

# **UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES  
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



---

## **OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA DE LAS SEMILLAS DE HUINGO (*Crescentia cujete L.*)**

---

Tesis para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Agroindustrial

**HANY STEFFANI RAMIREZ ORSI**

**ELIZABETH ESPINOZA VASQUEZ**

**YARINACocha – PERÚ**

**2017**

## **DEDICATORIA**

*A los que buscan  
aunque no encuentren*

*A los que avanzan  
aunque se pierdan*

*A los que viven  
aunque se mueran*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, Arquitecto del Universo, quien nos ha dado su guía, su sabiduría y fortaleza para mantenernos firme en este caminar y quien nos ha dado paciencia, perseverancia, coraje y todo lo necesario para culminar con este trabajo y al fin cumplir uno de nuestros objetivos, el de ser profesionales, a pesar de las adversidades.

Agradecemos a todas las instituciones y personas que formaron parte de este trabajo y que nos extendieron su apoyo de una u otra manera y que fue de mucho valor para nosotras.

A la Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía, nuestra Casa de Estudios, por brindarnos los medios necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos a nuestros asesores: A la Ing. Iris Olivia Ruiz Yance, por depositar su confianza en nosotras, por sus consejos, paciencia y conocimiento a favor de nosotras, por darnos ánimo y serenidad cuando era necesario, y por su valiosa amistad; y al Ing. Manuel Ricardo Guerrero Ochoa, por su valioso apoyo, tiempo y voluntad para aclarar nuestras dudas y por ser quien despertó en nosotras el interés en la investigación. Les agradecemos profundamente por el entusiasmo y amistad que nos brindaron.

Agradecemos de igual modo a los miembros del jurado calificador, por sus valiosas observaciones y aportes.

A los docentes de la UNIA y la UNAS, que en el tiempo que compartieron amablemente con nosotras, supieron responder a nuestras preguntas e inquietudes durante el proceso de investigación, y por cada aporte dado para enriquecer el documento final de la tesis.

A nuestros padres y hermanos, quienes son ejemplo de fortaleza, perseverancia y humildad, por el apoyo y comprensión, nos sentimos bendecidas de ser sus hijas.

A todo el que lea este trabajo de investigación, por interesarse en el tema y querer abrirse paso en el amplio camino de la investigación y el profesionalismo, y contribuir así con el desarrollo personal, universitario y regional.

Muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pg.</b>
RESUMEN	08
ABSTRACT	09
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1. Huingo ( <i>Crescentia cujete</i> L.).....	12
2.1.1. Distribución .....	12
2.1.2. Descripción botánica.....	12
2.1.3. Clasificación taxonómica de la planta.....	13
2.1.4. Antecedentes históricos y usos .....	13
2.1.5. Composición química de la planta.....	14
2.1.6. Composición química de la semilla y su importancia.....	14
2.2. Proteínas .....	17
2.2.1. Definición.....	17
2.2.2. Estructura.....	17
2.2.3. Clasificación .....	19
2.2.4. Funcionalidad de las proteínas en alimentos y aplicaciones industriales.....	21
2.2.5. Proteínas en semillas .....	25
2.2.6. Extracción de proteínas .....	25
2.2.7. Parámetros de extracción de proteínas .....	28
2.2.8. Propiedades funcionales de proteínas vegetales .....	31
2.3. Metodología de superficie de respuesta.....	33
2.3.1. Terminología.....	34
2.3.2. Etapas de optimización.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1. Lugar de ejecución.....	45
3.2. Material experimental, población y muestra.....	45
3.3. Materiales y reactivos.....	46
3.4. Equipos.....	47
3.5. Métodos de análisis.....	48
3.5.1. Análisis fisicoquímico.....	48
3.5.2. Determinación de proteína total.....	48
3.5.3. Perfil de aminoácidos.....	48
3.5.4. Determinación de proteína soluble.....	49
3.5.5. Rendimiento en proteína.....	49

	3.5.6. Capacidad de absorción de agua (CAA).....	49
	3.5.7. Capacidad de absorción de lípidos (CAL).....	50
	3.5.8. Capacidad de formación y estabilidad de la espuma (CFE, CEE)...	50
<b>3.6.</b>	Metodología experimental.....	51
	3.6.1. Acondicionamiento de la muestra.....	51
	3.6.2. Determinación del solvente del extracción.....	51
	3.6.3. Extracción alcalina y obtención de extracto proteico.....	53
	3.6.4. Obtención de Concentrado proteico.....	53
<b>3.7.</b>	Diseño experimental.....	55
	3.7.1. Diseño para el Screening o tamizaje.....	55
	3.7.2. Diseño para la Optimización.....	56
	3.7.3. Función de deseabilidad.....	58
	3.7.4. Validación del modelo.....	58
<b>3.8.</b>	Análisis Estadístico.....	58
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
	<b>4.1.</b> Caracterización fisicoquímica y nutricional de las semillas de Huingo....	<b>59</b>
	4.1.1. Caracterización fisicoquímica.....	59
	4.1.2. Evaluación nutricional.....	60
	<b>4.2.</b> Determinación del solvente de extracción de proteínas.....	<b>62</b>
	<b>4.3.</b> Optimización de la extracción de proteínas.....	<b>64</b>
	4.3.1. Screening o cribado.....	64
	4.3.2. Optimización .....	68
	4.3.3. Validación .....	78
	<b>4.4.</b> Caracterización funcional del concentrado proteico.....	<b>79</b>
	4.4.1. Proteína total.....	79
	4.4.2. Caracterización funcional.....	80
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>86</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>94</b>
	<b>8.1.</b> Constancias .....	<b>94</b>
	<b>8.2.</b> Fotos.....	<b>99</b>
	<b>8.3.</b> Otras evidencias de la investigación .....	<b>103</b>
	<b>8.4.</b> Protocolos.....	<b>104</b>

## INDICE DE CUADROS

CUADRO		Pg.
1.	Clasificación de las proteínas según su composición, forma, solubilidad y función.....	20
2.	Funcionalidad de las proteínas en los alimentos.....	23
3.	Representación del análisis de varianza.....	38
4.	Coordenadas del Diseño Compuesto Central.....	43
5.	Variables independientes y sus niveles evaluados en el <i>screening</i> .....	56
6.	Variables independientes y sus niveles evaluados en la optimización.....	57
7.	Composición química de las harinas de semilla de <i>Crescentia cujete</i> L.....	59
8.	Composición en aminoácidos de <i>C. cujete</i> y otras semillas (g AA/100 g muestra)	61
9.	Diseño de <i>screening</i> o cribado con las variables codificadas y no codificadas: Factorial de media fracción $2^{4-1}$ .....	64
10.	ANOVA para el modelo lineal en la etapa de <i>screening</i> .....	67
11.	Diseño Compuesto Central con valores experimentales (observado) y predichos (estimados) del rendimiento en proteína en la etapa de optimización.....	68
12.	Coeficientes de regresión de la ecuación de segundo orden (modelo de predicción) para rendimiento en proteína.....	70
13.	ANOVA para el modelo cuadrático en la etapa de optimización.....	71
14.	Rendimiento del Valor predicho vs Rendimiento de validación, con pH óptimo y pH ajustado, utilizando la función de deseabilidad.....	79
15.	Determinación de proteína total del concentrado proteico de semillas de Huingo.....	79
16.	Características funcionales del concentrado proteico .....	81

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pg.
1. Hojas y fruto de <i>C. alata</i> .....	15
2. Árbol, fruto y hojas de <i>C. cujete</i> .....	15
3. Bisección del fruto maduro de <i>C. cujete</i> .....	16
4. Semillas germinadas de <i>C. cujete</i> .....	16
5. Estructura de un aminoácido.....	18
6. Estructura de las proteínas.....	18
7. Diagrama de flujo de la Metodología de Superficie de Respuesta.....	38
8. Diagrama de flujo del proceso de obtención de la HDSH.....	52
9. Diagrama de flujo para determinar el solvente de extracción.....	52
10. Diagrama de flujo general para la extracción alcalina y obtención de concentrado proteico.....	54
11. Rendimiento de extracción de las proteínas con diferentes solventes.....	62
12. Diagrama de Pareto Estandarizado para el <i>screening</i> con arreglo factorial $2^{k-1}$ ..	66
13. Gráfico de Efectos Principales.....	69
14. Valor experimental (observado) vs el valor estimado (predicho) por el modelo cuadrático.....	73
15. Superficie de Respuesta, vista tridimensional.....	74

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se han optimizado los parámetros de extracción proteica en medio alcalino, usando como materia prima la harina desgrasada de semillas de Huingo (*Crescentia cujete*). La caracterización fisicoquímica de la materia prima indicó que sobresalen los contenidos de proteínas y lípidos (16.94% y 27.3%). La harina desgrasada muestra un contenido de proteínas totales del 22.63%. Posteriormente, para la caracterización nutricional se realizó el análisis de aminoácidos, siendo el triptófano, ácido glutámico, treonina, arginina, prolina, ácido aspártico y fenilalanina los aminoácidos predominantes en las proteínas del Huingo. Para la etapa de extracción, durante el Screening se han determinado que los factores más influyentes son el pH, la relación solvente/muestra y la temperatura de extracción. En la optimización se han encontrado las regiones óptimas para cada factor, siendo éstas el pH de 9; relación solvente/muestra de 51.8 mL/g (NaOH 6N) y temperatura de 18.2 °C, con los cuales se ha obtenido un rendimiento de extracción de 65.28% (14.77 g de proteína/100 g de muestra). Se determinó luego el punto isoeléctrico de la proteína (pH=4.5), para luego precipitarla por centrifugación y liofilizarla. Así se obtuvo el concentrado proteico con 62.80% de contenido proteico (Kjeldhal fc=6.25). Finalmente, éste concentrado fue caracterizado funcionalmente donde se observó que su capacidad de absorción de agua fue 4.80 g/g de muestra, su capacidad para absorber lípidos fue 4.65 g/g de muestra, su capacidad para formar espuma fue 70% y su estabilidad después de 10, 30 y 60 minutos fueron 75, 49.05 y 3.14 %, respectivamente.



