UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE ALIMENTOS

Tema: Evaluación de la actividad antioxidante de los concentrados proteicos de la pepa de zambo (*Cucurbita ficifolia* B.) tras la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro*

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: María Valeria Espín Falconi

Tutor: Dr. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro.

Ambato-Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

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, 30 de enero de 2025



Dr. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

1802738102

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, María Valeria Espín Falconi, 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.



María Valeria Espín Falconi

1727458869

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, consulta y procesos de investigación, 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 se realice respetando mis derechos de autor.



María Valeria Espín Falconi

1727458869

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 Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
MANUEL ISRAEL
GUANOQUIZA RIVERA

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA
CERDA MEJIA

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

1804148086

Firmado electrónicamente por:
ANDREA VERONICA
DELGADO RAMOS

Mg. Andrea Verónica Delgado Ramos

0401305008

Ambato, 3 de febrero de 2025

DEDICATORIA

A mi mamá María Isabel Falconi, mi primer y más grande amor, por ser la fuerza que ha estado a mi lado desde el inicio de mi vida. Gracias por tu inquebrantable apoyo, por tu amor incondicional y por enseñarme el verdadero significado de la dedicación, la perseverancia y la paciencia. Este logro es tan tuyo como mío, porque sin ti, sin tus sacrificios y sin tu ejemplo de valentía y sabiduría, no estaría aquí hoy. Te agradezco desde lo más profundo de mi corazón por ser mi guía, mi refugio y mi fortaleza.

A mi familia, quienes siempre me han rodeado con amor, comprensión y aliento. A cada uno de ustedes, por estar presentes en los momentos de celebración y también en los de incertidumbre. Su presencia constante en mi vida ha sido un pilar fundamental para que pudiera avanzar, y este logro no sería el mismo sin todo lo que me han brindado: cariño, enseñanzas y fortaleza que me ha permitido superar cualquier obstáculo.

A mi hermana María Laura, por ser mi compañera de vida y por estar a mi lado, brindándome su apoyo incondicional. Eres mi mejor amiga, mi confidente y la persona que mejor entiende mis silencios. Gracias por tus risas, tus consejos, y por ser mi compañera incansable en cada etapa de mi vida. Este logro es también un reflejo del amor y la hermandad que compartimos, siempre impulsándonos hacia adelante.

A mi novio Christian Salinas, por ser mi refugio de paz y motivación. Gracias por tu amor, por ser mi compañero en cada paso de este camino tan desafiante. Tu paciencia, apoyo y fe en mí han sido fundamentales para mantenerme firme y confiada. Me has enseñado a ver el mundo con una perspectiva diferente y a nunca rendirme, incluso en los momentos más difíciles. Te agradezco profundamente por estar a mi lado, por entenderme en mis días más grises y por compartir mis alegrías con tanta emoción. Este logro también es fruto de nuestra complicidad y amor.

A mi perro Martín, quien con su lealtad y alegría me ha dado una fuente constante de consuelo y amor. Gracias por tus caricias silenciosas y por ser siempre el refugio seguro al que recurro cuando el cansancio y la incertidumbre me invaden. Aunque no hables, sé que me entiendes, y tus ojos siempre tienen la respuesta que busco en los momentos de estrés y agobio. A ti, por brindarme una alegría pura y sincera, te dedico una parte de este logro.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi mamá, mi mayor fuente de inspiración y fortaleza. Gracias por tu amor incondicional, por tu paciencia y por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Tu confianza en mí, tu aliento y tu ejemplo de vida me han impulsado a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Te dedico este logro con todo mi amor.

A mi familia, por su constante apoyo y cariño. Gracias por estar siempre a mi lado, celebrando mis logros y brindándome fuerzas en los momentos de duda. Mi agradecimiento más profundo por ser mi sostén emocional y por brindarme la estabilidad que tanto necesitaba.

A mi tutor de tesis, Dr. Rubén Vilcacundo, por su orientación, paciencia y dedicación a lo largo de todo este proceso. Gracias por compartir conmigo su conocimiento y por guiarme en cada paso de la investigación. Su apoyo académico y humano ha sido fundamental para la culminación de este trabajo, y siempre estaré agradecida por haber contado con su respaldo y experiencia.

A mi novio, por ser mi compañero, mi apoyo constante y mi fuente de alegría. Gracias por estar a mi lado en todo momento, por comprender mis momentos de estrés y por brindarme la calma cuando más lo necesitaba. Gracias por hacer este camino más llevadero y por compartir tus sonrisas, tus palabras de aliento y tu confianza en mí.

A la universidad, por brindarme las herramientas necesarias para formarme profesionalmente y por ser el espacio donde he podido crecer, aprender y desarrollar mis habilidades. Gracias a todos los profesores, administrativos y compañeros que, de alguna u otra forma, contribuyeron a mi formación académica y personal. Esta etapa ha sido fundamental en mi vida, y estoy profundamente agradecida por todo lo que me ha ofrecido.

Finalmente, a todos aquellos que, con su cariño, apoyo o incluso con una palabra de aliento, han formado parte de este proceso, les agradezco de todo corazón. Este trabajo es el resultado de esfuerzos compartidos, y me siento muy afortunada de haber contado con cada uno de ustedes en mi camino.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO viii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS xi
RESUMEN EJECUTIVO xii
ABSTRACT xiii
CAPÍTULO I 1
MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes Investigativos 1
1.1.1. Justificación 1
1.1.2. Concentrados Proteicos 3
1.1.3. Ultracongelación 4
1.1.4. Liofilización 4
1.1.5. Simulación de la digestión gastro intestinal *in vitro* 5
1.1.6. Actividad antioxidante 6
1.2. Objetivos 6
1.2.1. Objetivo General 6
1.2.2. Objetivos Específicos 6
CAPÍTULO II 7
METODOLOGÍA 7
2.1. Materiales 7
2.2. Métodos 10
2.2.1. Simulación de la digestión gastrointestinal in vitro 10
2.2.2. Determinación de la hidrólisis por Electroforesis SDS-PAGE 11
2.2.3. Actividad antioxidante 13
CAPÍTULO III 15

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 15
3.1. Electroforesis SDS-PAGE 15
CAPÍTULO IV 22
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 22
4.1. Conclusiones 22
4.2. Recomendaciones 23
5. BIBLIOGRAFÍA 24
ANEXOS 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes utilizados en la preparación de simulación gástrica e intestinal. 10
Tabla 2. Volúmenes utilizados en preparación de geles de poliacrilamida. 12
Tabla 3. Resultados de la Actividad Antioxidante (ABTS) post digestión gastro-intestinal 21
Tabla 4. Prueba de ANOVA 38
Tabla 5. Prueba de Tukey 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización de los digeridos de la proteína de la pepa de zambo, post digestión gástrica in vitro por Electroforesis SDS 17
Figura 2. Caracterización de los digeridos de la proteína de la pepa de zambo, post digestión gastro-intestinal in vitro por Electroforesis SDS-PAGE 19
Figura 3. Peso del concentrado proteico 28
Figura 4. Inicio del proceso gástrico 28
Figura 5. Mediciones de pH fase gástrica 29
Figura 6. Ajuste de pH fase gástrica 29
Figura 7. Pesaje enzima pepsina 30
Figura 8. Pesaje de bilis 30
Figura 9. Digestión intestinal 31
Figura 10. Ultracongelación de muestras 31
Figura 11. Liofilización de muestras 32
Figura 12. Pesaje de muestras para actividad antioxidante 32
Figura 13. Proceso de sonificación 33
Figura 14. Centrifugación de muestras 33
Figura 15. Recolección de sobrenadante 34
Figura 16. Medición absorbancia para actividad antioxidante 34
Figura 17. Pesaje de muestras para electroforesis 35
Figura 18. Preparación de geles 35
Figura 19. Preparación muestras para electroforesis 36
Figura 20. Cámara de electroforesis 36
Figura 21. Tinción del gel de electroforesis 37
Figura 22. Curva de calibración de trolox 37

RESUMEN EJECUTIVO

Las proteínas vegetales representan una fuente significativa de nutrición en la dieta humana, pero toman mayor relevancia cuando se obtienen de residuos como las semillas de *Cucurbita ficifolia B.* (zambo). Estas semillas, que son no solo abundantes y accesibles, sino también económicas, aún carecen de una investigación exhaustiva sobre sus propiedades bioactivas. Esta falta de estudios científicos motivó la realización del presente proyecto, el cual responde a la creciente necesidad global de asegurar la seguridad y soberanía alimentaria. En este sentido, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de los concentrados proteicos extraídos previamente de la pepa de zambo, los cuales fueron conservados a menos 80 grados centígrados. Posteriormente, se llevó a cabo una simulación gastroduodenal *in vitro* a diferentes valores de pH (1.2, 3.2 y 3.5), con el fin de estudiar el efecto de estas condiciones sobre la liberación de péptidos con capacidad antioxidante. Además, se evaluó cualitativamente el grado de hidrólisis de los digeridos gástricos e intestinales de los concentrados mediante electroforesis SDS-PAGE, observándose una hidrólisis completa al término de la simulación duodenal. La medición de la actividad antioxidante, empleando el método ABTS, mostró que el tratamiento a pH 3.2 presentó la mayor actividad alcanzando un valor de 275.57 más-menos 2.26 micro mol de Trolox equivalente por gramo, lo que supera de manera significativa la actividad antioxidante de frutas comúnmente consumidas, como el tomate de árbol y la pera.

