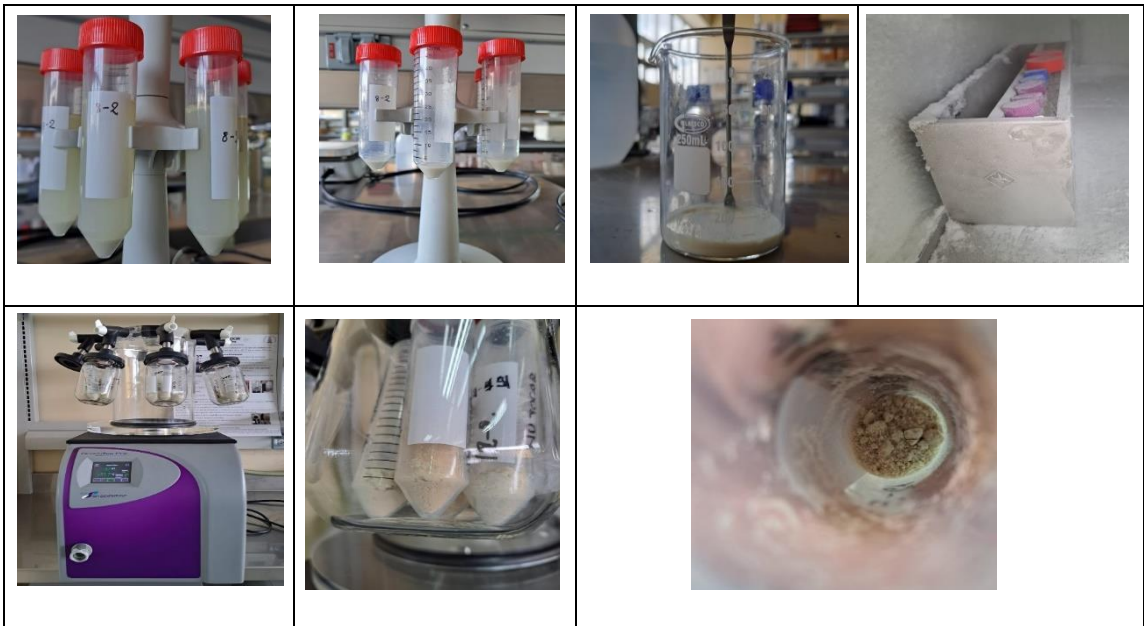
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- Vinayashree, S., & Vasu, P. (2021). Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. *Food Chemistry*, 340, 128177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128177>
- Yang, F., Huang, X., Zhang, C., Zhang, M., Huang, C., & Yang, H. (2018). Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC Advances*, 8(5), 2653-2659. <https://doi.org/10.1039/C7RA13007D>
- Zhang, T., Xie, J.-J., Zhang, J., Yang, Z.-A., Li, X., & He, S.-L. (2021). Analysis of *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) chloroplast genome and its phylogenetic implications. *Mitochondrial DNA Part B*, 6(10), 3033-3035. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1959440>