## ABSTRACT

In the present work, the parameters of protein extraction in alkaline medium have been optimized, using as raw material the defatted flour of Huingo seeds (*Crescentia cujete*). The physicochemical characterization of the raw material indicated that the contents of proteins and lipids stand out (16.94% and 27.3%). The defatted flour shows a total protein content of 22.63%. Subsequently, amino acid analysis was performed for amino acid analysis, with tryptophan, glutamic acid, threonine, arginine, proline, aspartic acid and phenylalanine being the predominant amino acids in Huingo proteins. For the extraction stage, during the Screening the most influential factors have been determined to be the pH, the solvent / sample ratio and the extraction temperature. In the optimization, the optimal regions for each factor have been found, these being the pH of 9, Solvent/sample ratio of 51.8 mL/g (NaOH 6N) and temperature of 18.2 °C, with which an extraction yield of 65.28% (14.77 g of protein/100 g of sample) was obtained. The isoelectric point of the protein was then determined (pH = 4.5), then precipitated by centrifugation and lyophilized. The protein concentrate was obtained with 62.80% protein content (Kjeldhal fc = 6.25). Finally, this concentrate was functionally characterized to see its suitability for the industry and it was observed that its water absorption capacity was 4.80 g/g sample, its capacity to absorb lipids was 4.65 g/g sample, its ability to form foam Was 70% and its stability after 10, 30 and 60 minutes were 75, 49.05 and 3.14%, respectively.

## I. INTRODUCCIÓN

El Huingo (*Crescentia cujete* L.) es uno de los recursos vegetales que tiene la Amazonía peruana y que ha sido poco estudiado. La escasez de estudios ha hecho que sea un material que aún no se aproveche totalmente, a pesar que su uso es muy popular por los pobladores nativos de distintas localidades que la utilizan de manera artesanal. En la Región Ucayali no se registran datos estadísticos sobre su producción, y la bibliografía sobre sus características fisicoquímicas, funcionales o nutricionales son escasas, por ende, en nuestro país no se ha registrado alternativas para su industrialización; además que el aprovechamiento que le dan los agricultores a este recurso está básicamente en la utilización de la cáscara del fruto para elaboración de artesanías, la pulpa para preparaciones de jarabes contra el resfrío y enfermedades estomacales, considerándola también un complemento alimenticio para el ganado (Grandtner y Chevrette, 2013), no habiendo muchos conocimientos sobre las propiedades de sus semillas; sin embargo es un recurso que se caracteriza por la presencia de una importante cantidad de aceites y proteínas (37% y 30.25%; respectivamente) (Smith y Dollear, 1947; Simaj y García, 2004; Zamora *et al.*, 2001; Madhukar *et al.*, 2013).

Este dato proteico es de suma importancia ya que, debido al incremento de la población, problemas de desnutrición y malnutrición, según la FAO (1997) (800 millones de personas a nivel mundial), deficiencia proteica en los alimentos, elevado crecimiento demográfico, la escasez y alto costo de las fuentes proteicas de origen animal, además que intolerancias o alergias a las proteínas de origen animal (Salcedo-Chávez, *et al.*, 2012), los científicos se han dado a la tarea de buscar concentrados proteicos y fracciones ricas en proteína. Se estima que en países subdesarrollados los vegetales son y seguirán siendo la fuente principal de cultivos que sean capaces de suministrar a la población una ingesta balanceada y adecuada de nutrientes (Autran *et al.*, 2001).

Se sabe también que la demanda proteínica en el mundo va en aumento no solo por su importancia en la nutrición para la población, sino también por su importancia en la industria alimentaria, pues los productos a base de proteínas tienen variadas aplicaciones, por sus características funcionales como las capacidades de formación de espuma y absorción de agua y lípidos, entre otros, que contribuyen al desarrollo de diferentes propiedades sensoriales como la cremosidad, textura, opacidad y adherencia en una variedad de sistemas alimenticios. Es así que muchas investigaciones se están centrando en la extracción y caracterización de proteínas de diferentes fuentes no convencionales: lentejas (Jarpa-Parra *et al.*, 2014), chía (Sandoval, 2012), semillas de maracuyá (Martínez *et al.*, 2011), tarwi (Urrutia, 2010), semillas de almendra (Serratos, 2001), sachainchi (Sathe *et al.*, 2014), torta de palmiste (Chee y Ayob, 2013), semillas de uvas (Gazzola *et al.*, 2014), semillas de sandía (Wani *et al.*, 2008), soya (Rosset *et al.*, 2014), quinua (Jacobsen y Mujica, 2003, entre otros;

demostrando además, el alto valor nutritivo como funcional de las proteínas de origen vegetal (Autran *et al.*, 2001). Sin embargo, la harina de Huingo no se ha utilizado como ingrediente alimentario humano, ya que el concentrado proteico no se produce comercialmente debido a la falta de un método de extracción de proteína tecnológicamente factible.

El método empleado para la extracción de proteínas de semillas de Huingo fue la extracción alcalina, que muestra mejores resultados frente a extracciones a base de ácido y enzimas (Sari *et al.*, 2013), seguido de una precipitación ácida en el punto isoeléctrico de la proteína. No obstante, la eficiencia de la extracción de proteínas puede ser afectada por varios factores (temperatura, pH, tiempo, relación solvente muestra, tipo de solvente, etc.) en el proceso y sus efectos pueden ser independientes o interactivos (Jarpa-Parra *et al.*, 2014; Chee y Ayob, 2013; Urrutia, 2010; Wani *et al.*, 2008; Bejarano 2008). Por lo tanto, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) se convierte en una herramienta útil para optimizar los factores de extracción con un reducido número de ensayos experimentales (Aquino y Chirinos, 2016; Guerrero *et al.*, 2015; Jarpa-Parra *et al.*, 2014; Urrutia, 2010; Wani *et al.*, 2008).

Las etapas que se consideraron en el proceso de optimización comenzó con una etapa de cribado o tamizaje (*Screening*) de los principales factores que afectan el proceso de extracción. Esta etapa previa permitió seleccionar los factores que más impactan en el proceso de extracción de modo que los más significativos fueron utilizados en la etapa de optimización siguiente donde se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta poniendo en marcha al Diseño Compuesto Central Rotable, cuyo análisis permitió encontrar una región óptima para la extracción. Finalmente, los resultados encontrados en la etapa de optimización fueron validados experimentalmente, demostrando la eficacia de la optimización.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo general que se planteó para la investigación fue optimizar la extracción de la proteína de las semillas de Huingo (*Crescentia cujete L.*), en función al rendimiento en proteína, utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta, con los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las características fisicoquímicas y nutricionales de las semillas de Huingo.
- Determinar el solvente de extracción de proteínas.
- Optimizar la extracción de la proteína de las semillas de Huingo, en función al rendimiento.
- Caracterizar funcionalmente la proteína concentrada.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Huingo (*Crescentia cujete* L.)

#### 2.1.1. Distribución

*Crescentia* es un género que está representado por 8 especies ampliamente distribuidas en América tropical, Asia y Malasia (Mabberley, 2008). Aunque no es originario de la Amazonía su cultivo se ha incrementado ampliamente en toda la región durante siglos. Al resistir la inundación, su cultivo es muy común en zonas anegadas periódicamente, aunque también es cultivado en suelos arcillosos no inundables, bosques secos y franco-limosos de fertilidad media. En muchas comunidades rurales amazónicas lo podemos encontrar en terrenos abiertos y bosques secundarios, como también en zonas de espesura de los bosques primarios, cerca de cuerpos de agua como quebradas o cochas (Brañas *et al.*, 2001).

#### 2.1.2. Descripción botánica

Árboles pequeños, *C. cujete* ligeramente mayor que el *C. alata*, tienen ramas numerosas, retorcidas, abiertas, con brotes delgados y nudos sobresalientes. Se reproduce por semilla y esquejes, llega a tener una altura de ocho a diez metros, un diámetro de 25 centímetros, una producción máxima a partir del octavo año de 27 Kg de fruto por árbol/año (Flórez, 2012).

La manera más fácil de distinguir ambas especies es por sus hojas. *C. Cujete* tiene hojas simples más grandes (hasta 26 cm de longitud), con un grupo de hojas brotando del mismo punto de la rama (Figura 2). *C. Alata*, en comparación, tiene hojas con un pecíolo alado, alternas, sin pelos y normalmente con tres hojuelas (Figura 1). Las hojas forman una cruz, con el pecíolo alado en la base (2-8 cm de largo) y las tres hojuelas forman el resto de la cruz (Flórez, 2012).

Las flores de ambas especies se abren por la noche, duran unos 8 días y son polinizadas por murciélagos. Son normalmente solitarias y crecen directamente del tronco y ramas más gruesas. Su aroma recuerda a almizcle, alcanfor y aceite de mostaza. Su rasgo más distintivo es el fruto, el cual es una calabaza esférica de 10-25 cm de diámetro con cáscara dura y leñosa, y una pulpa blanca gelatinosa con numerosas semillas con dos cotiledones y sin endospermo, de crecimiento ortodoxo,

pequeñas de 8-10 milímetros, color marrón oscuro y achatadas (Espitia-Baena *et al.*, 2011; Salazar, 2001),

Los frutos maduros son verdes amarillentos a café y se mantienen en el árbol por 5-7 meses antes de volverse amarillos y caer, principalmente con la reducción de oferta de agua. Fructifican durante todo el año, pero su mayor producción es entre marzo y mayo (Hernández y Campos, 2007). Su corteza de color marrón oscuro, tiene hojas simples siempre verdes y de varios tamaños, 6-26 cm de largo y flores olorosas color verde blanquecino (Madhukar *et al.*, 2013).