Palabras Clave: Concentrados proteicos, Digestión gástrica, Digestión intestinal, Actividad antioxidante, Hidrólisis

ABSTRACT

Plant proteins represent a significant source of nutrition in the human diet, but they take on greater relevance when obtained from residues such as the seeds of Cucurbita ficifolia B. (zambo). These seeds, which are not only abundant and accessible, but also inexpensive, still lack comprehensive research on their bioactive properties. This lack of scientific studies motivated the present project, which responds to the growing global need to ensure food security and sovereignty. In this sense, the main objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of protein concentrates previously extracted from the zambo seed, which were preserved at minus 80 degrees Celsius. Subsequently, an in vitro gastroduodenal simulation was carried out at different pH values (1.2, 3.2 and 3.5), in order to study the effect of these conditions on the release of peptides with antioxidant capacity. In addition, the degree of hydrolysis of the gastric and intestinal digests of the concentrates was qualitatively evaluated by SDS-PAGE electrophoresis, and complete hydrolysis was observed at the end of the duodenal simulation. The measurement of the antioxidant activity, using the ABTS method, showed that the treatment at pH 3.2 presented the highest activity, reaching a value of 275.57 plus-minus 2.26 micro mol of Trolox equivalent per gram, which significantly exceeds the activity of the other treatments.

Keywords: Protein concentrates, Gastric digestion, Intestinal digestion, Antioxidant activity, Hydrolysis

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Justificación

El concentrado proteico extraído de las semillas de zambo se presenta como una fuente de proteínas de alto valor nutricional, con un contenido de 81,86% **(Núñez, 2024)**. Este elevado contenido resalta la relevancia del zambo como una fuente potencial para mejorar la calidad de la dieta, especialmente en poblaciones que dependen de fuentes vegetales para satisfacer sus necesidades proteicas. Sin embargo, a pesar de la alta concentración proteica en estas semillas, hasta la fecha no se han realizado estudios que aborden las modificaciones estructurales de las proteínas del zambo durante la digestión gastrointestinal ni las actividades biológicas de los digeridos resultantes de este proceso. La falta de información sobre cómo las proteínas de zambo se comportan a nivel digestivo limita nuestra capacidad para evaluar su valor funcional y aprovechar completamente sus potenciales beneficios.

Las proteínas de origen vegetal, como las del zambo, son generalmente consideradas fuentes incompletas de aminoácidos esenciales, debido a la presencia de aminoácidos limitantes en su composición. No obstante, la calidad de estas proteínas puede mejorar significativamente mediante el proceso de hidrólisis, que descompone las cadenas proteicas en péptidos pequeños y aminoácidos libres, aumentando su digestibilidad y biodisponibilidad. Este proceso no solo mejora la asimilación de los nutrientes, sino que también puede potenciar la actividad biológica de los péptidos resultantes como la actividad antioxidante. La digestibilidad proteica es un factor crucial que se evalúa mediante métodos *in vitro* que simulan las fases de la digestión gástrica y duodenal **(Carrillo, 2014)**. La comprensión de la digestibilidad y la liberación de péptidos bioactivos a partir del concentrado proteico de la pepa de zambo puede ser fundamental para optimizar su uso en la nutrición humana.

El consumo de proteínas vegetales representa una alternativa viable para satisfacer los requerimientos proteicos diarios, especialmente en contextos donde los recursos son limitados o donde se busca diversificar las fuentes de proteínas. Las proteínas vegetales no solo son económicas y fácilmente accesibles, sino que también se asocian con una serie de beneficios para la salud. Investigaciones recientes indican que el consumo regular de proteínas de origen vegetal está relacionado con una menor mortalidad, así como con una reducción significativa del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión y ciertos tipos de cáncer **(Qin, Wang & Luo, 2022).** Estos beneficios son atribuidos a sus propiedades nutricionales,

pero también a la presencia de compuestos bioactivos, como los péptidos antioxidantes, que desempeñan un papel esencial en la protección celular frente al daño oxidativo.

El proceso digestivo es fundamental para liberar péptidos bioactivos, y la técnica de electroforesis SDS-PAGE resulta esencial para estudiar cómo las proteínas del concentrado de zambo se modifican durante la digestión gastrointestinal simulada. **(Cienfuegos & Sánchez, 2017).** Los resultados de este tipo de estudios han demostrado que las proteínas sometidas a la digestión pueden generar péptidos con actividades biológicas diversas, como la capacidad antioxidante. Estos péptidos tienen el potencial de neutralizar los radicales libres y proteger al organismo de los efectos del estrés oxidativo, lo que los convierte en candidatos ideales para ser utilizados en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y daño celular **(Samaranayaka & Li-Chan, 2011).**

El interés por los antioxidantes ha aumentado en la industria alimentaria, ya que estos compuestos pueden ser utilizados como conservantes naturales, especialmente si provienen de fuentes económicas y sostenibles como las plantas. Los polifenoles, por ejemplo, son conocidos por sus propiedades antioxidantes y se encuentran en algunas variedades de plantas. Estos compuestos han demostrado ser efectivos para prevenir la peroxidación lipídica, un proceso que contribuye al deterioro de los alimentos y al daño celular en organismos vivos **(Shaker, 2006).** La inhibición de este proceso es crucial, ya que la peroxidación de lípidos puede ser responsable de diversas enfermedades crónicas y degenerativas. Por lo tanto, los hidrolizados proteicos derivados de la pepa de zambo, podrían tener un impacto positivo en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer.

El estudio realizado por **Aguinda (2019)** subraya la importancia de evaluar la actividad biológica de los concentrados proteicos, como en el caso de la harina de chocho, que ha mostrado un valor significativo en términos de actividad antioxidante. Estos resultados sugieren que las proteínas vegetales no solo pueden ser beneficiosa para la salud cardiovascular, sino también para prevenir el desarrollo de enfermedades asociadas con los procesos oxidativos. De manera similar, se espera que los hidrolizados proteicos de la pepa de zambo tenga propiedades antioxidantes que contribuyan a la salud humana, además de ser una fuente accesible y sostenible de proteínas.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es contribuir al conocimiento científico sobre el perfil proteico de la pepa de zambo, evaluando tanto su digestibilidad como la capacidad antioxidante de los péptidos que se liberan durante el proceso de digestión gastrointestinal. Este estudio no solo tiene la intención de ampliar los conocimientos sobre las proteínas vegetales en general, sino también de promover el uso de este

concentrado proteico en la mejora de la nutrición humana, especialmente en la población ecuatoriana. Los resultados de esta investigación podrían abrir nuevas puertas para el desarrollo de productos alimenticios funcionales con propiedades antioxidantes, lo que podría ser beneficioso tanto para la salud pública como para la industria alimentaria.

1.1.2. Concentrados Proteicos

Según **Linden y Loriet (1994),** un concentrado proteico se define como el producto resultante de la separación de los componentes no proteicos de una materia prima, alcanzando un contenido proteico que oscila entre el 25 % y el 89 % de proteína purificada. Este proceso de obtención implica la aplicación de tratamientos de extracción específicos, diseñados para aislar las proteínas de las otras macromoléculas presentes en la materia prima. Actualmente, existen diversos métodos de extracción que se utilizan para este fin, y la selección del procedimiento más adecuado dependerá de varios factores, como los objetivos específicos de la investigación, las características de la materia prima y las propiedades deseadas del producto final.