## Anexos

### Anexo 1. Obtención de harina y concentrados de las semillas de sambo



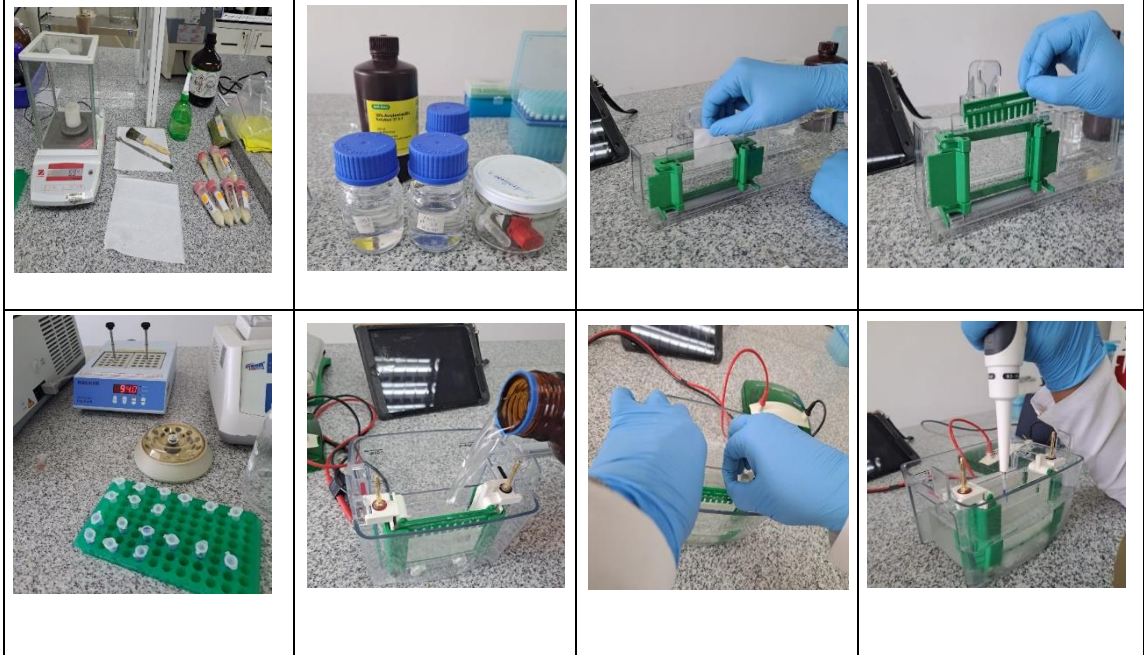


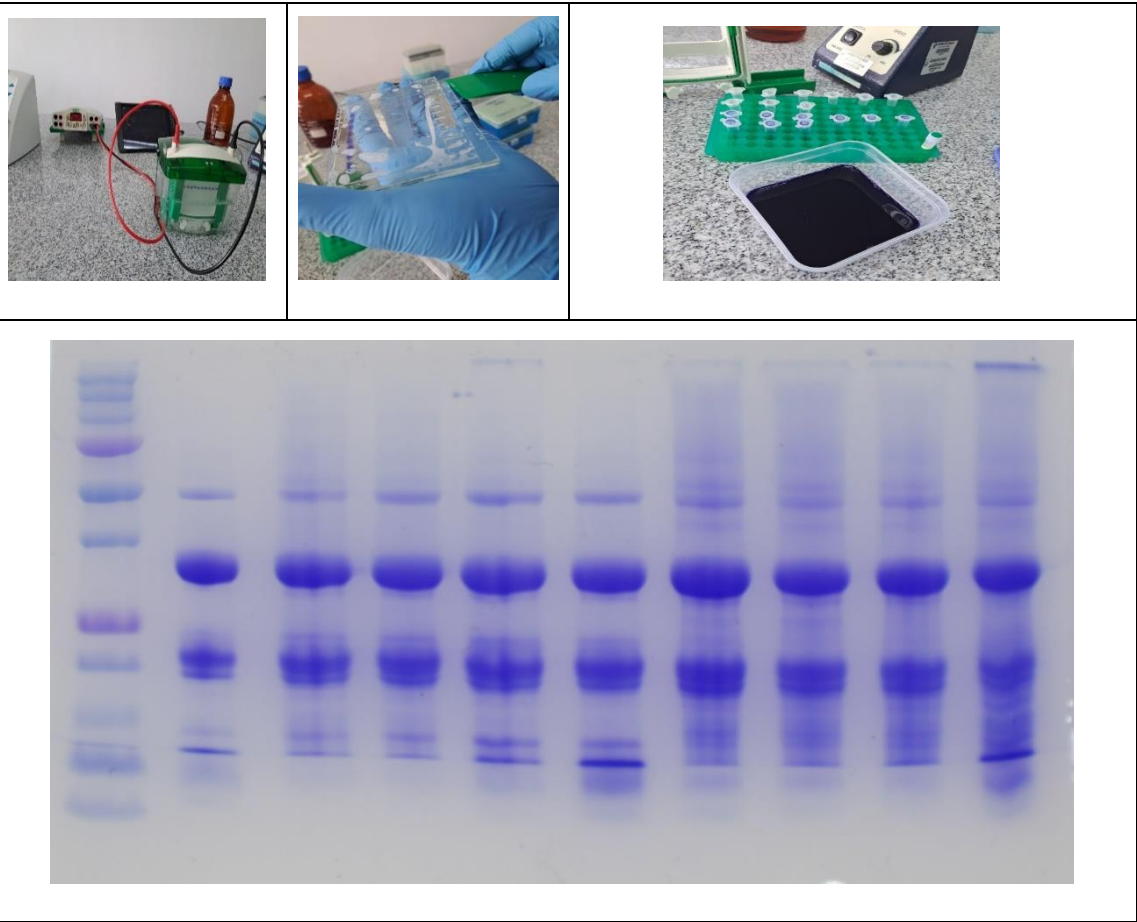


Cuantificación de proteína por Dumas

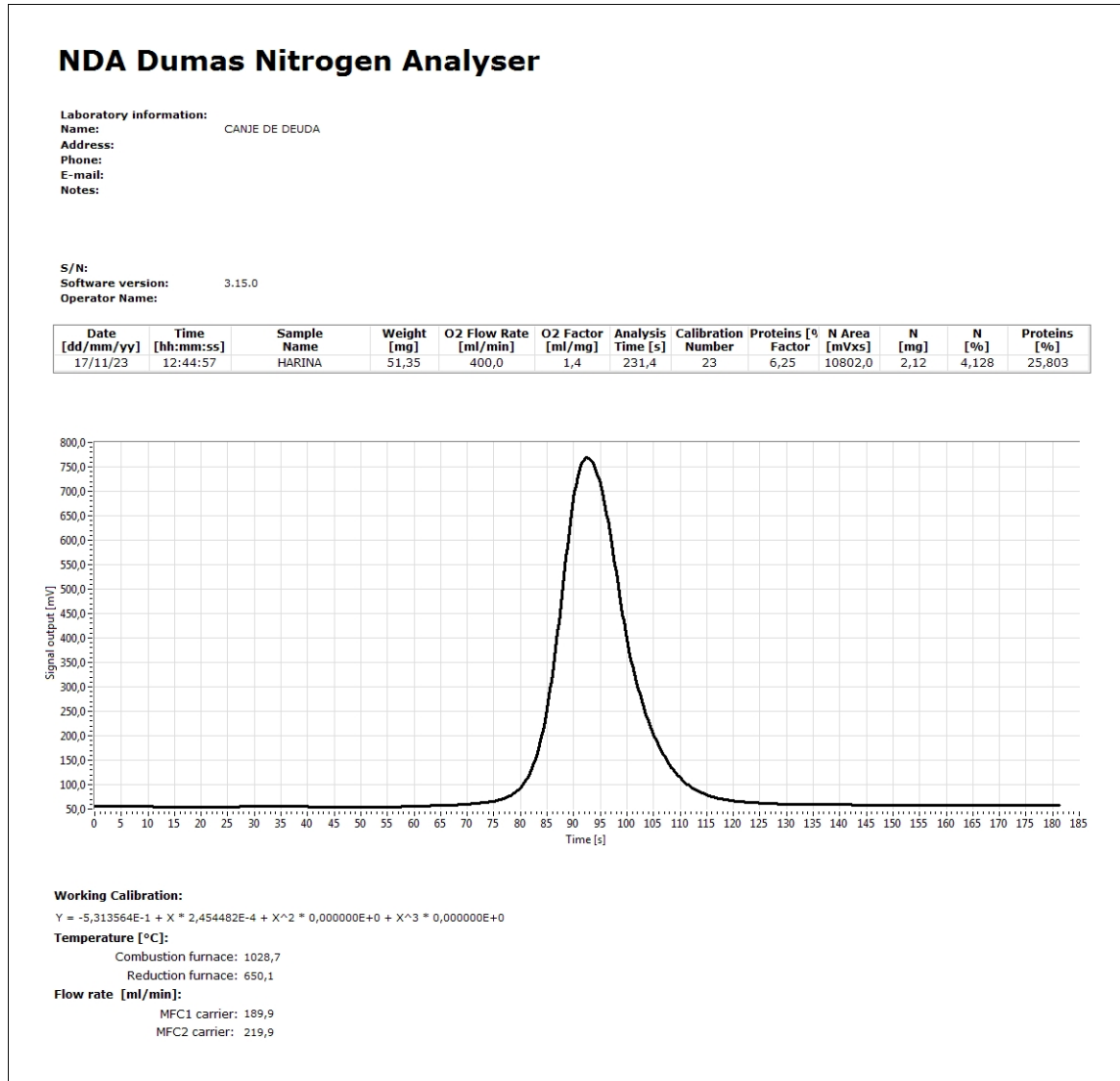


Análisis de proteína por electroforesis SDS-PAGE





## Anexo 2. Gráficas de cuantificación de proteína en el equipo Dumas



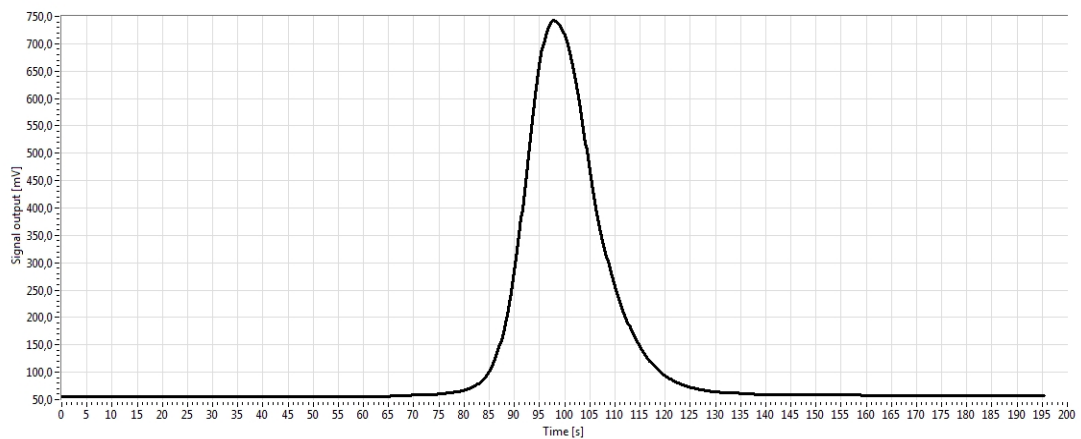
**Figura 8.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo - R1

# NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:54:26	HARINA (R)	54,43	400,0	1,4	245,4	23	6,25	11821,9	2,3703	4,355	27,217



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1029,2

Reduction furnace: 649,8

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,8

MFC2 carrier: 220,2

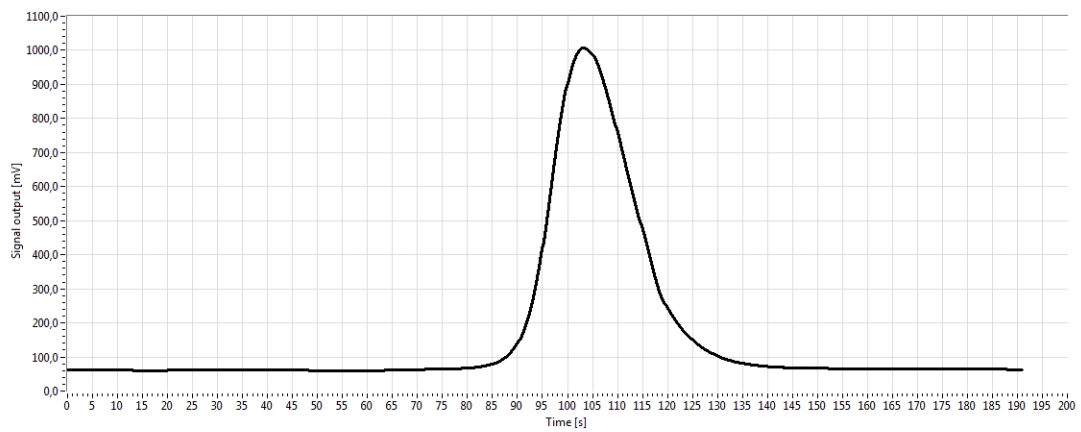
**Figura 9.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo – R2

# NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	10:34:36	8-2	53,81	400,0	1,4	241,0	23	6,25	18640,1	4,0438	7,515	46,969



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,5  
Reduction furnace: 650,1

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,1  
MFC2 carrier: 220,3

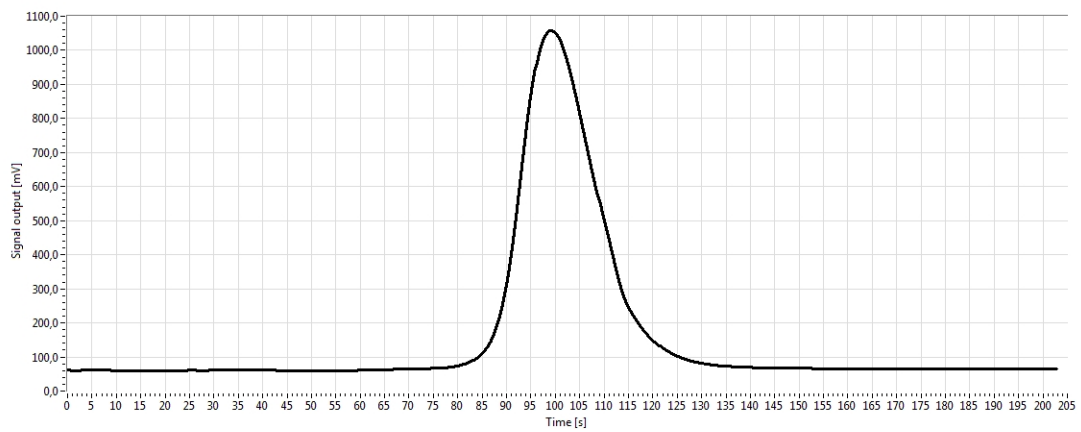
**Figura 10.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 2 de precipitación - **R1**

# NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	10:40:32	8-2 (R)	52,27	400,0	1,4	252,8	23	6,25	18624,1	4,0399	7,729	48,306



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,6  
 Reduction furnace: 650,3

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,9  
 MFC2 carrier: 219,9

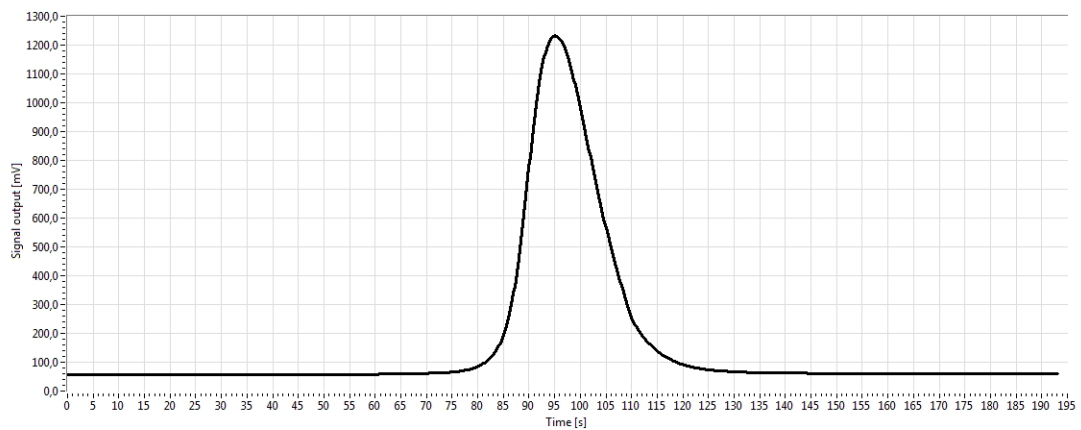
**Figura 11.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 2 de precipitación – **R2**

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:12:15	8-3	52,86	400,0	1,4	243,2	23	6,25	19447,6	4,242	8,025	50,156



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,1  
Reduction furnace: 649,9