### 2.1.3. Clasificación taxonómica de la planta

El Huingo se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Grandtner y Chevrette, 2013; Brañas *et al.*, 2001; Simaj y García, 2004):

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophita*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Lamiales*
- Familia: *Bignoniaceae*
- Género: *Crescentia*
- Especie: *Crescentia cujete* (Linnaeus)
- Nombres comunes: cujete, tecomate, guaje (México), jícaro, jicara, morro, huacal, calabacero, totumo (América Central), higuero (Puerto Rico), güira (República Dominicana), calabaza (Cuba), tapara, jícaro, jicara, totumo, pate (Venezuela), mate, pilche, manguaino (Ecuador), huingo (Perú), cuité (Brasil), taparo, calabaza, totumo (Colombia).

### 2.1.4. Antecedentes históricos y usos

Se conocen seis especies silvestres, unas de Centro América y otras del Amazonas, los cascos secos del fruto se usan desde tiempos precolombinos para fabricar diversos utensilios, posiblemente la planta fue domesticada en varios lugares simultáneamente con este propósito. Dos especies son de importancia artesanal y medicinal: *Crescentia alata* HBK (Morro) y *Crescentia cujete* (Jícaro). Desde tiempos precolombinos, sus grandes frutos esféricos de cáscara leñosa, después de la eliminación de la pulpa, se han utilizado para confeccionar artesanías, cantimploras, cucharas, totumas, vasijas y maracas que se pulen y colorean de manera especial (Murgueitio e Ibrahim, 2004).

Con la pulpa del fruto se prepara un jarabe muy usado por vía oral para el tratamiento de afecciones respiratorias (asma, bronquitis, catarro, pulmonía, resfrío, tos, tos ferina) y gastrointestinales (cólico, diarrea, estreñimiento, hepatitis, inflamación, uretritis, infección urinaria y malestares menstruales), también es considerado un complemento proteico para el ganado (Grandtner y Chevrette, 2013).

#### **2.1.5. Composición química de la planta**

Estudios farmacológicos demuestran que las hojas tienen actividad sedante y antiinflamatoria por los flavonoides que presenta, la pulpa contiene ácidos orgánicos (cianhídrico, clorogénico, cítrico, tánico, tartárico), el tamizaje fitoquímico de las hojas y tallo demuestra la presencia de alcaloides cuaternarios, esteroides insaturados y polifenoles (Simaj y García, 2004), también presenta actividad antihemorrágica frente al veneno de la víbora *Bothrops atrox* (Otero *et al.*, 2000), recientes estudios revelan que el extracto etanólico de las hojas tiene actividad antioxidante, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos, glucósidos y terpenoides (Espitia-Baena *et al.*, 2011; Nandita *et al.*, 2014).

#### **2.1.6. Composición química de la semilla y su importancia**

Las semillas son parecidas a las de la sandía (Figura 4) y son utilizadas artesanalmente para elaborar bebidas refrescantes (Grandtner y Chevrette, 2013), nutricionalmente contienen azúcares (2.6%), proteínas (8-30%) y aceite fijo (37%) constituido por ácidos oleico (59.4%), linoléico (19.3%), ácido palmítico (16%), ácido esteárico (10.6%) y saturados (19.7%), similar al aceite de oliva y maní (Simaj y García, 2004), también contiene nitrógeno (4.84%), fósforo (0.69%), potasio (0.44%), calcio (0.09%) y fibra cruda (12.98%) (Smith y Dollear, 1947). Otros constituyentes de las semillas son ácidos crescéntico,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, glucósidos iridoides como la asperulosida y la plumierida (Espitia-Baena *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Hojas y fruto de *C. alata*



**Figura 2.** Árbol, fruto y hojas de *C. cujete*



**Figura 3.** Bisección del fruto maduro de *C. kujete*



**Figura 4.** Semillas germinadas de *C. kujete*



## **2.2. Proteínas**

### **2.2.1. Definición**

Las proteínas son componentes esenciales de todos los tejidos de las plantas y animales y participan en la mayoría de los procesos biológicos de los seres vivos (Velázquez, 2006). A nivel elemental las proteínas están compuestas por 50-55% de carbono, 6-7% de hidrógeno, 20-23% de oxígeno, 12-19% de nitrógeno y 0.2-3% de azufre. Algunos tipos de proteínas también contienen fósforo, hierro, magnesio y cobre, entre otros elementos. La síntesis de las proteínas tiene lugar en los ribosomas (Fennema, 2000).

Las proteínas son macromoléculas, las cuales desempeñan el mayor número de funciones en las células de los seres vivos. Forman parte de la estructura básica de tejidos (músculos, piel, uñas, etc.), además desempeñan funciones metabólicas (actúan como enzimas, hormonas, anticuerpos) y reguladoras: asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y grasas en la sangre, eliminación de materiales tóxicos, regulación de vitaminas liposolubles y minerales, por mencionar las principales (González-Torres *et al.*, 2007).

Así mismo, son moléculas complejas (agregaciones de aminoácidos), con la posibilidad de que los 20 aminoácidos diferentes puedan ser agrupados en cualquier orden para conformar polipéptidos de cientos de ellos que tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación. Estas múltiples características, muchas de las cuales están interrelacionadas, son las responsables de la gran variedad de funciones, estructuras y demás características de las proteínas (Acuña, 2001).

### **2.2.2. Estructura**

La estructura de las proteínas, al igual que sus propiedades están en base a su composición aminoacídica, puesto que cada aminoácido que la compone cumple funciones específicas (Luque, 2009). La secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica determina el tipo de interacciones que se producirán y el grado de libertad de adoptar diferentes conformaciones (Fennema, 2000). Los péptidos son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos, que es un tipo de enlace covalente que se da entre el grupo amino ( $-NH_2$ ) de un

aminoácido y el grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) de otro aminoácido en la que se produce una amida y una molécula de agua (Murray *et al.*, 2005).

#### **a. Estructura primaria**

La estructura primaria es una secuencia de aminoácidos de la proteína, nos indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que dichos aminoácidos se encuentran (Figura 5). La función de una proteína depende de su secuencia y de la forma que ésta adopte (Figura 6) (Fennema, 2000).

#### **b. Estructura secundaria**

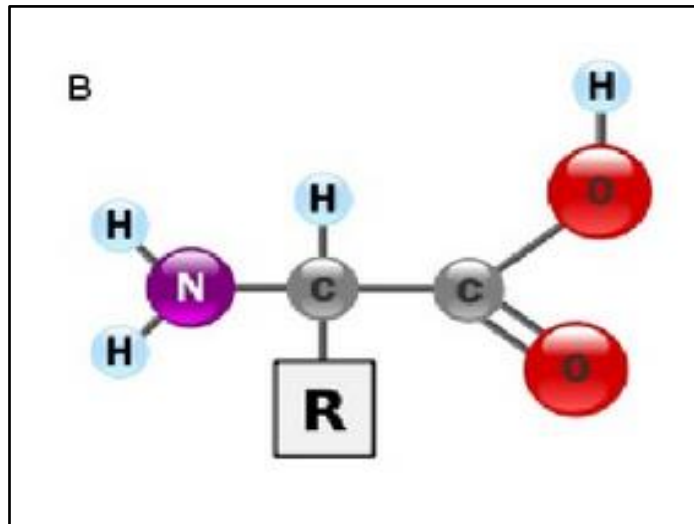
La estructura secundaria es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. A medida que se enlazan durante la síntesis de proteínas y gracias a la capacidad de giro de sus enlaces, adquieren una disposición espacial estable, permitiendo que exista dos tipos de estructuras secundarias ( $\alpha$ -hélice y la  $\beta$ -laminar) los cuales resultan de la unión de cadenas de aminoácidos mediante puentes de hidrogeno, generando una estructura tridimensional (Murray *et al.*, 2005; Vieira, 2003).

#### **c. Estructura terciaria**

La estructura terciaria informa sobre la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma originando una conformación globular, la estructura terciaria es la estructura plegada y completa en tres dimensiones de cadena polipeptídica (Murray *et al.*, 2005). Esta conformación globular facilita la solubilidad en agua de las proteínas (Fennema, 2000).

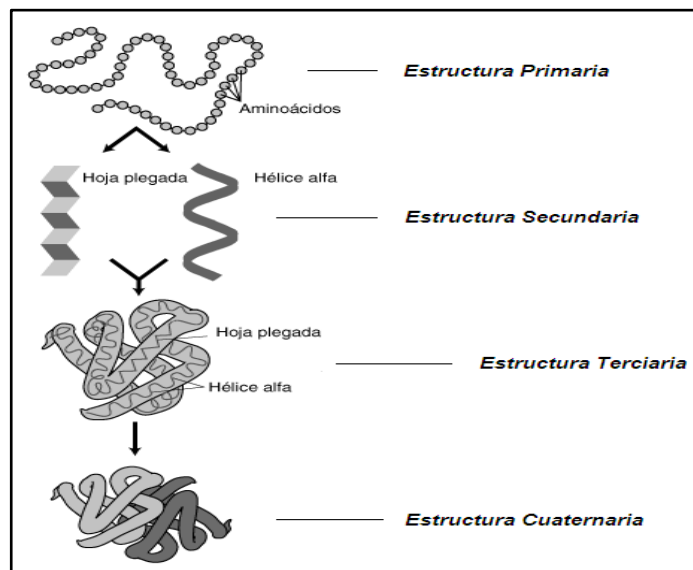
#### **d. Estructura cuaternaria**

Esta estructura resulta de la unión, mediante enlaces débiles (no covalentes) de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria, para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protómero (Luque, 2009).