Una de las principales características de los concentrados proteicos es que, tras el proceso de extracción, estos productos alcanzan un contenido de proteína superior al 80 % en peso seco. Además, el proceso de extracción no solo incrementa la concentración de proteína, sino que también contribuye a la reducción o eliminación de azúcares y otras impurezas, como lo señala **Cárdenas (2016).** Como resultado, los concentrados proteicos obtenidos presentan una proteína de mayor calidad, lo que se traduce en una mejor digestibilidad y una mayor eficiencia en la actividad biológica. Este proceso asegura que las proteínas sean más accesibles y utilizables por los organismos que las consumen, favoreciendo una mejor respuesta metabólica y nutricional.

Esta mejora en la concentración y calidad proteica hace que los concentrados sean especialmente valiosos en diversas aplicaciones industriales, como la alimentación animal, la formulación de suplementos nutricionales, y la elaboración de productos alimenticios funcionales.

1.1.3. Ultracongelación

La ultracongelación es un proceso avanzado de conservación de alimentos que consiste en someterlos a temperaturas extremadamente bajas en un corto período de tiempo, generalmente alrededor de 24 horas, aunque la duración puede variar según el tipo de producto y su estructura interna. Durante este proceso, el objetivo principal es reducir rápidamente la temperatura de los alimentos hasta alcanzar los -18 °C en el centro térmico del producto, lo que asegura que la congelación sea completa **(García et al., 2017).** Esta rapidez en la congelación minimiza la formación de cristales de hielo grandes, los cuales pueden dañar la estructura celular de los alimentos y alterar sus características sensoriales y nutricionales.

Una de las principales ventajas de la ultracongelación es que permite prolongar la vida útil de los alimentos sin que se vean comprometidas sus cualidades organolépticas, como sabor, textura y valor nutritivo. A diferencia de otros métodos de conservación, la ultracongelación mantiene la frescura y la calidad original del alimento durante un periodo prolongado, lo que la convierte en una herramienta eficaz para la industria alimentaria **(Vásquez & Garzón, 2018)**. Además, este proceso se utiliza con frecuencia como etapa previa para otros tratamientos de conservación, como la liofilización, que consiste en eliminar el agua del alimento mediante un proceso de sublimación, lo que contribuye a una conservación aún más prolongada y a la preservación de los nutrientes.

En resumen, la ultracongelación no solo extiende la vida útil de los productos alimenticios, sino que también mejora su seguridad y facilita su transporte y almacenamiento sin que se pierdan las propiedades nutricionales y sensoriales, lo que la convierte en un proceso clave en la cadena de suministro alimentaria moderna.

1.1.4. Liofilización

La liofilización es un proceso avanzado de secado que se basa en la sublimación del agua contenida en el alimento. Este proceso se realiza en condiciones controladas de vacío y temperaturas extremadamente bajas, lo que permite que el agua presente en el alimento pase directamente del estado sólido (hielo) al estado gaseoso, sin pasar por la fase líquida intermedia. Para llevar a cabo la liofilización, es fundamental que el alimento o la matriz esté

previamente congelado, ya que este paso inicial facilita la sublimación del hielo en condiciones de vacío **(Ramírez – Navas, 2006).**

Una de las principales ventajas de la liofilización es que, al evitar el paso del agua por el estado líquido, se conserva la estructura celular del alimento en su forma original, lo que minimiza los daños que pueden ocurrir durante el secado convencional a altas temperaturas. Este aspecto es particularmente importante en la conservación de ciertos alimentos, ya que el proceso de liofilización previene la degradación térmica de compuestos sensibles, como vitaminas, antioxidantes y otras sustancias bioactivas, que pueden descomponerse cuando se exponen a altas temperaturas **(Parzanese, 2012).**

Este método es especialmente relevante en la industria alimentaria, farmacéutica y de biotecnología, donde la conservación de las propiedades nutricionales, sensoriales y funcionales de los productos es fundamental. La liofilización no solo extiende la vida útil de los alimentos, sino que también facilita su transporte y almacenamiento, ya que el agua es removida casi por completo, reduciendo el peso y evitando el crecimiento microbiano. Además, los productos liofilizados pueden rehidratarse fácilmente, recuperando muchas de sus características originales, lo que los hace ideales para una amplia variedad de aplicaciones, desde alimentos deshidratados hasta productos farmacéuticos y suplementos nutricionales **(Jiménez et al., 2017).**

1.1.5. Simulación de la digestión gastro intestinal *in vitro*

La digestión gastrointestinal es un proceso mediante el cual los nutrientes presentes en los alimentos ingeridos se transforman en componentes absorbibles en el intestino delgado. Este procedimiento es complejo, y al replicar sus diferentes fases mediante digestión *in vitro*, se busca simular las condiciones de cada etapa (gástrica e intestinal) con sus respectivas concentraciones de pH. Para lograrlo, se preparan fluidos con concentraciones salinas y enzimáticas específicas que permiten una representación precisa del proceso digestivo **(Asensio, 2021).**

1.1.5.1. Digestión gástrica y duodenal in vitro

La simulación gastro-duodenal es un proceso que recrea las etapas de la digestión gástrica y duodenal, con el objetivo de imitar las condiciones fisiológicas del tracto digestivo

humano. Este método se lleva a cabo utilizando enzimas digestivas específicas que actúan de manera similar a las que se encuentran en el sistema digestivo humano, y toma en cuenta una serie de factores clave que influyen en la digestión, como la temperatura, el pH y el tiempo de exposición. La recreación de estas condiciones permite evaluar de manera precisa cómo los alimentos o los ingredientes nutricionales son descompuestos y absorbidos en el cuerpo **(Ménard et al., 2014).**

1.1.6. Actividad antioxidante

Los compuestos antioxidantes son moléculas bioactivas que tienen la capacidad de prevenir la oxidación de biomoléculas esenciales, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estos compuestos actúan neutralizando los radicales libres, que son especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas de manera natural durante los procesos metabólicos, pero que, en exceso, pueden causar daño celular y molecular. La importancia de los antioxidantes radica en su capacidad para proteger al organismo de los efectos perjudiciales de estos radicales libres, los cuales están involucrados en el envejecimiento celular, el desarrollo de enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, entre otras **(Naranjo, Vélez y Rojano, 2011).**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante de los concentrados proteicos de la pepa de zambo (*Cucurbita ficifolia* B.) tras la simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro.*

1.2.2. Objetivos Específicos

- Analizar la hidrólisis de las proteínas a nivel gástrico y duodenal mediante electroforesis en condiciones reductoras.
- Cuantificar la actividad antioxidante de los digeridos obtenidos después de la simulación gastrointestinal.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1 Materia prima

- Concentrados proteicos pepa de zambo

2.1.2 Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado
- Sulfato de potasio
- NaOH 0.1 M
- Alcohol etílico 90%
- Cloruro de sodio
- Citrato de sodio
- Agua destilada
- NaOH 2N
- HCl 2N
- HCl concentrado
- Etanol 80%
- HNO3 0.14 M
- Bicarbonato de sodio
- Pepsina gástrica
- Sales
- Acrilamida
- SDS
- Temed
- PSA
- Azul de coomasie
- Metanol 70%
- Pancreatina (100U/mg)
- Bilis
- Cloruro de sodio 90%
- ABTS

- Persulfato de potasio
- Fosfato monobásico
- Fosfato dibásico
- Trolox
- TRIS
- Glicerina
- SDS
- Azul de comassie
- Poliacrilamida
- Persulfato de amonio
- Glicerol

2.1.3 Material fungible

- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Vasos de precipitación
- Fundas ziploc
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon
- Frascos ámbar
- Frascos de tapa azul
- Espátula

2.1.4 Equipos

- pH metro
- Vortex
- Microincubadora con agitación
- Centrífuga
- Plancha de calentamiento

- Baño María
- Balanza analítica
- Equipo liofilizador
- Ultra congelador
- Refrigeradora
- Congelador
- Cámara de electroforesis
- Sonorizador

2.2. Métodos

2.2.1. Simulación de la digestión gastrointestinal in vitro

Se utilizó la metodología sugerida por **Vilcacundo et al (2018)** donde se estableció las siguientes condiciones:

En primera instancia se elaboraron dos tipos de fluidos, uno gástrico (SGF), y uno intestinal (SIF), preparándose previamente las sales como se observa en la **Tabla 1**:

Tabla 1.

Volúmenes utilizados en la preparación de simulación gástrica e intestinal.