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
MFC2 carrier: 219,8

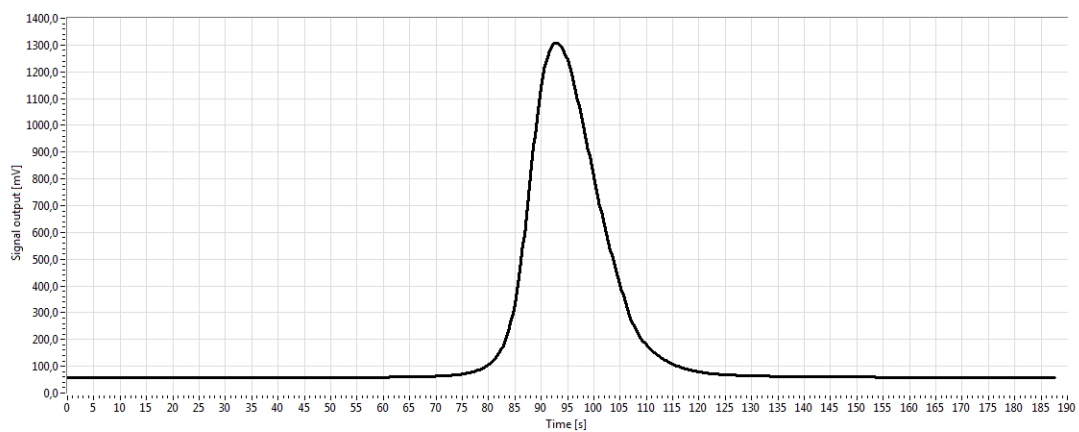
**Figura 12.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 3 de precipitación – R1

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:17:05	8-3 (R)	53,46	400,0	1,4	237,6	23	6,25	19669,4	4,2965	8,037	50,23



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1027,9  
Reduction furnace: 649,9

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,9  
MFC2 carrier: 219,8

**Figura 13.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 3 de precipitación – R2

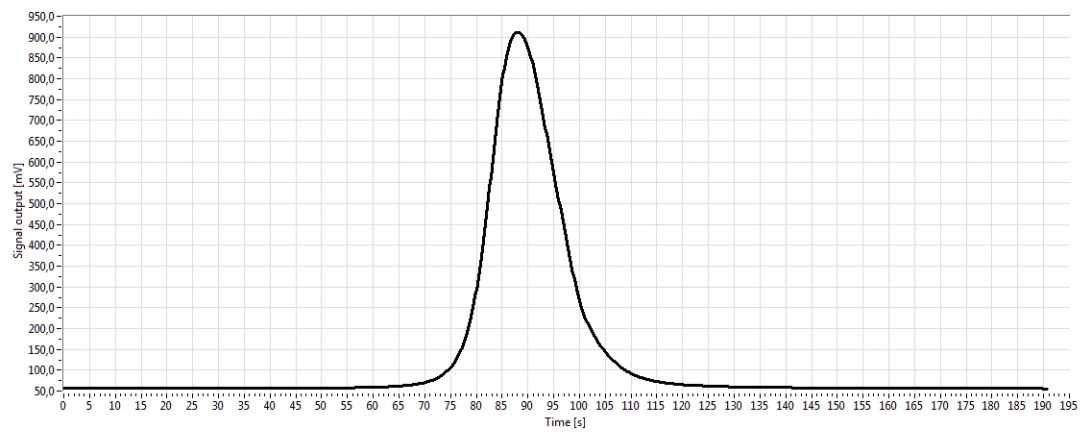


## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:59:42	8-4	30,72	400,0	1,4	240,8	23	6,25	13809,2	2,8581	9,304	58,148



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,3  
Reduction furnace: 650,0

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,9  
MFC2 carrier: 219,8

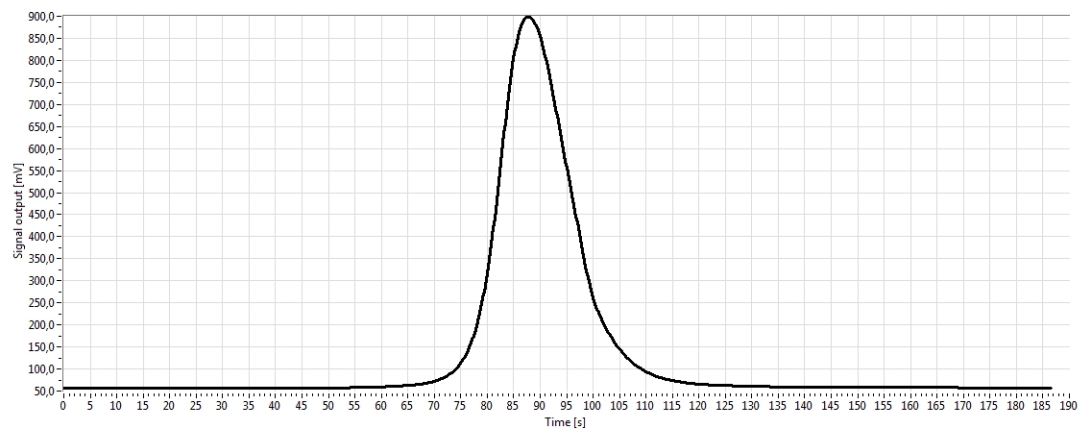
**Figura 14.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación – R1

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:43:24	8-4 (R)	30,84	400,0	1,4	236,6	23	6,25	13833,9	2,8642	9,287	58,045



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1029,2  
Reduction furnace: 650,4

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,1  
MFC2 carrier: 220,0

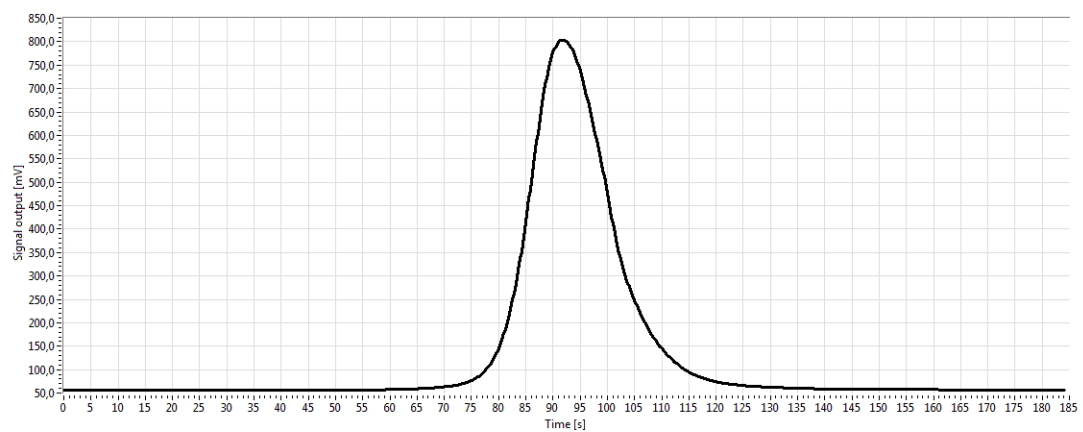
**Figura 15.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 4 de precipitación – R2