**Figura 5.** Estructura de un aminoácido

**FUENTE:** Fennema (2000).



**Figura 6.** Estructura de las proteínas

**FUENTE:** Fennema (2000).

### **2.2.3. Clasificación**

La complejidad y la diversidad son las características predominantes de las proteínas, por lo que resulta difícil establecer una clasificación rigurosa. Los criterios más usuales están basados en la composición, la forma, la solubilidad y la función biológica de las proteínas (López, 2011), como se muestra en el Cuadro 1.

Dentro del grupo de las proteínas clasificadas por su solubilidad, las albúminas solubles en agua y las globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas, son los más importantes. Esto se debe a que la mayoría de las enzimas, hormonas y otros polímeros de gran importancia biológica pertenecen a estas dos clases de proteínas (Asiain, 1999).

### **2.2.4. Funcionalidad de las proteínas en alimentos y aplicaciones industriales**

Para el estudio de las proteínas, es importante conocer sus propiedades, las cuales nos permitirán evaluar y/o predecir su comportamiento en las diferentes condiciones de trabajo para planificar y elaborar un método adecuado de extracción de proteínas. Entre las propiedades más importantes y significativas, además del valor nutricional, tenemos a las propiedades funcionales, que juegan un papel importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos. Las propiedades funcionales influyen enormemente en las cualidades sensoriales de los productos en las cuales se utilizan, en caso de los productos horneados influye en las propiedades visco elásticas, propiedades texturales y succulentas en caso de carnes. De igual modo son muchas las propiedades que se pueden mejorar con el uso de las proteínas, en especial con los concentrados y aislados proteicos (Fennema, 2000).

Las propiedades funcionales determinarán el tipo de aplicación que podrá tener un nuevo ingrediente proteínico, y su competitividad en el mercado. Una definición adecuada de propiedades funcionales de una proteína es la siguiente: son propiedades fisicoquímicas que dan información sobre cómo una proteína se comportará en un sistema alimentario. El comportamiento funcional de las proteínas en un sistema alimentario es el resultado de una compleja interacción entre la composición, estructura y propiedades fisicoquímicas de las proteínas, de sus interacciones con otros componentes, tales como lípidos y carbohidratos, y la naturaleza del medio en el cual están asociadas (Alanis, 1993).

**Cuadro 1.** Clasificación de las proteínas según su composición, forma, solubilidad y función.

CLASIFICACION	PROPIEDADES	EJEMPLO
<b>A. POR SU COMPOSICIÓN</b>		
1. Simple	Contiene solo aminoácidos.	Insulina
2. Conjugada	Contiene una fracción no proteica.	
a) Metalproteínas	Pigmentos	Mioglobina, hemoglobina
b) Glucoproteínas	Contiene carbohidratos	Inmunoglobulinas, fracción 7S de la soya, caseína, mucina
c) Fosfoproteínas	Contiene fósforo	Caseínas de la leche, flavoproteínas, pepsina.
d) Lipoproteínas	Contiene lípidos	Lipovitulina de la yema de huevo.
e) Nucleoproteínas	Contiene Ácidos Nucleicos.	Virus, genes
<b>B. POR SU FORMA</b>		
1. Globular	Esféricas u ovoides	Albumina de huevo
2. Fibrosa	Forman fibras de tejido conectivo Proteína de ligamentos y tendones. Pelo, uñas, lana, cuernos Proteína muscular.	Colágeno Elastina Queratina Miosina y Actina Fibrinógeno
<b>C. POR SU SOLUBILIDAD</b>		
1. Albúmina	Solubles en agua y soluciones salinas.	Lactoalbúmina de la leche, ovoalbúmina del huevo.
2. Globulinas	Poco solubles en agua, solubles en soluciones salinas.	Miosina del músculo, globulina del plasma.
3. Histonas	Alto contenido de aminoácidos básicos. No coagulan por el calor.	Proteínas unidas a Ácidos Nucleicos
4. Glutelinas	Insolubles en agua y alcohol. Solubles en álcalis y ácidos débiles.	Gluten de trigo
5. Prolaminas	Solubles en 70% de alcohol	Zeina de maíz, gliadina del trigo
6. Escleoroproteínas	Insolubles en la mayoría de los solventes.	Todas las proteínas clasificadas en B-2 en esta tabla.
<b>D. POR SU FUNCION</b>		
1. Estructural	Forma parte estructural del cuerpo.	Proteínas clasificadas como B-2
2. Enzimas	Catalizan reacciones	Lipasas, proteasas
3. Hormonas	Mensajeros químicos	Insulina, glucagón
4. Toxinas	Proteínas dañinas, generadas por microorganismos	Toxina botulínica
5. Anticuerpos	Proteínas protectoras elaboradas por el organismo.	Globulina de la sangre
6. Transporte de O <sub>2</sub>	Transporta O <sub>2</sub> de los pulmones a los tejidos. Almacén de O <sub>2</sub> , en el músculo.	Hemoglobina Mioglobina

**FUENTE:** Anglemier y Montgomery (1982).

El interés en el aprovechamiento de las proteínas ha desarrollado los procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la generación de concentrados y aislados proteicos con diversas propiedades de interés general: solubilidad, viscosidad, textura, capacidades espumantes, de absorción de agua y de aceite, emulsificante, gelificante y de hinchamiento para su utilización en la industria. Así, por ejemplo, los aislados con mejor poder espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres; con buen poder emulsificante son usados en la fabricación de mayonesas, carne picada, salchichas o helados; con buena absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas (Mannheim *et al.*, 1992 citado por Vioque *et al.*, 2001).

Algunos aislados proteicos con ciertas características físicoquímicas están destinados para alimentación y obtención de hidrolizados proteicos para una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos, por ejemplo las bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos para las personas de la tercera edad o las bebidas refrescantes suplementadas para los deportistas (Ovensen *et al.*, 1991 citado por Vioque *et al.*, 2001).

En el Cuadro 2, se resume las propiedades funcionales que ejercen las proteínas en los sistemas alimenticios, que a continuación se detallan:

#### **a. Solubilidad**

La solubilidad de una proteína está influenciada por los siguientes factores: su composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos), su estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína (peso molecular, forma, ionización, etc.). Esta propiedad de las proteínas, permite contribuir a que los alimentos exhiban características deseables (Fennema, 2000; Callisaya y Alvarado, 2009).

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría

**Cuadro 2.** Funcionalidad de las proteínas en los alimentos

<b>Funciones</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Alimento</b>	<b>Tipo de proteína</b>
Solubilidad	Hidrofilia	Bebidas	Proteínas de suero lácteo (lactoalbúminas)
Viscosidad	Fijación de agua, tamaño y forma hidrodinámica	Sopas, caldos, aderezos para ensalada, postres	Gelatina (hidrocoloides)
Fijación de agua	Puentes de hidrógeno, hidratación iónica	Salchichas, bizcochos y pan	Proteínas del músculo (mioglobina), proteínas del huevo (albúminas)
Gelificación	Agrupamiento e inmovilización del agua, formación de una red tridimensional	Carnes, quesos, bizcochos y geles	Proteínas musculares, del huevo y proteínas lácteas
Elasticidad	Interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro	Carnes, productos horneados	Proteínas musculares y de cereales
Emulsión	Adsorción y formación de película en la interface	Salchichas, sopas, bizcochos y aderezos	Proteínas del músculo, leche y huevos
Formación de espumas	Adsorción en la interface y formación de película	Batidos ornamentales, helados, bizcochos y postres	Proteínas lácticas y del huevo
Fijación de grasa y sabores	Interacciones hidrofóbicas, atrapamiento	Productos horneados pobres en grasa, buñuelos	Proteínas lácteas, del huevo y de los cereales

**FUENTE:** Fennema (2000).

su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos (Callisaya y Alvarado, 2009).

#### **b. Desnaturalización**

En un sentido termodinámico se refiere al cambio de un estado ordenado de las moléculas a otro desordenado, en este proceso se pierde las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, desnaturalizándose así la estructura interna de la proteína.

La desnaturalización puede ser producida por todos aquellos agentes que rompen los puentes de hidrogeno, los enlaces iónicos o hidrófobos como son: cambios de temperatura, pH, aumento de la tensión interfacial, adición de disolventes orgánicos, sales, etc. (Callisaya y Alvarado, 2009).

#### **c. Hidratación**

Al igual que otras sustancias orgánicas, las proteínas en estado seco tienden a retener una cierta cantidad de agua hasta alcanzar el equilibrio con la humedad relativa del medio que lo rodea, presentando diferentes capacidades de retención del solvente, es importante considerar la estructura terciaria de la proteína, pues la presencia de residuos hidrofílicos en el área externa, facilitará la interacción con el agua (Callisaya y Alvarado, 2009).

#### **d. Gelificación**

Es el proceso que se realiza en dos etapas, la primera de desenrollamiento y desnaturalización de las proteínas a elevadas temperaturas, y la segunda de formación de una red que retiene agua (cuyo resultado es un gel) y se lleva a cabo a bajas temperaturas (Callisaya y Alvarado, 2009).

#### **e. Viscosidad**

La viscosidad depende de los factores extrínsecos como son la temperatura y el pH. La viscosidad es una medida de la resistencia que presentan los fluidos para moverse en un plano: es una función de la red u ordenamiento tridimensional de las moléculas y, por tanto, aumenta con la concentración del polipéptido. Al aumentar la temperatura se reduce la viscosidad ya que los puentes de hidrogeno se rompen, lo que lleva consigo que estos polímeros pierdan su hidratación, así mismo, cuando se acercan a



su punto isoeléctrico se reduce la cantidad de agua retenida y con ello la viscosidad (Callisaya y Alvarado, 2009).