Reactivos	**Concentración**	**Peso del reactivo (g)**	**Peso de agua destilada (ml)**	**Elaboración del fluido SGF (ml)**	**Elaboración del fluido SIF (ml)**
KCl	0.5 M	7.456	200	6.9	6.8
KH_2PO_4	0.5 M	6.804	100	0.9	0.8
$NaHCO_3$	1 M	16.802	200	12.5	42.5
NaCl	2 M	23.378	200	11.8	9.6
$M_gCl_2(H_2O)_6$	0.15 M	1.525	50	0.4	1.1
$(NH_4)_2CO_3$	0.5 M	2.4025	50	0.5	-
$CaCl_2(H_2O)_2$	0.3 M	2.205	50	-	-
HCl	1 M		100	-	-
NaOH	1 M		100	-	-

Nota: se tomó 250 ml de agua destilada, se agregaron las sales para SGF y SIF en frascos de 1000 ml y se completó un volumen de 400 ml con agua destilada para finalmente llevar los fluidos a congelación (-20°C).

2.2.1.1 Digestión gástrica

Se inició la digestión gástrica pesando 520 mg de concentrados proteicos obtenidos por **Nuñez (2024)** en su proyecto de investigación de obtención de concentrados proteicos de la pepa de

zambo, se utilizaros los concentrados obtenidos a pH de solubilización 12 y pH de precipitación 5 con una concentración de proteína de 81.86% los cuales se disolvieron en 5 ml de agua destilada en un tubo falcon de 15 ml, previamente se calentó el fluido gástrico a 37 °C en baño maría, a los 5 ml de muestra se agregó 3.57 ml de SGF y 2.5 µl de $CaCl_2(H_2O)_2$ 0.3 M, a esta primera mezcla se midió el pH y se lo llevó a pH 1.2 con 1.1 ml de HCl 1M, se agregaron 0.43 ml de la enzima pepsina a concentración 2000 U, disuelta en SGF previamente calentado (40 mg de pepsina en 2.5 ml de SGF). Las muestras se llevaron a un equipo denominado orbital (eppendorf 1.5 ml) a una temperatura de 37°C por 120 min a 300 RPM, posteriormente se llevó a pH 7 con $NaHCO_3$ y se desactivó las enzimas en baño maría a 80°C durante 3 minutos. Finalmente, se congeló a -20°C 2.5 ml de digerido gástrico, y los 7.5 ml restantes se utilizaron para continuar con la simulación de la digestión intestinal.

Se realizó el mismo procedimiento para pH 3.2 y 3.5.

2.2.1.2 Digestión intestinal

Se procedió con los 7.5 mL restantes de la muestra obtenida de la digestión gástrica conservada en un tubo falcon de 15 ml, previamente se calentó 15 ml de SIF a 37°C, posteriormente se tomó 4.70 ml de fluido intestinal y se le añadió 15 µl de $CaCl_2(H_2O)_2$ 0.3 M al tubo falcon, se midió su pH y se lo llevó a 7 con 0.6 ml de NaOH 1M, luego se añadió 1.25 ml de solución de bilis (1g de bilis en 5 ml de agua destilada) y por último se agregó 4.80 ml de solución de pancreatina (1.5 g de pancreatina disuelta en 2.525 ml de SIF previamente calentado), esta mezcla se llevó al orbital (utilizando eppendorfs de 1.5 ml) a una temperatura de 37°C por un tiempo de 120min a 300 rpm, una vez finalizado este tiempo se llevó a baño maría la muestra durante 3 min a 80°C para inactivar las enzimas y llevar a ultra congelación.

Por último, se realizó un blanco, es decir se siguió todo el procedimiento de digerido gástrico e intestinal sin la muestra a analizar (concentrado proteico).

Todas las muestras se llevaron a un proceso de liofilización durante 48 horas y una vez finalizado este tiempo se almacenaron en ultra congelación a -80°C.

2.2.2. Determinación de la hidrólisis por Electroforesis SDS-PAGE

Para la determinación de la hidrólisis de la proteína tras el proceso de digestión gastro duodenal del concentrado proteico de la pepa de zambo se utilizó la técnica analítica de electroforesis con gel de poliacrilamida (PAGE).

Las muestras de los digeridos fueron expuestas en un campo eléctrico constante de 200 V durante 45 minutos utilizando un equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean, una vez transcurrido el tiempo los geles se introdujeron con cuidado en un recipiente de plástico en una solución de azul de comassie hasta que estén completamente cubiertos y se lo dejó toda la noche.

Se lavó el gel con agua destilada y se lo colocó en una solución decolorante con agitación hasta que se observó únicamente las bandas del gel teñidas, finalmente se observó en el fotodocumentador las bandas obtenidas para fotografiar el gel con el patrón de las proteinas resultantes.

Preparación de los geles

Se inició con la preparación de los geles de resolución (12%) y apilamiento (4%), los cuales se realizaron de acuerdo con la siguiente tabla

Tabla 2. Volúmenes utilizados en preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivo	Gel 12%	Gel 4%
Agua destilada	2.8 ml	3 ml
Poliacrilamida 30%	3.2 ml	1 ml
Tris 1.5m pH 8.8	2 ml	1 ml
SDS 10%	80 µl	80 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl	100 µl
Temed	20 µl	20 µl

Nota: En el primer pocillo se colocó la muestra estándar o Lader de 250 kD de la marca Precision Plus Protein Dual Xtra Standards de BIO - RAD con masas moleculares de proteinas conocidas para contrastar con las muestras cargadas.

Buffer running: 3 g Tris-HCl; 15 g glicina; 1 g de SDS; 1000 mL H2O destilada.

Se prepararon las placas de vidrio perfectamente limpias colocándolas en su soporte y se verificó que no existan fugas con la ayuda de agua destilada.

A partir del borde superior del vidrio se midió 1.5 cm hacia abajo y se colocó una marca para indicar hasta donde llegaría el gel de resolución, una vez ya sujetadas correctamente las placas se las llenó primero con el gel de resolución, y después de 4 minutos, una vez que su gelificación fue correcta

se añadió el gel de apilamiento con el uso de una peinilla para dejar definidas las celdas en las que se cargó las muestras.

Una vez gelificados de manera correcta, se colocaron en la cámara de electroforesis y se añadió una solución buffer running. Posteriormente de cargaron 10 µl de cada muestra preparada dentro de cada pocillo.

Preparación de las muestras

Para realizar la electroforesis de las muestras liofilizadas principalmente se pesaron 20 mg del digerido gástrico e intestinal de los concentrados proteicos para cada pH (1.2, 3.2, 3.5) en tubos eppendorf, se añadió 1 mL de agua destilada y se agitó en un vortex durante 1 minuto hasta disolver la muestra. Posteriormente se tomaron 200 µl de la solución obtenida y se agregaron 200 µl de solución buffer de muestra, se agitaron durante 1 minuto en el vortex y finalmente se colocaron en un termobloque a condiciones de 90 °C a 450 rpm durente 10 minutos.

Buffer de muestra: 4.8 mL agua destilada, 2 mL Tris – HCl 1M pH 6.8, 1 mL de glicerol puro, 2 mL SDS 10%, 0,6 mL β-mercaptoetanol, 0.1 g de azul de bromofenol.

2.2.3. Actividad antioxidante

Para la preparación de las muestras se pesaron aproximadamente 300 mg de las muestras de fluido intestinal liofilizadas a pH 1.2, 3.2, 3.5, posteriormente se colocó una solución de metanol al 70% a todas las muestras y se agitó con la ayuda de un magneto durante 10 minutos, una vez transcurrido este proceso se llevaron las muestras a un proceso de sonificación en agua destilada durante 10 minutos, una vez transcurrido ese tiempo se realizó un proceso de centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se llevó a un balón de aforo de 25 ml y al sedimento se le repitió todo el proceso nuevamente hasta conseguir que el sobrenadante sea transparente.

Una vez que se consiguió llegar al volumen indicado las muestras se guardaron en refrigeración a 5 °C.

En la preparación de reactivos se inició con la solución activada ABTS en la cual se mezcló el reactivo ABTS con persulfato de potasio en una relación 1:1 y se almacenó durante 16 horas en refrigeración (5 °C). Transcurrido el tiempo se preparó la solución de trabajo, para la cual se mezcló la solución activada con tampón fosfato de sodio a pH 7.05.

Para iniciar las mediciones se ajustó la solución activada de ABTS a una absorbancia de 1.1 utilizando buffer tampón fosfato de sodio a una longitud de onda de 734 nm.