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:49:11	8-5	30,25	400,0	1,4	234,2	23	6,25	13375,7	2,7517	9,096	56,853



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,2  
 Reduction furnace: 650,3

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,1  
 MFC2 carrier: 219,8

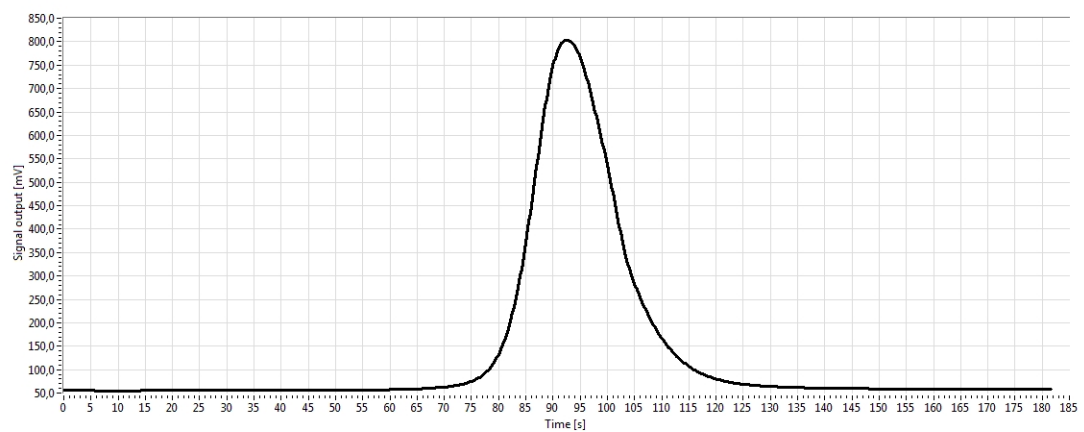
**Figura 16.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 5 de precipitación – R1

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	11:53:52	8-5 (R)	31,2	400,0	1,4	231,6	23	6,25	13785,2	2,8522	9,142	57,135



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1027,6  
 Reduction furnace: 649,7

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
 MFC2 carrier: 220,3

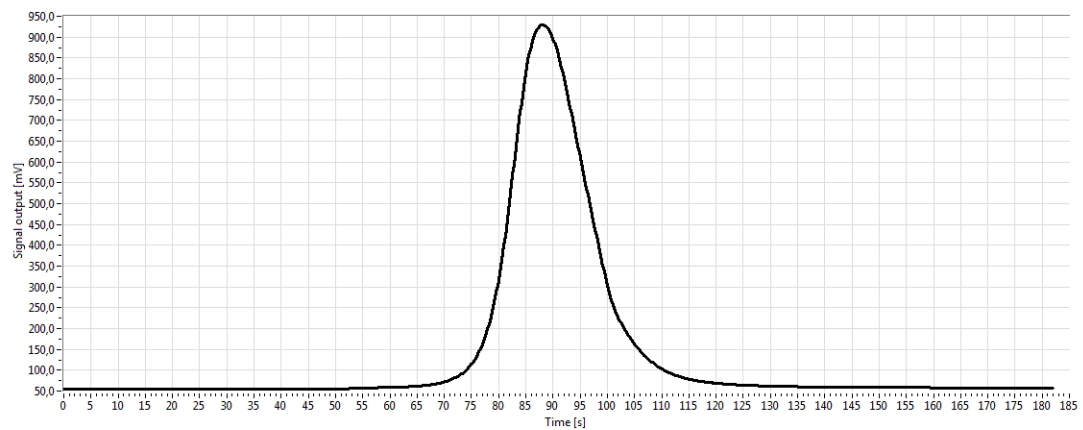
**Figura 17.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 8 de solubilización y pH 5 de precipitación – R2

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:04:29	12-2	30,33	400,0	1,4	232,0	23	6,25	14909,1	3,1281	10,313	64,459



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1029,8  
Reduction furnace: 649,9

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
MFC2 carrier: 219,9

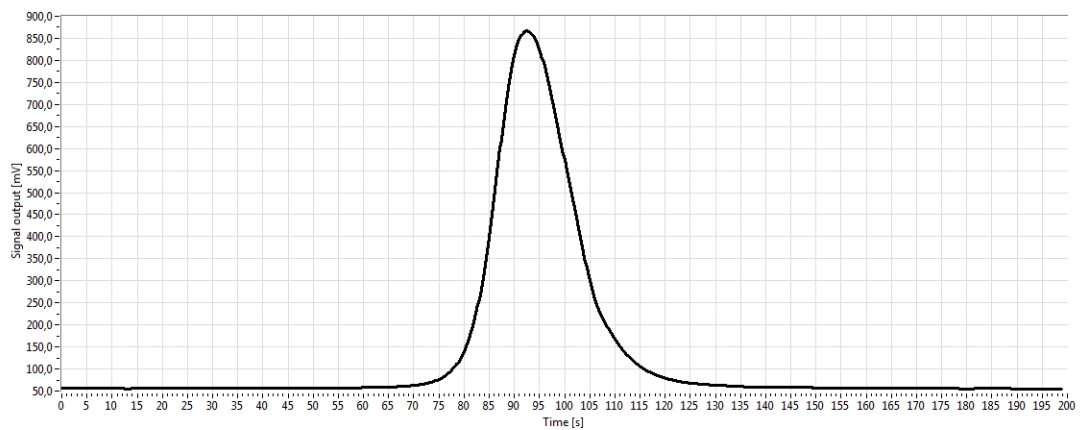
**Figura 18.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 2 de precipitación – R1

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:10:12	12-2 (R)	30,78	400,0	1,4	248,8	23	6,25	14889,6	3,1233	10,147	63,419



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1028,9  
Reduction furnace: 650,1