### **2.2.5. Proteínas en semillas**

Las semillas son de vital importancia para el hombre ya que son el principal órgano de propagación y dispersión de las plantas, además de ser uno de los tejidos más cosechados y utilizados directa e indirectamente en la alimentación humana y animal. La importancia de las semillas se debe en gran parte, a la calidad nutritiva aportada por la presencia de proteínas que se acumulan dentro de ellas, dichas proteínas poseen elevado valor alimenticio, tanto que en ocasiones logran sustituir a las proteínas de origen animal (Peralta, 2004).

Las proteínas de las semillas se encuentran en una capa conocida como aleurona y en los cotiledones, se pueden clasificar en tres categorías. 1) Proteínas estructurales y metabólicas, necesarias para el crecimiento y desarrollo normal de la planta; 2) Proteínas de protección, protegen a la semilla contra diferentes tipos de daño biótico y abiótico y 3) proteínas de reserva, que sirven como almacén de aminoácidos y son metabolizadas durante la germinación para fungir como fuente de nitrógeno, carbono y azufre para las etapas iniciales del desarrollo de la nueva plántula (Shewry, 2002).

### **2.2.6. Extracción de proteínas**

Las proteínas están directamente relacionadas con la función y para poder comprender y generar información acerca de los procesos químicos en las células y los beneficios nutricionales que los alimentos pueden aportar a nuestro organismo es preciso extraer, aislar, identificar y estudiar las estructuras y las propiedades de las proteínas. El modo de hacerlo es aprovechando las diferencias existentes entre las proteínas, tales como solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas (Mathews *et al.*, 2002).

Según lo mencionado, los fines perseguidos cuando se extraen las proteínas vegetales son:

- Mejorar el valor nutricional, obteniéndose mediante la eliminación de sustancias tóxicas.
- Mejorar las características organolépticas, resulta de la eliminación durante la extracción de pigmentos y aromas.

- Mejorar las propiedades funcionales, las cuales resultan del enriquecimiento proteico y de los cambios de las condiciones del medio por eliminación de ciertos constituyentes indeseables.
- Valorar las producciones alimenticias tradicionales.

Dado que las proteínas varían de tamaño, carga e hidrosolubilidad, no se puede utilizar un método único para aislar todas las proteínas. Aislar una proteína determinada a partir de 10000 proteínas diferentes en una célula es una tarea que intimida y que requiere métodos de separación y de detección de la presencia de proteínas específicas. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas de plantas, que está relacionada con la localización intracelular, permite formular diferentes métodos de extracción.

Ejemplificando, Cortes y Gallardo (2005), estudiaron la metodología de extracción de aislado proteico a partir de alfalfa (*Medicago sativa*), concluyendo que en la mayor parte de los métodos se obtiene el 40% o más de recuperación de proteína. Se observa un incremento en la recuperación de proteína por arriba del 90% en los concentrados obtenidos a partir del jugo de alfalfa y por la aplicación de tratamiento térmico y ajuste de pH. En los métodos en que se obtuvo una recuperación entre 90% y 50%, se pueden mejorar aplicando una segunda o tercera extracción. Por otro lado, es posible extraer proteínas a partir de harinas desgrasadas con solventes como el éter de petróleo vía Soxhlet.

Los métodos más usados en la extracción y solubilización de proteínas para el control del proceso y caracterización de los extractos obtenidos son:

#### **a. Extracción ácida**

Al degradar a la proteína rompe las cadenas polipeptídicas en desorden generando un bajo grado de hidrólisis. Este tipo de extracción realiza su acción en menor tiempo, y se fundamenta en la ebullición prolongada de la proteína con soluciones ácidas fuertes (HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los análisis de estos extractos muestran que tienen una cantidad elevada de nitrógeno amínico comparado con los demás; y tiene un alto contenido de sales. Este método destruye completamente el triptófano, provoca una pérdida severa de cistina y pérdida leve de la serina y la treonina, así como la conversión en sus formas ácidas de la glutamina y asparagina (Bridson, 1998).

## **b. Extracción alcalina**

Consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, comúnmente se utiliza hidróxido de sodio NaOH para regular el pH de la solución para la extracción alcalina, luego se procede a la precipitación isoeléctrica (pH en el que la solubilidad de las proteínas es mínima al igualarse sus cargas iónicas). Generalmente el procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación de 1:10-1:60, ajustando el pH con NaOH 0.1N a un rango de 7.0-9.0. La extracción se realiza agitando la suspensión por tiempos de 15 a 120 minutos a temperaturas que fluctúan de 20 a 70°C. Para separar la proteína extraída del residuo, el extracto se centrifuga a velocidades que van desde 4000 a 10000 rpm. La precipitación de las proteínas aisladas se realiza ajustando el pH con HCl 0.1N, hasta el punto isoeléctrico. El aislado proteico precipitado se recupera por centrifugación generalmente a 10000 rpm (30 min, 4°C), posteriormente se procede a lavar preferentemente dos veces con agua destilada (Ramírez *et al.*, 2007, citado por Urrutia, 2010).

## **c. Extracción salina**

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las sales de iones divalentes tales como el  $MgCl_2$  y el  $(NH_4)_2SO_4$ , son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl, el KCl y el  $NH_4Cl$ . Las capacidades de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas están en función de su fuerza iónica que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones aportados por la sal (Nelson y Cox, 2001).

Por otra parte, a medida que aumenta la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, a una fuerza iónica suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución, efecto llamado insolubilización por salado. La base fisicoquímica de la insolubilización por salado es muy compleja; uno de los factores que concurren en ella es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína reduciendo la solubilidad (Nelson y Cox, 2001).

Un ejemplo de esta extracción se vio para la proteína de soya, donde se utilizó una solución de NaCl 0.8 M a pH 7, en una proporción harina:solvente de 1:10 (p/v),

después de la extracción la suspensión se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos. Para lograr la micelización de las proteínas el extracto proteínico se diluyó con agua destilada fría (4°C) y se precipita a  $pI=4.5$ ; finalmente los precipitados se lavaron dos veces con agua destilada, la solución se neutralizó, liofilizó y almacenó hasta su uso posterior (Robles y Mora, 2007).

#### **d. Extracción enzimática**

En este método se someten proteínas a la acción de enzimas específicas, capaces de reconocer el enlace peptídico y separar los aminoácidos sin destruirlos. Se obtienen L-alfa-aminoácidos, aminoácidos 100% levógiros (Naranjo y Suquilanda, 2013).

La extracción enzimática presenta ciertas ventajas como la selectividad, es decir que las enzimas son muy específicas para un tipo de enlace, por lo que no hay productos de degradación en los resultados a diferencia de la extracción alcalina y ácida que sí presenta poca selectividad y que al ser más difíciles de controlar se forman productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicas.

La extracción enzimática tiene parámetros controlados de temperatura y pH, ocurre generalmente en un rango de 40°C a 60 °C y en pH de 4 a 8. En la extracción enzimática no se añade ninguna sustancia extraña, por lo que no es necesaria la neutralización posterior.

El valor nutritivo en la extracción enzimática de proteínas se mantiene, por lo que no se produce compuestos de degradación. Sin embargo, es necesario desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones asépticas evitando una contaminación microbiana de la mezcla a trabajar.

#### **e. Extracción física**

Es más deseable que otros métodos en el procesamiento de alimentos, debido a que normalmente inducen menos alteraciones no naturales en los alimentos y causan menos problemas de salud, pero son costosos (Naranjo y Suquilanda, 2013).

### **2.2.7. Factores de extracción de proteínas**

Para cada proceso, existen factores que influyen en los resultados del proceso. El entendimiento y la buena manipulación de dichos factores garantizan la idoneidad de

los resultados. De los muchos factores que influyen en la extracción de proteínas, algunas son muy influyentes en los resultados, siendo éstas el pH de extracción, relación harina/solvente y temperatura de extracción. Sin embargo, también influye el tiempo de agitación, número de extracciones, etc. (Urrutia, 2010).

#### **a. pH de solubilización**

Las proteínas generalmente tienen carga neta negativa, por lo que cuando se incrementa el pH, los iones OH<sup>-</sup> son incorporados al sistema haciendo que la carga neta sea aún más negativa, este fenómeno ocasiona que las moléculas de las proteínas se repelen y se solubilizan, paralelamente las moléculas de agua son incorporadas mediante puentes de hidrogeno incrementando la solubilidad (Callisaya y Alvarado, 2009).

Los tratamientos alcalinos altos (pH > 9) afectan negativamente a los aminoácidos azufrados y a otros esenciales tales como lisina generando lisino-alanina además de causar desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, incremento de la reacción de Maillard con el oscurecimiento de las proteínas e incremento de la extracción de componentes no proteicos, los cuales coprecipitan con las proteínas, bajando así la calidad del aislado proteico. Por estas razones técnicas se opta por trabajar en un rango de pH 8 a pH 8.9 que permite obtener una cantidad apreciable de proteína. Sin embargo, estos valores varían significativamente según la materia prima (Callisaya y Alvarado, 2009).

Los iones H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup> del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados (Nelson y Cox, 2001).

#### **b. Temperatura**

En caso de la temperatura, Meyer (1966) citado por Ventura *et al.*, (2005), refiere que la solubilidad de las proteínas aumenta cuando la temperatura se eleva de 0 a 50°C.

Por encima de 50°C el movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundarias y terciarias.