Se realizó la curva de calibración utilizando un estándar conocido, Trolox de 1000 µmol/L, en microtubos eppendorf de 1.5 ml se colocó 200, 300, 400, 500, 600 y 800 µl de solución estándar y se añadió 90 µl de ABTS activado, se dejó reposar en un lugar oscuro durante 45 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro modelo NanoDrop One, **(Figura 16)** este proceso se realizó por triplicado.

Con las muestras preparadas al principio, una vez finalizado el tiempo de espera se realizó la reacción, tomando 950 µl de la solución de trabajo con 50 µl de la muestra por triplicado, se puso en el vortex y se almacenó en un lugar oscuro durante 45 minutos, una vez transcurrido el tiempo se realizaron las mediciones por triplicado a una longitud de onda de 734 nm.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Electroforesis SDS-PAGE

La técnica de electroforesis SDS-PAGE es ampliamente utilizada para la separación de proteínas en función de su peso molecular. En la Figura 1, la primera columna corresponde a un marcador molecular (Ladder) que incluye proteínas de peso molecular conocido, en un rango de 2 kDa a 250 kDa. Las columnas restantes muestran los resultados de las muestras sometidas a la simulación gástrica e intestinal del concentrado proteico.

Tras realizar la digestión gástrica a diferentes valores de pH (1.2, 3.2 y 3.5), se pueden observar proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 5 kDa y 32 kDa, evidentes en las columnas 2, 3 y 4 de la Figura 1. Este análisis demuestra la presencia de distintas proteínas con pesos moleculares de 5 kDa, 6 kDa, 13 kDa, 17 kDa, 18 kDa, 21 kDa y 32 kDa. Los resultados sugieren una hidrólisis parcial de las proteínas presentes en el concentrado al comparar con los resultados reportados por **Nuñez, (2024),** en el que se observan aproximadamente 10 proteínas presentes en el concentrado proteico; esta hidrolisis parcial se atribuye a la acción de la enzima pepsina que fragmenta las proteínas en estructuras más pequeñas, además se evidencia la influencia del pH del medio (ver Figura 1) **(Manrique et al., 2020).**

González et al. (2009) destacan que las semillas oleaginosas contienen dos tipos principales de proteínas de almacenamiento: albúminas y globulinas. Las albúminas, caracterizadas por su bajo peso molecular, presentan un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 2S. Por otro lado, las globulinas, que poseen un peso molecular más elevado, presentan coeficientes de sedimentación entre 7S y 11S.

Estos hallazgos refuerzan la idea de que las condiciones de digestión simulada influyen directamente en el grado de hidrólisis proteica y en la liberación de fragmentos peptídicos de diferentes tamaños. La identificación de estos péptidos podría ser clave para comprender sus propiedades funcionales, como la actividad antioxidante o bioactividad específica, y abre posibilidades para su aplicación en alimentos funcionales o suplementos.

Rezig et al. (2013) en su estudio sobre la variedad *Cucurbita máxima*, reafirma lo citado anteriormente, puesto que las proteínas extraídas de las semillas de sambo incluyen tanto albúminas como globulinas, las cuales presentan subunidades con distintos pesos moleculares.

Las investigaciones sobre los concentrados proteicos de las semillas de *Curcubita sp,* han determinado mediante la técnica de electroforesis bandas cuyos pesos moleculares se encuentran entre 25 kDa y 37 kDa, otras entre 20 kDa y 25 kDa, y algunas que se aproximan a 10 kDa, es decir los resultados obtenidos de la

digestión gástrica de la presente investigación, guardan relación con lo reportado por **Coskun & Gulseren (2020).**

Sin embargo, a pesar de que se observan bandas definidas de baja (< 21 kDa) y mediana intensidad (21 kDa a 32 kDa), también se aprecian bandas no definidas como en la columna 2 correspondiente al simulado gástrico a pH 1.2, con pesos moleculares entre 5 kDa y 13 kDa, la tercera columna (pH 3.2) entre 6 kDa y 17 kDa, y la cuarta columna (pH 3.5) entre 6 y 17 kDa.

Según **Vilcacundo et al. (2018)**, este resultado puede atribuirse a una hidrólisis incompleta durante la digestión gástrica, ya que los concentrados proteicos no logran transformarse completamente en estructuras peptídicas funcionales. Esto se debe a la especificidad de la enzima proteolítica empleada, la pepsina, que actúa principalmente sobre enlaces peptídicos formados por aminoácidos aromáticos, como fenilalanina (PHE), tirosina (TYR) y triptófano (TRP).

Además, la estructura tridimensional de las proteínas presentes en los concentrados, particularmente albúminas y globulinas, contribuye a esta resistencia a la hidrólisis. Las albúminas y globulinas, caracterizadas por sus alfa hélices y hoja beta, presentan una configuración estable que dificulta la acción enzimática de la pepsina. Este tipo de estructuras requieren condiciones o enzimas adicionales para romperse completamente **(Flores, 2024).**

Otra posible razón para la hidrólisis parcial observada es la naturaleza del proceso digestivo en el organismo. En el tracto intestinal, la digestión proteica involucra la acción conjunta de varias enzimas, como la tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasas, que trabajan de manera secuencial y complementaria para lograr una hidrólisis completa de las proteínas. Al simular únicamente la fase gástrica, no se contó con estas enzimas adicionales, lo que limitó la extensión de la hidrólisis. Por esta razón, fue necesario completar la digestión simulada con una etapa intestinal para obtener una mayor hidrólisis de las proteínas **(Conde, 2019).**

Estos resultados subrayan la complejidad de los procesos de digestión proteica y la importancia de replicar condiciones que reflejen el entorno completo del tracto gastrointestinal. Además, resaltan la especificidad enzimática y las propiedades estructurales de las proteínas como factores clave que determinan la eficiencia de su descomposición en péptidos funcionales.

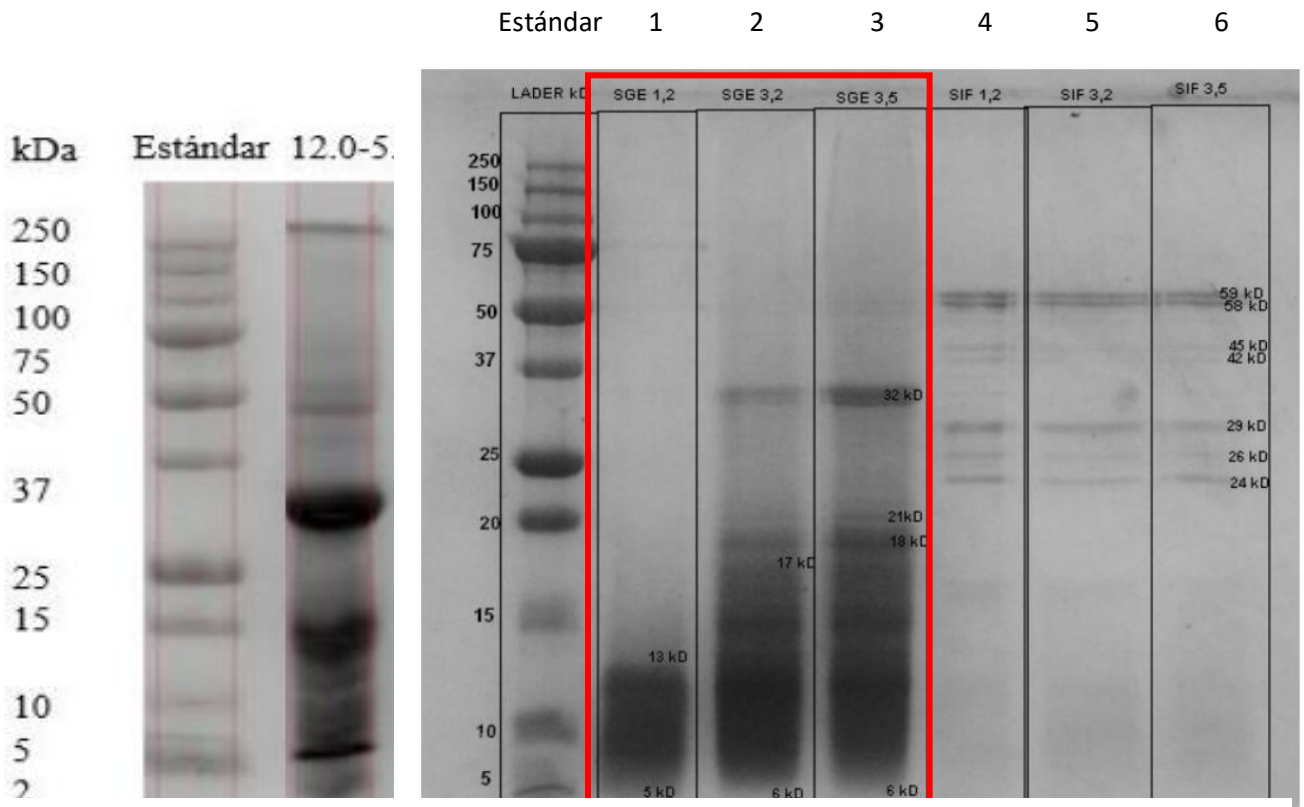


Figura 1. Caracterización de los digeridos de los concentrados proteicos de la pepa de zambo, post digestión gástrica *in vitro* por Electroforesis SDS-PAGE

Fuente: Nuñez, 2024.