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
MFC2 carrier: 219,9

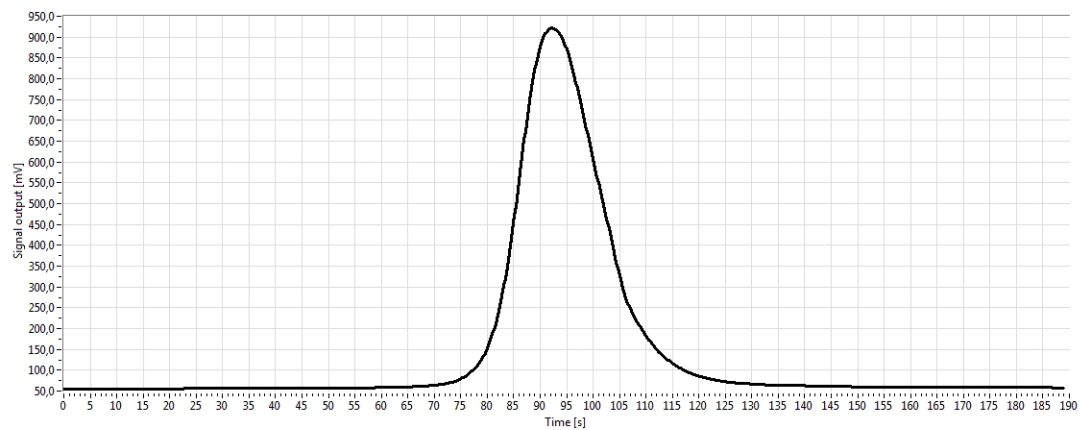
**Figura 19.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 2 de precipitación – R2

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:15:44	12-3	30,63	400,0	1,4	239,0	23	6,25	16426,0	3,5004	11,428	71,425



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,8  
Reduction furnace: 649,7

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
MFC2 carrier: 219,8

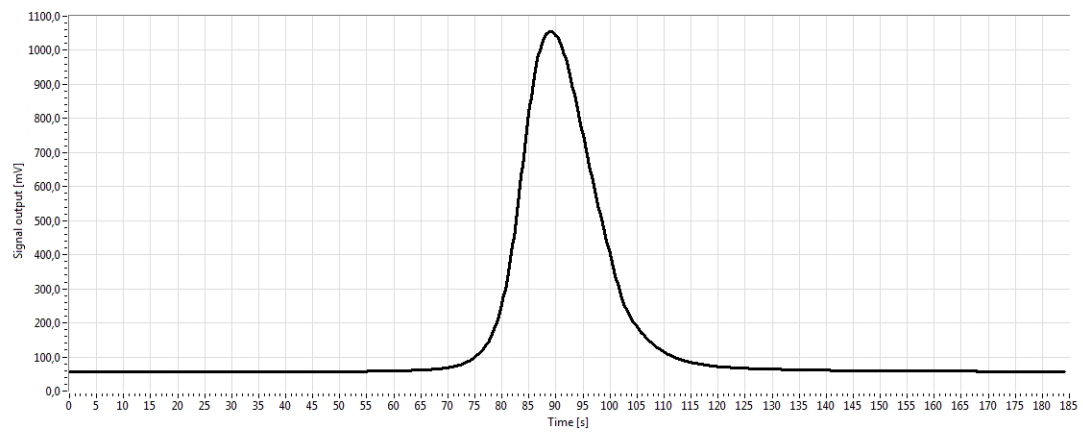
**Figura 20.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 3 de precipitación – **R1**

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:20:46	12-3 (R)	31,21	400,0	1,6	234,2	23	6,25	16571,8	3,5362	11,33	70,814



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1028,1  
Reduction furnace: 650,1

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,9  
MFC2 carrier: 220,1

**Figura 21.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 3 de precipitación – R2

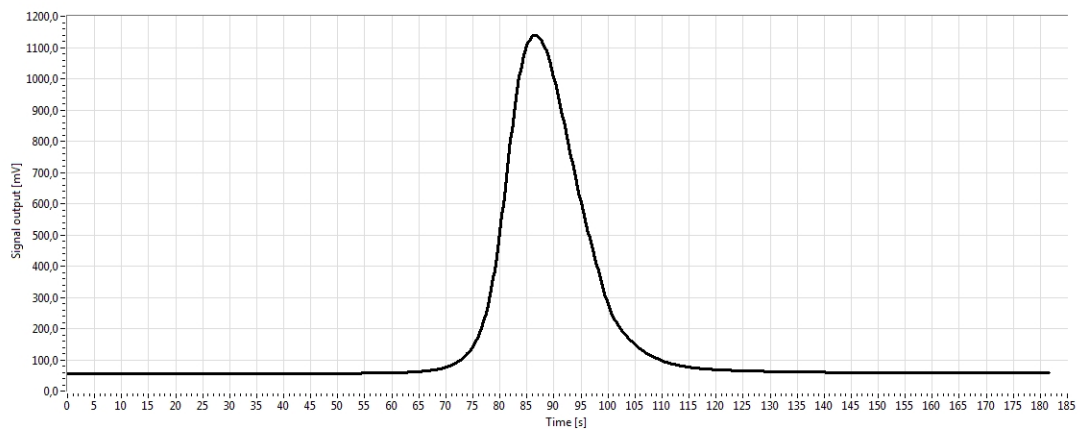


## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:25:36	12-4	31,4	400,0	1,4	231,6	23	6,25	17836,2	3,8465	12,25	76,563



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1027,9  
 Reduction furnace: 650,3

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,1  
 MFC2 carrier: 219,9

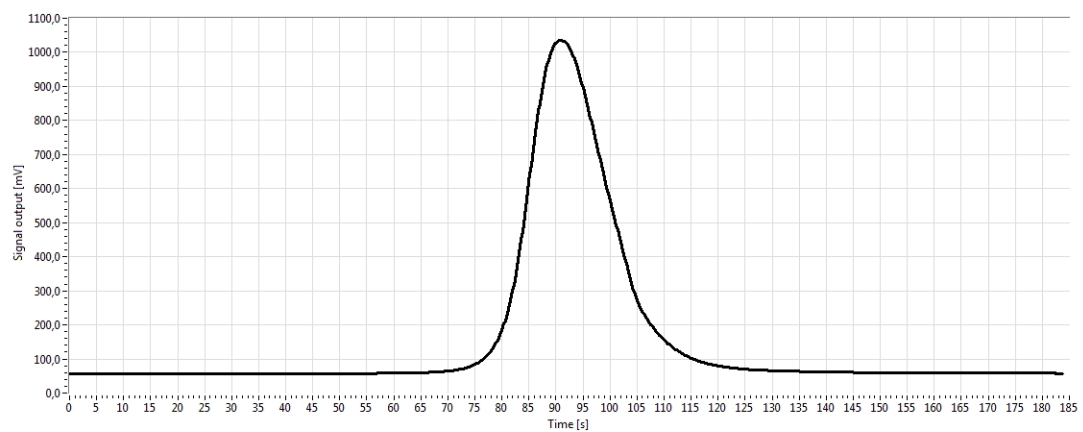
**Figura 22.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 4 de precipitación – **R1**

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:30:34	12-4 (R)	30,6	400,0	1,4	233,8	23	6,25	17471,4	3,757	12,278	76,736



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1029,0  
 Reduction furnace: 649,6