Las proteínas entran en disolución, cuando se calientan por encima de una determinada temperatura crítica, manifiestan importantes cambios estructurales y cuando posteriormente se enfrían producen un gel viscoso y blando y coágulos opacos o geles viscoelásticos claros, dependiendo del tipo de proteína y aminoácidos que lo conforman, de la velocidad de calentamiento y de las condiciones del medio acuoso, especialmente del pH y de la presencia de iones Ca<sup>++</sup> (Rodríguez *et al.*, 2002).

Las etapas iniciales de la coagulación por el calor de una disolución acuosa de proteína son: (a) la disociación reversible de la estructura cuaternaria en sub-unidades y (b) la desnaturalización irreversible de las estructuras secundarias y terciarias (Rodríguez *et al.*, 2002).

Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan. Asimismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada (Nelson y Cox, 2001).

#### **c. Relación muestra/solvente**

La cantidad de muestra a solubilizar en el sistema muestra y solvente, influye significativamente en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada en la precipitación isoeléctrica, sin embargo el solvente (solución extraente que es ajustada a pH de extracción) debe ser adecuada para que no se sature los componentes solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada para que sea adecuado entre la cantidad de disolvente y la cantidad de proteínas a solubilizar (Ventura *et al.*, 2005).

#### **d. Efecto de la polaridad del disolvente**

La polaridad (hidrofobicidad frente a un soluto) del disolvente disminuye cuando se le añaden sustancias menos polares que el agua como el etanol o la acetona. Con ello disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación. Los disolventes orgánicos

interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. La acción de los detergentes es similar a la de los disolventes orgánicos (Nelson y Cox, 2001).

#### **e. Fuerza iónica**

Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico, urea o hidrocloreuro de guanidinio, por ejemplo) también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan. En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original (Nelson y Cox, 2001).

#### **2.2.8. Propiedades funcionales de proteínas vegetales**

Los concentrados y aislados vegetales juegan un papel importante en diversas formulaciones tanto de alimentos tradicionales como de nuevos productos, su aceptabilidad depende de la calidad sensorial, valor nutricional y de propiedades funcionales, afectadas por el método de obtención.

Las propiedades funcionales de las proteínas influyen en su comportamiento durante el procesado, almacenamiento, cocción y consumo de los alimentos (Moure *et al.*, 2006). Estas propiedades están relacionadas con las características físicas y químicas de las proteínas: tamaño, forma, composición, cadena de aminoácidos, carga neta y distribución de las cargas; cociente hidrofobicidad/hidroficidad; estructura secundaria, terciaria y cuaternaria; el grado de flexibilidad-rigidez y la capacidad de interaccionar con otros componentes. También dependen de factores extrínsecos, tales como: características del disolvente, temperatura, valor del pH, fuerza iónica, cationes divalentes, desnaturalizantes, otras macromoléculas (Lampart-Szczapa, 2001).

Según Pomeranz (1991), se clasifican en:

- Sensoriales (aroma, sabor, color y textura)

- Hidratación, dispersabilidad, solubilidad.
- Relacionadas con la superficie (emulsión, espuma, absorción de agua y aceite)
- Reológicas, incluyendo gelación y texturización.
- Otras (adhesividad, cohesividad, formación de masas, películas)

De acuerdo con el mecanismo de acción, Phillips *et al.*, 1994, las divide en propiedades relacionadas con:

- La hidratación (absorción de agua y aceite, solubilidad, humectabilidad)
- Las características reológicas y estructura proteica (viscosidad, elasticidad, adhesividad, agregación y gelación)
- La superficie de la proteína (emulsión, espuma, formación de películas proteína-lípidos)

Entre las propiedades más interesantes en el procesamiento de los alimentos, que influyen en la textura y en las características organolépticas de éstos, tenemos:

#### **a. Capacidad de absorción de agua (CAA)**

También llamada capacidad para fijar agua, es definida como la cantidad de agua absorbida por gramo de material proteico. Las sustancias con capacidad de absorción de agua bajas no retienen de forma eficaz el agua mientras que los materiales con capacidad de absorción de agua altas proporcionan dureza y evitan la liberación de agua, especialmente durante el almacenamiento de los productos (Boye *et al.*, 2010a).

#### **b. Capacidad de absorción de lípidos (CAL)**

Algunas ocasiones referidas como capacidad de retener aceite, es calculada como la cantidad de aceite absorbida por cantidad de proteína (g).

#### **c. Capacidad de formación y estabilidad de espuma (CFE, CEE)**

En los alimentos las proteínas son los principales agentes con actividad en la superficie para estabilizar la fase gaseosa. La formación de espuma requiere un área interfacial grande para facilitar la incorporación de aire a la fase líquida y formar una película interfacial resistente a la fuerza interna y externa.

La capacidad espumante es determinada por la habilidad de la proteína para reducir la tensión superficial, la flexibilidad molecular y las propiedades fisicoquímicas



(hidrofobicidad, carga neta y distribución de las cargas, propiedades hidrodinámicas). Por tanto, las proteínas con excelentes propiedades espumantes deberán absorberse rápidamente en la interfase agua-aire durante la agitación o batido, desplegarse y reorganizarse en la interfase y formar una película viscosa y cohesiva a través de las interacciones intermoleculares (Boye *et al.*, 2010a).

Estas propiedades se miden a través del índice de estabilidad, el cual mide el tiempo requerido para reducir el 50% del volumen o el volumen de espuma que permanece después de un tiempo; la capacidad de formación de espuma se evalúa midiendo el volumen de espuma de la solución proteica después del batido o aireación (Boye *et al.*, 2010a).

### 2.3. Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables o factores y donde el objetivo es optimizar esta respuesta. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos (Montgomery, 2005).

Según Montgomery (2005) el valor real esperado,  $\eta$ , que toma la variable de interés considerada está influenciado por los niveles de  $k$  factores cuantitativos,  $x_1, x_2, \dots, x_k$ , esto significa que existe alguna función de  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que proporciona el correspondiente valor de  $\eta$  para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (1)$$

De tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (2)$$

Donde  $\varepsilon$  es el ruido o error observado en la respuesta  $Y$ . La relación existente entre  $\eta$  (función) y los niveles de los  $k$  factores representa la superficie de respuesta (Montgomery, 2005).

### 2.3.1. Terminología

#### a. Variable o factor

Una variable es un símbolo, tal como X, Y, H, x o B, que puede tomar un conjunto prefijado de valores llamado dominio de esa variable. Si la variable puede tomar un solo valor se llama constante (Spiegel, 1991). La notación se clasifica en:

- **Variable independiente**

Es una variable de proceso que puede tomar valores independientemente de las otras variables. Así, para definir una variable dependiente debe existir por lo menos una variable independiente (Ayala y Pardo, 1995).

- **Variable dependiente**

Son aquellas variables que describen los resultados de un proceso. Está denotado comúnmente por  $Y_i$ . También se le llama variable performance, variable de respuesta o criterio de optimización (Ayala y Pardo, 1995).

#### b. Parámetro

Se denomina parámetro de proceso a aquellos que no cambian o no pueden cambiar su valor durante el rango de validez del modelo matemático o físico de un proceso. Comúnmente aparecen como simples constantes en las ecuaciones matemáticas (Ayala y Pardo, 1995).

#### c. Diseño experimental

Un experimento es una prueba o ensayo. Un experimento diseñado es una prueba o una serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios con el criterio de optimización (Ayala y Pardo, 1995).

#### **d. Modelo matemático**

Consiste en una ecuación o sistema de ecuaciones algebraicas o diferenciales que representan cuantitativamente el proceso o algunos aspectos del proceso (Ayala y Pardo, 1995).

#### **e. Función objetivo**

El punto de partida básico en un proceso de optimización es definir adecuadamente un criterio de optimización, es decir, que se va a optimizar. Se debe escoger entre las variables dependientes, aquellas que bajo algún criterio adecuado brinde mejores resultados (Ayala y Pardo, 1995).

Según Ayala y Pardo (1995) la relación entre el criterio de optimización y las variables independientes consideradas en el estudio se denomina función objetivo. El principal objetivo de un proceso será maximizar o minimizar una función objetivo el cual está definida por:

$$F_{(\max)} = \varnothing(x, u, h, z) \quad (3)$$

Donde:

F: Criterio de optimización

$(x, u, h, z)$ : Variables independientes

#### **f. Superficie de respuesta**

Es la representación geométrica de la función objetivo o más propiamente del modelo matemático obtenido. Debe distinguirse claramente de una superficie de respuesta estimada de una superficie de respuesta real (Ayala y Pardo, 1995). Una superficie de respuesta estimada, es la representación geométrica del modelo matemático obtenido. Una superficie de respuesta real, es la representación geométrica de un modelo, solo podemos aproximarnos a ella con los modelos matemáticos comúnmente usados (superficie de respuesta predicha) (Ayala y Pardo, 1995).

#### **g. Gráfica de Efectos principales**

Grafica el cambio estimado en la respuesta cuando cada uno de los factores es movido desde su nivel inferior hasta su nivel superior. Utiliza una gráfica de

efectos principales para examinar las diferencias entre las medias de nivel para uno o más factores. Hay un efecto principal cuando diferentes niveles de un factor afectan la respuesta de manera diferente. Una gráfica de efectos principales grafica la media de respuesta para cada nivel de factor conectado por una línea (Montgomery, 2005).

#### **h. Pareto estandarizado**

Esta gráfica muestra los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) de los diferentes factores evaluados en orden de importancia decreciente, así como el efecto positivo o negativo en la variable respuesta evaluada. La longitud de cada barra es proporcional al impacto de cada efecto correspondiente en la respuesta mostrando sólo la significancia de los efectos principales. Cualquier barra o factor que se extiende más allá de la línea vertical, que representa el nivel significativo seleccionado (5%), es estadísticamente significativo (Montgomery, 2005).