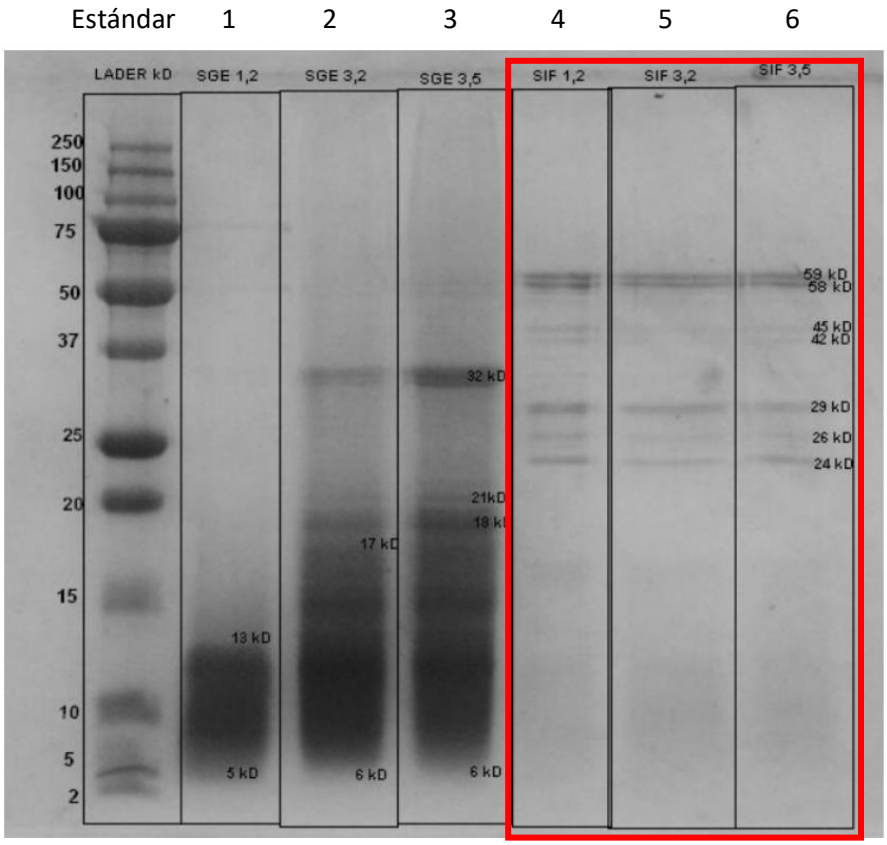
Fuente: Laboratorio de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Después de la simulación gástrica, se procedió a realizar la digestión intestinal, que es una fase crucial del proceso digestivo en el que intervienen otros componentes como las sales biliares y la pancreatina. La pancreatina es una mezcla de enzimas digestivas que incluyen amilasas, lipasas y proteasas, cada una encargada de descomponer los diferentes macronutrientes presentes en los alimentos. Las amilasas son responsables de la hidrólisis de los carbohidratos, las lipasas actúan sobre las grasas, y las proteasas desempeñan un papel fundamental en la degradación de las proteínas **(Armenta, 2014).** Para este estudio, la degradación de las proteínas es un proceso de particular interés debido a que se está evaluando el concentrado proteico extraído de las semillas de zambo. En este contexto, las proteasas involucradas en la

hidrólisis de las proteínas durante la digestión intestinal son principalmente la tripsina y la quimotripsina, aunque otras enzimas también contribuyen a la ruptura de las estructuras proteicas.

En la **Figura 2**, se muestran los resultados de la simulación de la digestión intestinal. En las columnas 5, 6 y 7, que corresponden a los pH 1.2, 3.2 y 3.5 de digestión gástrica respectivamente, se observan bandas de mediana densidad. Estas bandas, con pesos moleculares que oscilan entre 24 kDa y 59 kDa, corresponden a las enzimas presentes en la pancreatina que se empleó en la digestión intestinal. Este hallazgo es consistente con lo reportado por **Vilcacundo et al. (2018)**, quienes también observaron la presencia de bandas con estos rangos de peso molecular en la digestión de concentrados proteicos. Es importante señalar que estas bandas no se observan en la simulación de la digestión gástrica, lo que indica que no están relacionadas con la proteína analizada ni con los compuestos presentes en la fase gástrica. Este resultado refuerza la hipótesis de que las enzimas pancreáticas son las principales responsables de la hidrólisis final de las proteínas durante la fase intestinal.

De esta manera, tras completar el proceso digestivo, se puede concluir que los concentrados proteicos de la semilla de zambo experimentan una hidrólisis total. Este proceso de hidrólisis es clave para la liberación de péptidos bioactivos y aminoácidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el organismo, mejorando así la calidad nutricional de los concentrados proteicos derivados de esta semilla. Además, los productos de esta hidrólisis, como los péptidos pequeños, pueden tener propiedades bioactivas beneficiosas como la capacidad antioxidante, lo cual aumenta el valor funcional de la pepa de zambo como un ingrediente alimentario.



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

Figura 2. Caracterización de los digeridos de los concentrados proteicos de la pepa de zambo, post digestión gastro-intestinal *in vitro* por Electroforesis SDS-PAGE

Una vez que se realizó la digestión gastrointestinal se evaluó la actividad antioxidante con el método ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil bebzotiazolin-6-sulfonato de amonio) el cual se basa en cuantificar la capacidad antioxidante total, mediante la perdida de color del radical $ABTS^{+}$, es decir se mide la capacidad de reducción de $ABTS^{+}$ a ABTS, en presencia de un agente antioxidante.

Como se detalla en la **Tabla 3**, los valores correspondientes a los diferentes pH a los que fueron sometidas las muestras digeridas presentan una variación mínima entre sus lecturas iniciales. Para validar esta observación, se realizaron las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, cuyos resultados se presentan en la sección anexos en las **Tablas 4 y 5**. En este caso, el análisis de ANOVA reveló que al menos uno de los grupos presenta diferencias significativas en sus medias, lo que llevó al rechazo de la hipótesis nula y a la aceptación de la hipótesis alternativa. Posteriormente, la prueba de Tukey confirmó estas diferencias, identificando específicamente a la muestra de digestión intestinal a pH 3.2 como significativamente diferente en comparación con las otras muestras.

Estos resultados ponen de manifiesto la sensibilidad de la actividad antioxidante a cambios en las condiciones de pH, especialmente bajo simulaciones de procesos digestivos. La diferencia observada entre las muestras de digeridos intestinales de pH 3.2 y pH 3.5 podría estar relacionada con alteraciones en la estructura química de los compuestos antioxidantes, como los péptidos que responden de manera diferencial a variaciones en la acidez del medio.

Por otro lado, **Benítez et al. (2014)** señalan que la actividad antioxidante de una muestra no se debe únicamente a la suma de las actividades individuales de los diferentes compuestos que la conforman. Este fenómeno está intrínsecamente relacionado con el entorno en el que ocurre la reacción antioxidante, el cual puede influir de manera decisiva en el comportamiento de los compuestos presentes. En ciertos casos, este entorno puede potenciar la actividad antioxidante mediante efectos sinérgicos, donde la interacción entre los compuestos resulta en un efecto mayor al esperado. Por el contrario, también pueden ocurrir interacciones inhibitorias, donde algunos compuestos disminuyen o anulan la actividad antioxidante de otros.

Este concepto resalta la complejidad de los sistemas antioxidantes y subraya la importancia de evaluar no solo los componentes individuales, sino también su interacción en contextos específicos. Factores como el pH, la presencia de otros reactivos, la temperatura y la polaridad del medio pueden influir significativamente en las reacciones antioxidantes. Por lo tanto, comprender el ambiente en el que se lleva a cabo la reacción es fundamental para interpretar y optimizar el comportamiento antioxidante de una muestra (**Muñoz et al., 2010)**.