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
 MFC2 carrier: 220,0

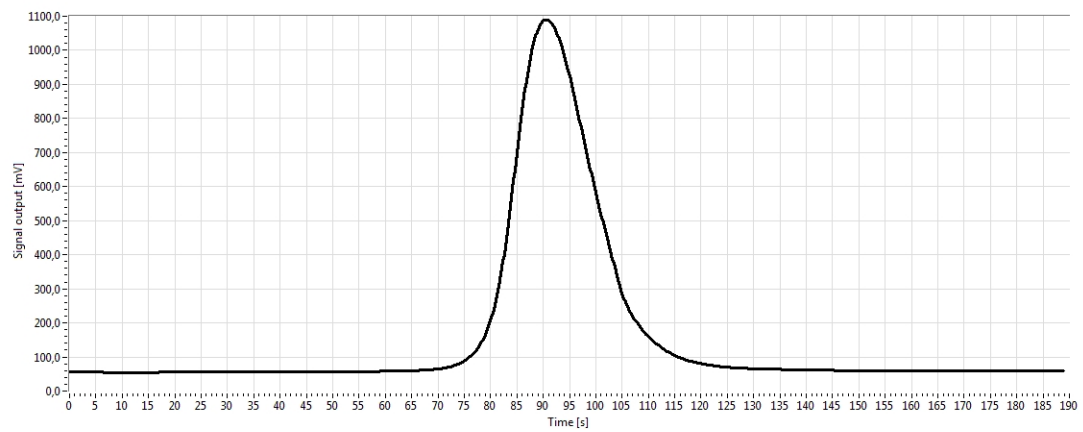
**Figura 23.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 4 de precipitación – R2

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:35:02	12-5	30,72	400,0	1,4	239,0	23	6,25	18732,3	4,0665	13,237	82,732



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1028,9  
Reduction furnace: 649,4

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 189,9  
MFC2 carrier: 219,9

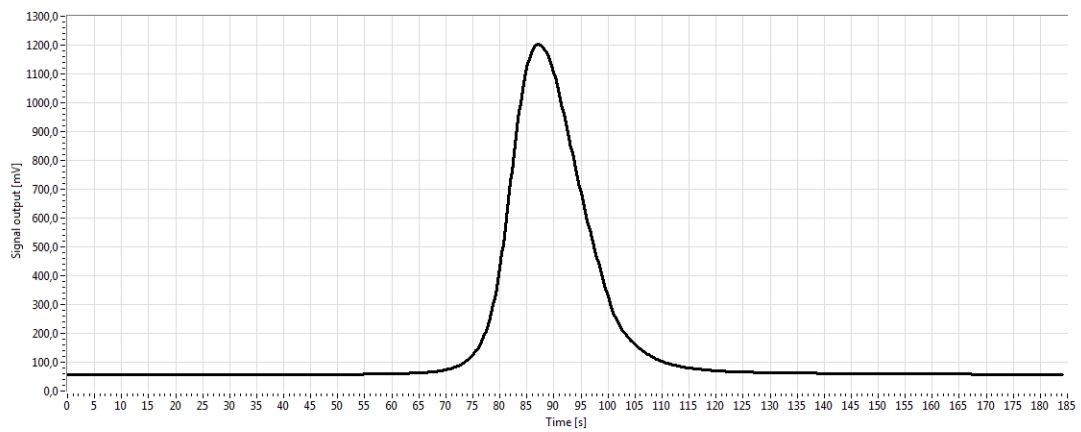
**Figura 24.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 5 de precipitación – R1

## NDA Dumas Nitrogen Analyser

**Laboratory information:**  
**Name:** CANJE DE DEUDA  
**Address:**  
**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 [%]
17/11/23	12:40:04	12-5 (R)	31,02	400,0	1,4	234,2	23	6,25	18544,1	4,0203	12,96	81,001



**Working Calibration:**

$$Y = -5,313564E-1 + X * 2,454482E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0$$

**Temperature [°C]:**

Combustion furnace: 1030,3  
Reduction furnace: 650,0

**Flow rate [ml/min]:**

MFC1 carrier: 190,0  
MFC2 carrier: 219,9

**Figura 25.** Resultado obtenido para harina de semillas de sambo a pH 12 de solubilización y pH 5 de precipitación – R2

### Anexo 3. Resultados obtenidos de la fase experimental

#### Simbología

$W_{ih}$ : Peso inicial de la harina

$W_{fc}$  Peso final del concentrado

**Tabla 8.** Datos obtenidos de concentrados proteicos de semillas de sambo liofilizadas.

Muestra	N° Réplica	$W_{ih}$ (g)	$W_{fc}$ (g)	Rendimiento de concentrado proteico (%)
8.0 - 2.0	1	25.0045	1.2214	4.8847
	2		1.2312	4.9239
8.0 - 3.0	1	25.0024	1.3421	5.3678
	2		1.3545	5.4175
8.0 - 4.0	1	25.0017	2.4119	9.6469
	2		2.4216	9.6857
8.0 - 5.0	1	25.0035	3.3918	13.5653
	2		3.3930	13.5701
12.0 - 2.0	1	25.0018	5.4978	21.9896
	2		5.2446	20.9769
12.0 - 3.0	1	25.0048	5.1345	20.5341
	2		5.1422	20.5649
12.0 - 4.0	1	25.0044	4.7404	18.9583
	2		4.8264	19.3022
12.0 - 5.0	1	25.0053	5.3566	21.4219
	2		5.3602	21.4363

**Tabla 9.** Análisis estadístico para el porcentaje de rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo.

Muestra	N° Réplica	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
8.0 - 2.0	1	4.8847	4.9043	0.0277	0.5651

	2	4.9239			
<b>8.0 - 3.0</b>	1	5.3678	5.3927	0.0351	0.6503
	2	5.4175			
<b>8.0 - 4.0</b>	1	9.6469	9.6663	0.0274	0.2838
	2	9.6857			
<b>8.0 - 5.0</b>	1	13.5653	13.5677	0.0034	0.0250
	2	13.5701			
<b>12.0 - 2.0</b>	1	21.9896	21.4833	0.7161	3.3333
	2	20.9769			
<b>12.0 - 3.0</b>	1	20.5341	20.5495	0.0218	0.1060
	2	20.5649			
<b>12.0 - 4.0</b>	1	18.9583	19.1303	0.2432	1.2713
	2	19.3022			
<b>12.0 - 5.0</b>	1	21.4219	21.4291	0.0102	0.0475
	2	21.4363			

**Tabla 10.** Análisis de varianza para el porcentaje de rendimiento de los concentrados proteicos de las semillas de sambo.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>MODELO</b>	708.13	7	101.16	1406.84	<0.0001
<b>FACTOR A</b>	601.75	1	601.75	8368.38	<0.0001
<b>FACTOR B</b>	52.17	3	17.39	241.86	<0.0001
<b>INTERACCIÓN</b>					
<b>AB</b>	54.21	3	18.07	251.30	<0.0001
<b>ERROR</b>	0.58	8	0.07		
<b>TOTAL</b>	708.71	15			