#### **i. Análisis de varianza**

Los resultados del análisis de varianza de un conjunto de datos que provienen de un experimento, pueden ser presentados según el Cuadro 3, cuyas entradas representan medidas de información acerca de las fuentes de variación de los datos. Cabe indicar que la suma total de cuadrados (SST) representa la variación total en un conjunto de datos y la suma de cuadrados de regresión (SSReg) representa la porción de SST atribuible a la ecuación de regresión ajustada. Por otro lado, la falta de ajuste permite conocer la existencia o no de ajuste de los resultados experimentales a la ecuación de regresión estimada y la SSE da idea de la buena reproducibilidad del experimento (Box y Draper, 1987).

### **2.3.2. Etapas de optimización**

La optimización está formada por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo. Según Ayala y Pardo (1995), optimizar un proceso o producto requiere una estrategia adecuada para encontrar valores óptimos. Candiotti *et al.* (2014) muestran un esquema general para un proceso de optimización aplicando el método de superficie de respuesta (Figura 7).

### a. Cribado o *screening*

En esta etapa se identifica a las variables que verdaderamente aumentan la eficacia de un proceso (las más significativas). Al inicio de un proceso de optimización, cuando no se tiene un buen conocimiento del comportamiento del proceso, la lista de variables que pueden influir en el proceso son muchas (Ayala y Pardo 1995), por lo que es necesario identificar a las más relevantes. Los diseños más usados en esta etapa son los diseños factorial  $2^k$ , factorial fraccionado y el diseño de Plackett y Burman.

Montgomery (2005) señala que el primer paso en la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre “y” y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \dots + \beta_kX_k + \varepsilon \quad (4)$$

En esta clase de diseños de primer orden se tiene:

- Diseños factoriales  $2^k$  (con réplicas en el punto central).
- Diseño factorial fraccionado.
- Diseños Plackett y Burman

#### a.1. Diseño factorial $2^k$

Los diseños de tratamientos factoriales  $2^k$  son útiles para realizar estudios preliminares con muchos factores, para identificar los más importantes y sus interacciones. Sin embargo, el número de unidades experimentales aumenta geométricamente con el número de factores en el estudio. Según Montgomery (2005) es aquel diseño donde se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica. Por lo tanto, el número total de experimentos a llevarse a cabo viene definido por la relación:

$$N = 2^k \quad (5)$$

Donde:

$k$ : Es el número de variables o factores

$N$ : El número de experimentos.

**Cuadro 3.** Representación del análisis de varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Regresión (Modelo ajustado)	$p-1$	$SS_{Reg} = \sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$\frac{SS_{Reg}}{(p-1)}$
Residual	$N - p$	$SS_R = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$\frac{SS_R}{(N-p)}$
Falta de ajuste	$N - p - n_c + 1$	$SS_R - SS_E$	$\frac{SS_R - SS_E}{N - p - n_c + 1}$
Error puro	$n_c - 1$	$SS_E = \sum_{i=1}^N (Y_i^0 - \bar{Y}^0)^2$	$\frac{SS_E}{(n_c - 1)}$
Total	$N - 1$	$SS_T = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2$	$\frac{SS_T}{(N-1)}$

**FUENTE:** Box y Draper (1987).

Donde:

$p$ : Número de tratamientos.

$n_c$ : Número de puntos centrales.

$N$ : Número total de unidades experimentales.

$SS_{Reg}$ : Suma de cuadrados de la regresión.

$SS_R$ : Suma de cuadrado residual.

$SS_E$ : Suma de cuadrado del error puro.

$SS_T$ : Suma de cuadrado del total.

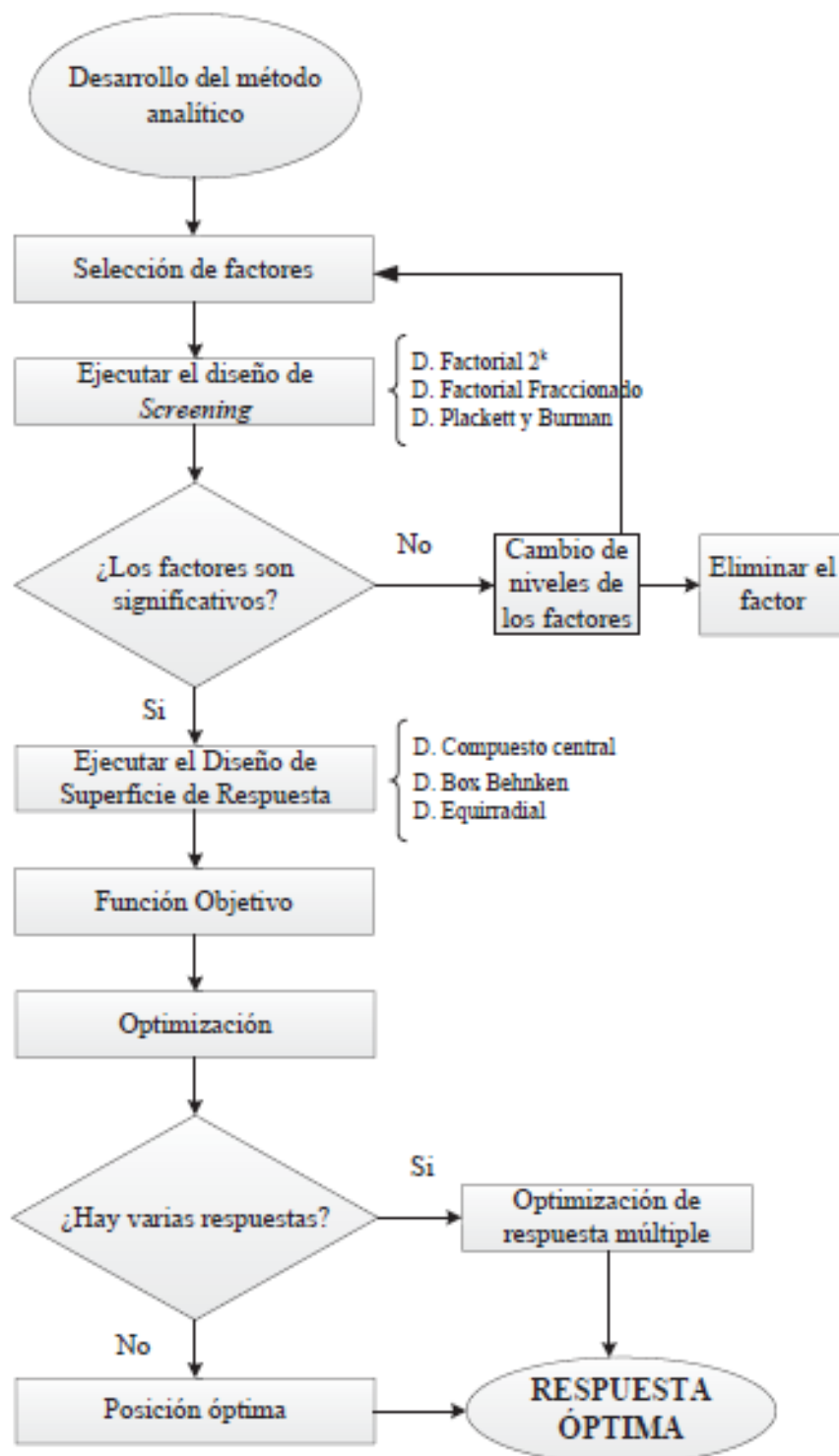
$Y_i$ : Valores observados en el diseño experimental.

$\hat{Y}_i$ : Valores estimados por el modelo.

$\bar{Y}$ : Media de los valores observados en el diseño experimental.

$Y_i^0$ : Valores observados en el punto central.

$\bar{Y}^0$ : Media de los valores observados en el punto central.



**Figura 7.** Diagrama de flujo de la Metodología de Superficie de Respuesta

**Fuente:** (Candiotti *et al.*, 2014).

En este diseño los factores ( $k$ ) se codifican a los niveles +1 (para el más alto) y -1 (para el más bajo). El diseño no permite la estimación del error experimental a menos que se repitan los experimentos, para lograr esto se aumenta el diseño con observaciones en el centro. La adición de los puntos centrales no tiene influencia sobre los coeficientes  $\beta_i$  para  $i \geq 1$ , pero la estimación de  $\beta_0$  es el promedio general de todas las observaciones (Montgomery, 2005).

### a.2. Diseño factorial $2^k$ con réplica en el punto central

El diseño factorial a dos niveles, asume que la relación entre las variables y la respuesta es representada por un modelo matemático lineal. De ser cierta dicha linealidad, el modelo debe predecir adecuadamente todos los puntos del diseño, inclusive el punto central. Por supuesto, es innecesaria la linealidad perfecta y el sistema  $2^k$  funcionará bastante bien incluso cuando la suposición de linealidad se cumple solo de manera aproximada. De no ser cierta esta hipótesis, es decir que no prediga adecuadamente, especialmente el punto central del diseño, se puede afirmar que el modelo matemático lineal no es suficiente para explicar las respuestas en dicha región experimental y se asume una posible existencia de curvatura. Para ello la adición de pruebas en el punto central del diseño sirve para dar una estimación promediada del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995).