Estos hallazgos tienen implicaciones importantes tanto en el diseño de alimentos funcionales como en el desarrollo de estrategias para maximizar los beneficios antioxidantes en aplicaciones industriales o terapéuticas. Analizar las interacciones sinérgicas o inhibitorias puede ser clave para mejorar la eficacia de antioxidantes naturales o sintéticos en distintos sistemas.

Según **Karamác et al. (2013)** en su investigación señala que la actividad antioxidante luego de utilizar pancreatina durante la digestión de las proteínas muestra mejores resultados; en este estudio se puede confirmar aquello, ya que los datos obtenidos dan valores significativos de actividad antioxidante.

Tabla 3.

Resultados de la Actividad Antioxidante (ABTS) post digestión gastro-intestinal

Muestras	Nivel de pH	µmol ET /g
Digeridos gastro – intestinales del concentrado proteico de la pepa de zambo	1.2	$263.5^{b} \pm 5.00$
	3.2	$275.57^{a} \pm 2.26$
	3.5	$259.94^{b} \pm 5.04$

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

Resultados expresados con su desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) a diferentes pH de digestión gástrica, Test de Tukey

El análisis realizado revela que el concentrado proteico hidrolizado de la pepa de zambo a pH 3.2 presentan una actividad antioxidante significativa, con un valor de 275,57 µmol ET/g. Este resultado supera notablemente el valor reportado por **Espín (2016)** para el tomate de árbol, cuya actividad antioxidante alcanza los 202 µmol ET/g, al igual que otras frutas comúnmente consumidas, como la pera (3 µmol ET/g), el aguacate (1 µmol ET/g) y el higo (4 µmol ET/g) **(García et al., 2004)**. Esto evidencia los beneficios que los concentrados proteicos de la pepa de zambo pueden aportar a la dieta humana, gracias a su contenido de péptidos antioxidantes.

La actividad antioxidante de los concentrados proteicos podría aumentar tras ser sometido a un proceso de hidrolisis, este fenómeno es consistente con hallazgos previos, como el estudio de **Avilés et al. (2021),** que evidenció un comportamiento similar en hojas de moringa. Dicho incremento se atribuye a la liberación de péptidos con propiedades antioxidantes, los cuales se generan durante la ruptura enzimática de las proteínas.

El proceso de hidrólisis permite fragmentar las proteínas en compuestos más pequeños y funcionales, lo que puede potenciar sus propiedades antioxidantes al exponer grupos funcionales previamente inaccesibles, es decir, posterior al fraccionamiento de las proteínas en péptidos de menor tamaño. Este mecanismo no solo subraya el valor biológico de los concentrados proteicos de la pepa de zambo, sino que también abre nuevas perspectivas para su aplicación en la formulación de alimentos funcionales o suplementos nutricionales con propiedades antioxidantes mejoradas. Además, estos resultados refuerzan la importancia de optimizar los procesos de hidrólisis para maximizar la liberación de péptidos bioactivos en diversos recursos alimenticios.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* permitió evaluar la digestibilidad del concentrado proteico de la pepa de zambo (*Cucurbita ficifolia* B.). La acción de la enzima pepsina hidrolizó parcialmente las proteínas durante la fase gástrica, mientras que en la fase duodenal las proteínas fueron hidrolizadas totalmente debido a la actividad de la pancreatina.

- Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los digeridos, encontrando que el valor más alto (275.57 ± 2.26 μmol ET/g) corresponde al digerido a pH 3.2. Este resultado indica que la digestión gastrointestinal simulada potencia la liberación de péptidos con propiedades antioxidantes, subrayando la importancia del pH en la efectividad del proceso digestivo.

- El concentrado proteico de la pepa de zambo (*Cucurbita ficifolia* B.) tras su hidrólisis presentó actividad antioxidante, por lo cual puede ser considerado como un ingrediente para el desarrollo de productos alimenticios con características saludables para el consumidor.

4.2. Recomendaciones

- Realizar estudios de otras actividades biológicas que permitan tener un conocimiento más amplio de los beneficios de los concentrados proteicos de la pepa de zambo en la salud de las personas.
- Utilizar los concentrados en la formulación de productos y suplementos alimenticios y estudiar la capacidad antioxidante del producto terminado.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aguinda, A. (2019). *Determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de aislados proteicos de harina de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) y su digestibilidad gastrointestinal in vitro*. https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/29418

Armenta, T. L. (2014). *Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antioxidante de péptidos bioactivos sometidos a digestión gastrointestinal simulada* (Doctoral dissertation, Tesis de posgrado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC Hermosillo–Sonora).

Asensio, A., Calvo, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2021). Simulación In Vitro De La Digestión Gastrointestinal De Alimentos.

Avilés-Gaxiola, S., León-Félix, J., Jiménez-Nevárez, Y. B., Angulo-Escalante, M. A., Ramos-Payán, R., Colado-Velázquez, J., & Heredia, J. B. (2021). *Antioxidant and anti-inflammatory properties of novel peptides from Moringa oleifera Lam*. leaves. South African Journal of Botany, 141, 466–473. https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2021.05.033

Benítez Cruz, G., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. (2014). Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones biológico/preventivas.

Cárdenas, M. (2016). *Obtención de aislados proteicos de chía (Salvia hispánica L.) y evaluación in vitro de su digestibilidad gastrointestinal, actividad antiinflamatoria y antioxidante (Tesis de grado).* Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.

Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, *13*(2), 109-122.

de Cienfuegos Rodríguez, A. Á., & Sánchez, M. I. T. (2017). Electroforesis de proteínas plasmáticas: proteinograma. *Revista de la SVR: Sociedad Valenciana de Reumatología*, *7*(1), 5-7.

Conde Rivas, J. O. (2019). *Identificación de péptidos bioactivos generados durante la digestión gastrointestinal in vitro de proteínas de jalea real.*

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

Craig, W. 1999. Helth-promotingproperties of common herbs. Am J Clin Nutr., 70: 491-495

Duliński R, Cielecka EK, Pierzchalska M & Żyła K, (2015). Phytases Improve Myo-Inositol Bioaccessibility in Rye Bread: A Study Using an In Vitro Method of Digestion and a Caco-2 Cell Culture Model. Food TechnolBiotechnol 53(1):66–72.

Espín, S., Gonzalez-Manzano, S., Taco, V., Poveda, C., Ayuda-Durán, B., Gonzalez-Paramas, A., Santos-Buelga, C. (2016). *Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (Solanum betaceum Cav.).* Food Chemistry. 1073–1080

Flores Huaraca, C. A. (2024). Perfil electroforético de globulinas y albúminas en dos variedades de semilla de Amaranthus caudatus (Oscar Blanco, INIA 414-Taray). Ayacucho 2021.

García-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). *Evaluation of the antioxidant properties of fruits*. Food Chemistry, 84(1), 13–18. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00160-2

García, R. J., Pinto, A. D., Rengel, J. E., Torres, J. M., González, J. A., & Pérez, N. A. (2017). Design of fuzzy control strategy applied to food process deep freeze. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, *25*(1), 70–84.

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

Jiménez Barrueta, A., Pardo Saldaña, J. E., & Valverde Lara, S. (2017). Producción de café soluble por el método de liofilización.

Karamać, M, Kulczyk, A, Sulewska, K. (2013). Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. Department of Chemical and Physical Properties of Food, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10–748 Olsztyn, Poland. DOI: 10.2478/pjfns-2013-0023.

Linden, G., & Loriet, D. (1994). Bioquímica Agroindustrial.

Manrique, K., Intiquilla, A., Palma-Albino, C., Jiménez-Aliaga, K., Zavaleta, A. I., Izaguirre, V., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Actividad antioxidante e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de hidrolizados proteicos de Lupinus mutabilis (Tarwi).

Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamics system to simulate infant digestion. Food Chemistry, 15(145), 1039-1045.

Muñoz Jáuregui, A., Ramos Escudero, F., Ortiz-Ureta, C. A., Castañeda Castañeda, B., Barnett Mendoza, E., Yáñez Farfán, J., & Cajaleón Asencios, D. (2010). Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *76*(3), 234-241.

Naranjo, Mauricio, Vélez, Luz T, & Rojano, Benjamín A. (2011). Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *16*(2), 164-173.