**Tabla 11.** Prueba de rangos múltiples (Tukey) para el Factor A.

<b>Factor A</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
-----------------	---------------	----------	--------------	--------------------------

<b>12.0</b>	20.65	8	0.09	A
<b>8.0</b>	8.38	8	0.09	B

**Tabla 12.** Prueba de rangos múltiples (Tukey) para el Factor B.

<b>Factor B</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>5.0</b>	17.50	4	0.13	A
<b>4.0</b>	14.40	4	0.13	B
<b>2.0</b>	1319	4	0.13	C
<b>3.0</b>	12.97	4	0.13	C

**Tabla 13.** Prueba de rangos múltiples (Tukey) del porcentaje de rendimiento para cada tratamiento.

<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>12.0</b>	2.0	21.4833	2	0.19	A
	5.0	21.4291	2	0.19	A
	3.0	20.5495	2	0.19	A
	4.0	19.1303	2	0.19	B
<b>8.0</b>	5.0	13.5677	2	0.19	C
	4.0	9.6663	2	0.19	D
	3.0	5.3927	2	0.19	E
	2.0	4.9043	2	0.19	E

**Tabla 14.** Datos obtenidos de la cuantificación de proteína en porcentaje de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas.

<b>Muestra</b>	<b>N° Réplica</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Factor de proteína</b>	<b>N Área (mV x s)</b>	<b>N (mg)</b>	<b>N (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>
<b>Harina</b>	1	51.35	6.25	10802.0	2.12	4.128	25.8030
	2	54.43	6.25	11821.9	2.3703	4.355	27.2170

<b>8.0 - 2.0</b>	1	53.81	6.25	18640.1	4.0438	7.515	46.9690
	2	52.27	6.25	18624.1	4.0399	7.729	48.3060
<b>8.0 - 3.0</b>	1	52.86	6.25	19447.6	4.242	8.025	50.1560
	2	53.46	6.25	19669.4	4.2965	8.037	50.2300
<b>8.0 - 4.0</b>	1	30.72	6.25	13809.2	2.8581	9.304	58.1480
	2	30.84	6.25	13833.9	2.8642	9.287	58.0450
<b>8.0 - 5.0</b>	1	30.25	6.25	13375.7	2.7517	9.096	56.8530
	2	31.20	6.25	13785.2	2.8522	9.142	57.1350
<b>12.0 - 2.0</b>	1	30.33	6.25	14909.1	3.1281	10.313	64.4590
	2	30.78	6.25	14889.6	3.1233	10.147	63.4190
<b>12.0 - 3.0</b>	1	30.63	6.25	16426.0	3.5004	11.428	71.4250
	2	31.21	6.25	16571.8	3.5362	11.33	70.8140
<b>12.0 - 4.0</b>	1	31.40	6.25	17836.2	3.8465	12.25	76.5630
	2	30.60	6.25	17471.4	3.757	12.278	76.7360
<b>12.0 - 5.0</b>	1	30.72	6.25	18732.3	4.0665	13.237	82.7320
	2	31.02	6.25	18544.1	4.0203	12.96	81.0010

**Tabla 15.** Análisis estadístico de la cuantificación de proteína (%) de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas.

<b>Muestra</b>	<b>N° Réplica</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>Harina</b>	1	25.8030	26.5100	0.9998	3.7716
	2	27.2170			
<b>8.0 - 2.0</b>	1	46.9690	47.6375	0.9454	1.9846
	2	48.3060			
<b>8.0 - 3.0</b>	1	50.1560	50.1930	0.0523	0.1042
	2	50.2300			
<b>8.0 - 4.0</b>	1	58.1480	58.0965	0.0728	0.1254
	2	58.0450			
<b>8.0 - 5.0</b>	1	56.8530	56.9940	0.1994	0.3499
	2	57.1350			
<b>12.0 - 2.0</b>	1	64.4590	63.9390	0.7354	1.1501



	2	63.4190			
<b>12.0 – 3.0</b>	1	71.4250	71.1195	0.4320	0.6075
	2	70.8140			
<b>12.0 – 4.0</b>	1	76.5630	76.6495	0.1223	0.1596
	2	76.7360			
<b>12.0 – 5.0</b>	1	82.7320	81.8665	1.2240	1.4951
	2	81.0010			

**Tabla 16.** Análisis de varianza para el porcentaje de proteína de los concentrados proteicos de las semillas de sambo por el método Dumas.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>MODELO</b>	2136.85	7	305.26	767.43	<0.0001
<b>FACTOR A</b>	1626.25	1	1626.25	4088.37	<0.0001
<b>FACTOR B</b>	470.34	3	156.78	394.14	<0.0001
<b>INTERACCIÓN</b>					
<b>AB</b>	40.27	3	13.42	33.74	<0.0001
<b>ERROR</b>	3.18	8	0.40		
<b>TOTAL</b>	2140.03	15			

**Tabla 17.** Prueba de rangos múltiples del porcentaje de rendimiento para el Factor A por el método Dumas.

<b>Factor A</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>12.0</b>	73.39	8	0.22	A
<b>8.0</b>	53.23	8	0.22	B

**Tabla 18.** Prueba de rangos múltiples del porcentaje de rendimiento para el Factor B por el método Dumas.

<b>Factor B</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>5.0</b>	69.43	4	0.32	A
<b>4.0</b>	67.37	4	0.32	B
<b>3.0</b>	60.66	4	0.32	C
<b>2.0</b>	55.79	4	0.32	D

**Tabla 19.** Prueba de rangos múltiples Tukey del porcentaje de rendimiento para cada tratamiento por el método Dumas.

<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>E. E.</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
<b>12.0</b>	5.0	81.87	2	0.45	A
	4.0	76.65	2	0.45	B
	3.0	71.12	2	0.45	C
	2.0	63.94	2	0.45	D
<b>8.0</b>	4.0	58.10	2	0.45	E
	5.0	56.99	2	0.45	E
	3.0	50.19	2	0.45	F
	2.0	47.64	2	0.45	G

Cálculos demostrativos (8.0 - 2.0)

- Rendimiento de concentrado proteico

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso final del concentrado (g)}}{\text{peso inicial de la harina (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{1.2214 \text{ (g)}}{25.0045 \text{ (g)}} \times 100\%$$

*% Rendimiento = 4.8847%*

- Media o promedio

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{4.8847 + 4.9239}{2}$$

$$\bar{X} = 4.9043$$

- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(4.8847 - 4.9043)^2 + (4.9239 - 4.9043)^2}{2 - 1}}$$

$$S = 0.0277$$

- Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$CV = \frac{0.0277}{4.9043} \times 100\%$$

$$CV = 0.5651\%$$