Nuñez, E. (2024). Identificación de proteínas en concentrados de las semillas de sambo (*Cucurbita ficifolia B.).* Universidad Técnica de Ambato.

Parzanese, M. (2012). Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos. *Alimentos Argentinos*, 1–12. www.alimentosargentinos.gob.ar

Qin, P., Wang, T., & Luo, Y. (2022). A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, *7*, 100265. Revisado el 29 de marzo de 202. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265

Ramírez-Navas, J. S. (2006). *Liofilización de alimentos*. Revista ReCiTeIA.

Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarrondo, 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

Samaranayaka, A.G.P., & Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J Func Foods, 3(4), 229-254. http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006

Shaker, E. 2006. Antioxidative effect of extracts from red grape seed and Peel on lipid oxidation in oils of sunflower. LWT. 39:883–892

Singh, R., K. Chidambara y G. Jayaprakasha. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. Food Chem., 50:81-86

Vásquez, S. T. Q., & Garzón, M. A. B. (2018). La ultra congelación como método de preservación y conservación de la granadilla (Passiflora ligularis juss). *Revista tecnología y productividad*, *4*(4), 195-204.

Vilcacundo, R., Miralles, B., Carrillo, W., & Hernández-Ledesma, B. (2018). In vitro chemopreventive properties of peptides released from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*,105, 403-411.

Yadegarinia, D., L. Gachkar, M. Bagher, M. Taghizadeh, S. Alipoor e I. Rasooli. 2006. Biochemical Activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. Phytochemistry. 67:1249-1255.

ANEXOS

Anexo 1. *Fotografías de la práctica*



Figura 3. Peso del concentrado proteico



Figura 4. *Inicio del proceso gástrico*



Figura 5. *Mediciones de pH fase gástrica*



Figura 6. *Ajuste de pH fase gástrica*



Figura 7. *Pesaje enzima pepsina*

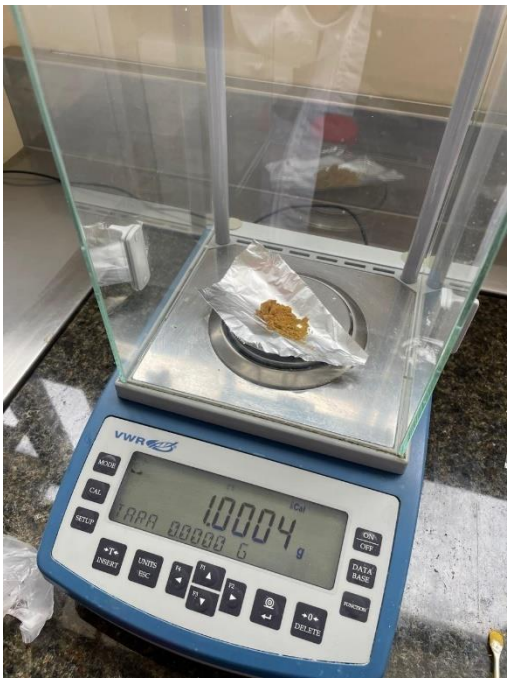


Figura 8. *Pesaje de bilis*



Figura 9. *Digestión intestinal*



Figura 10. *Ultracongelación de muestras*



Figura 11. *Liofilización de muestras*



Figura 12. *Pesaje de muestras para actividad antioxidante*



Figura 13. *Proceso de sonificación*



Figura 14. *Centrifugación de muestras*

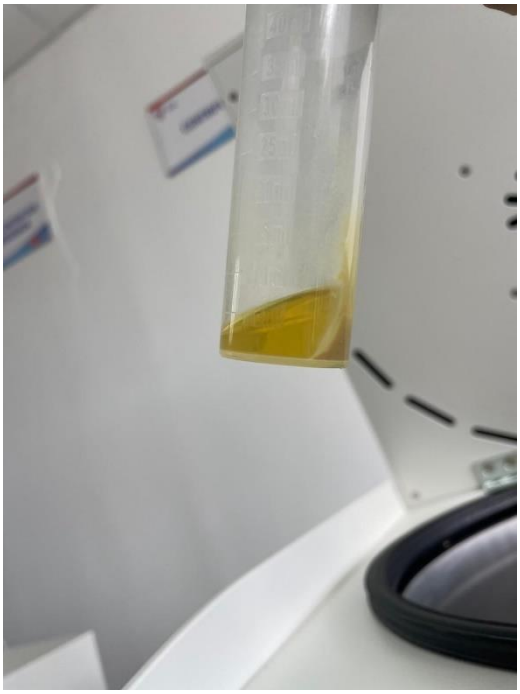


Figura 15. *Recolección de sobrenadante*

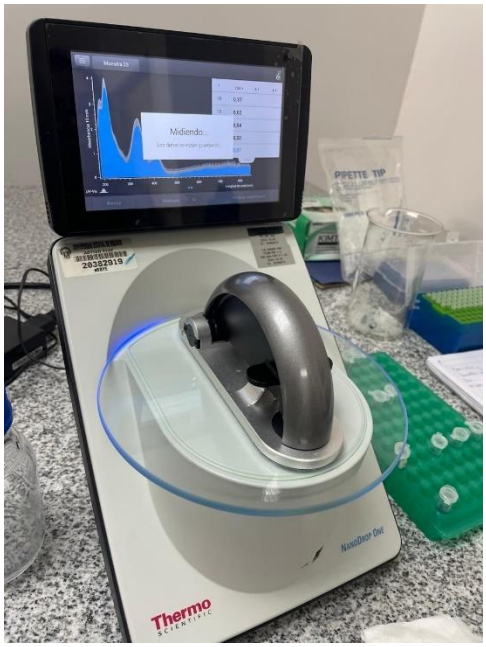


Figura 16. *Medición absorbancia para actividad antioxidante*



Figura 17. *Pesaje de muestras para electroforesis*



Figura 18. *Preparación de geles*



Figura 19. *Preparación muestras para electroforesis*



Figura 20. *Cámara de electroforesis*



Figura 21. *Tinción del gel de electroforesis*

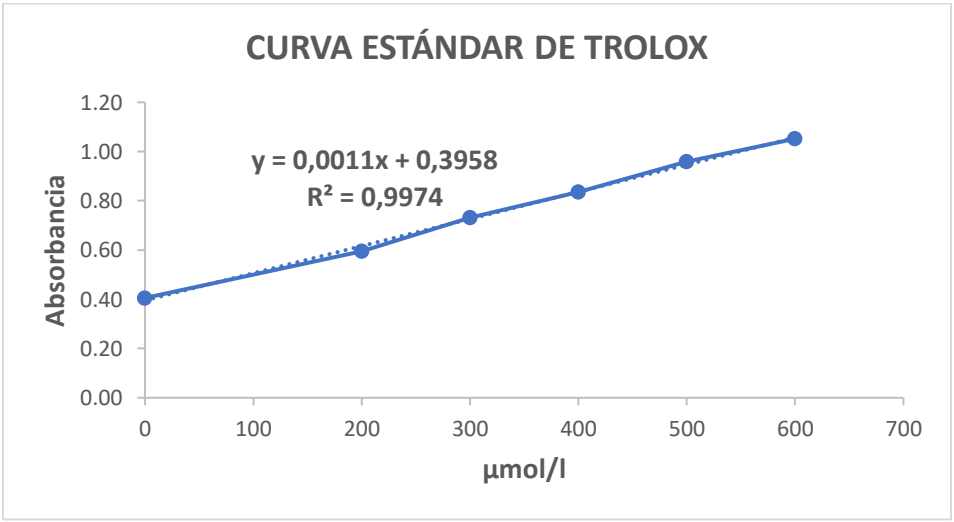


Figura 22. *Curva de calibración de trolox*

Anexo 2. Pruebas estadísticas

Tabla 4.

Prueba de ANOVA

Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
545.018	2	272.509	13.394	.006
122.072	6	20.345		
667.090	8			

Elaborado por: Espín Valeria

Tabla 5.

Prueba de Tukey

(I) pH		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1.20	3.20	-10.01333	3.68287	.077	-21.3134	1.2867
	3.50	9.04000	3.68287	.108	-2.2601	20.3401
3.20	1.20	10.01333	3.68287	.077	-1.2867	21.3134
	3.50	19.05333*	3.68287	.005	7.7533	30.3534
3.50	1.20	-9.04000	3.68287	.108	-20.3401	2.2601
	3.20	-19.05333*	3.68287	.005	-30.3534	-7.7533

Elaborado por: Espín Valeria