La suma de cuadrados para la curvatura está dada por:

$$SS_{\text{curvatura}} = \frac{N \times n_0 (\bar{Y} - \bar{Y}^0)^2}{(N + n_0)} \quad (6)$$

Donde:

$\bar{Y}^0$ : Promedio de las réplicas

$n_0$ : Número de réplicas en el centro del diseño

$N$ : Número de pruebas experimentales

$\bar{Y}$ : Promedio de los puntos exteriores del diseño

### b. Optimización

Cuando se tiene evidencia que la región óptima se encuentra lejos de los experimentos iniciales (*screening*), o para confirmar una hipótesis previa (según experiencias del investigador o según el análisis del efecto de curvatura en la etapa *screening*) se da el escalamiento (optimización). Esta etapa consiste en escalar sucesivamente hacia la



región óptima (curvatura) hasta llegar a ubicarla. Existen varios métodos entre los cuales destacan el método de pendientes ascendentes o descendentes y el método de búsqueda simple (*Simplex Search*). Estos métodos permitirán acercarse a la denominada “región experimental de respuesta estacionarias”, es decir, a una zona en la cual ya no es posible mejorar las respuestas por las técnicas mencionadas. En esta situación los efectos cuadráticos toman importancia y el uso de modelos de segundo orden es necesario para describir dicha región (Ayala y Pardo, 1995).

En la región óptima los efectos de segundo orden son mayores en valor absoluto a los efectos de primer orden, lo que indica que esta región puede describirse apropiadamente por modelos matemáticos de segundo orden. Los diseños experimentales más apropiados para estos casos son los diseños rotables y los diseños compuestos (Ayala y Pardo, 1995).

Dentro de los diseños rotables de segundo orden se incluyen:

- Diseño compuesto central.
- Diseño equirradial.
- Diseño Box Behnken.

Montgomery (2005) menciona, cuando el experimentador se encuentra relativamente cerca del óptimo, por lo general se requiere de un modelo que incorpore la curvatura para aproximar la respuesta, siendo el de segundo orden el más adecuado. La ecuación (7) ajustada de segundo orden es la siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} z_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^n \beta_{ij} z_i z_j + \varepsilon$$

Donde los  $\beta_i$  son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los  $\beta_{ii}$  son los coeficientes para los términos cuadráticos puros, los  $\beta_{ij}$  son los coeficientes para los términos de interacción y  $\varepsilon$  es el término del error aleatorio. Los términos cuadráticos puros y de interacción son de segundo orden (Montgomery, 2005).

Ayala y Pardo (1995) aseguran que los coeficientes del modelo matemático de segundo orden pueden ser estimados sometiendo los valores observados a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados), el cual puede llevarse a cabo bajo la forma de ecuaciones normales o en forma matricial, siendo esta última la más

recomendable por la facilidad que otorga para su ejecución en programas de computadora.

### **b.1. Diseño Compuesto Central (DCC)**

Tiene como característica esencial menor número de tratamientos que los factoriales completos. Son los diseños más utilizados y estudiados para ajustar un modelo de segundo orden (Montgomery, 2005).

En general, el DCC consiste en un diseño factorial  $2^k$  (cuando las variables son menores a cinco), además de puntos axiales ( $2^k$ ) en los ejes de coordenadas a una distancia  $(\pm\alpha, 0, 0, 0)$ ,  $(0, \pm\alpha, 0, 0)$ ,  $(0, 0, 0, \pm\alpha)$  del punto central del diseño, más los puntos replicados en el centro del diseño necesario para hallar la varianza del error experimental. Los puntos axiales fueron agregados al diseño factorial para proporcionar la estimación de la curvatura del modelo (Joglekar y May, 1987).

Según Montgomery (2005) este diseño se convierte en rotatable mediante la elección de  $\alpha$ , el valor de  $\alpha$  para la rotabilidad depende del número de puntos en la porción factorial del diseño; ésta se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = (n_F)^{1/4} \quad (8)$$

Donde:

$\alpha$ : Es la distancia al punto axial

$n_F$ : Es el número de puntos usados en la porción factorial del diseño.

Box y Draper (1987) señala algunas razones por las que deben incluirse las repeticiones en el punto central del diseño:

- Produce un buen perfil de la función.
- Minimiza el cuadrado medio del error.
- Permite hacer un análisis medio del error.
- Permite hacer un análisis de falta de ajuste a un modelo de segundo orden.
- Incrementa la robustez del diseño.

Al respecto, Montgomery (2005) afirma que de tres a cinco experimentos usados en el punto central son suficientes para alcanzar dichos objetivos. Por su parte, Box y Draper (1987) indican que, si quiere introducir más puntos centrales que lo sugeridos no hay ningún inconveniente, excepto por el costo adicional que

significa ejecutar más mediciones. En el Cuadro 4 se muestra el número de puntos y el valor  $\alpha$ , por el número de variables utilizadas.

**Cuadro 4.** Coordenadas del Diseño Compuesto Central.

Numero de variables X (k)	Número de puntos en 2 <sup>k</sup>			Total N	Valor de $\alpha$
	Factorial	Axial	Centro		
3	8	6	5	19	1.68
4	16	8	5	29	2.00
5	16	10	6	32	2.00
6	32	12	9	53	2.00

**FUENTE:** Cochran y Cox (1990).

### c. Función de deseabilidad

La función de deseabilidad de Derringer permite al analista encontrar las condiciones experimentales (niveles de factor) para alcanzar, al mismo tiempo, el valor óptimo para todas las variables evaluadas, incluidas las prioridades del investigador durante el procedimiento de optimización. El enfoque general consiste en convertir primero la respuesta  $y_i$  (valor estimado o predicho) en una función con condición de deseabilidad individual  $d_i$  que varía en el rango  $0 \leq d_i \leq 1$ , donde  $d_i = 0$  para una respuesta indeseable, y  $d_i = 1$  representa un valor completamente deseable, es decir, respuesta ideal. Los valores intermedios (0.6 y 0.8) indican una respuesta más o menos deseable (Candiotti *et al.*, 2014; Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010).

La función de deseabilidad individual a utilizar cuando se desea maximizar una respuesta es la siguiente:

$$d_i(y_i(x)) = \begin{cases} 0 & y_i(x) < L_i \\ \left( \frac{y_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & L_i \leq y_i(x) \leq U_i \\ 1 & y_i(x) > U_i \end{cases} \quad (9)$$

Donde  $U_i$  representa el objetivo de la respuesta, es decir, el valor máximo que se desea alcanzar;  $L_i$ , es el mínimo valor aceptable;  $s$ , es un valor de potencia llamado ponderación, establecido por el analista para determinar lo importante que es para  $y_i$  estar cerca del máximo.

Una vez que la  $n$  variable (niveles de factores y respuestas) se transforman en funciones de deseabilidad, se combinan en una única función llamada Deseabilidad

Global ( $D$ ), se define como la media geométrica ponderada de la deseabilidad individuales ( $d_i$ ), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D = (d_1 \times d_2 \dots \dots d_m)^{1/m} \quad (10)$$

Donde  $d_1, \dots, d_m$  corresponde a la función de deseabilidad individual para cada respuesta. Si  $D$  alcanza un valor diferente de cero, todas las variables que están siendo optimizados simultáneamente se puede considerar que tienen un valor deseable. Por otro lado, si una de las respuestas es completamente indeseable,  $D$  será cero (Candiotti *et al.*, 2014).

#### **d. Validación**

La validación de las respuestas se debe hacer con el fin de verificar las respuestas predichas generadas por MSR. Obtenido el modelo matemático de optimización y la combinación óptima de factores con los cuales se consigue la máxima optimización de la respuesta, se realiza la validación de los mismos contrastando el resultado obtenido experimentalmente (valor observado), con el obtenido por el modelo (valor predicho).

La idoneidad del modelo matemático generado para predecir la máxima optimización de la respuesta debe ser validada experimentalmente utilizando las condiciones determinadas en la optimización. Una vez que se tiene el modelo debidamente ajustado y validado se procede a explorar la superficie descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta, o bien, para determinar la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro. Si el modelo no explica un mínimo de 70% del comportamiento de la respuesta, en términos del  $R^2$  ajustada, no se recomienda utilizarlo para fines de optimización porque su calidad de predicción es mala.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Control de Calidad de Aguas, Laboratorio de Acuicultura (que contaba con el espectrofotómetro requerido), Química Orgánica y Química Analítica de la Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía (UNIA), ubicada en la Carretera a San José Km 0.5 en el Distrito de Yarinacocha, Provincia de Coronel Portillo, Departamento de Ucayali, Perú. Por otro lado, la liofilización del concentrado proteico se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Agraria de la Selva (Tingo María, Perú).

El análisis proximal se realizó por servicio en el “Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos” del Departamento Académico de Nutrición y la cuantificación de aminoácidos en “La Molina Calidad Total Laboratorios”, ambos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú).

#### **3.2. Material experimental, población y muestra**

##### **3.2.1. Material experimental**

El material biológico utilizado para la investigación fueron semillas de Huingo (*Crescentia cujete L.*), obtenidas a partir de frutos maduros recolectadas en el distrito de Yarinacocha, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali (zona centro oriente de Perú) en los meses de febrero y marzo del 2015. Estas semillas fueron acondicionadas de modo que sirvieron como materia prima para la extracción de la muestra experimental que fue la harina desgrasada de semilla de Huingo (HDSH).

##### **3.2.2. Población**

La población la representan todas las semillas de Huingo (*Crescentia cujete L.*), de frutos maduros que se desarrollan en el distrito de Yarinacocha, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, Perú.

##### **3.2.3. Muestra**

La muestra de semillas fue de 1.092 kg obtenidas de 42 frutos de Huingo (Anexo 8.3.1), calculado con la finalidad de obtener 350 g de harina desgrasada de semillas de

Huingo. Esta cantidad fue determinada en función de las necesidades de la investigación para experimentos realizados por triplicado.

### 3.3. Materiales y reactivos

#### 3.3.1. Materiales

- Bagueta
- Bolsa de polietileno de alta densidad
- Cubeta UV de vidrio y cuarzo
- Embudos Buchner
- Espátula y cuchara
- Fiolas de 25, 50, 100 y 250 mL.
- Frascos de vidrio ámbar de 150 y 250 mL
- Gradillas de plástico
- Lunas de reloj
- Magnetos
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100, 250 y 500 mL
- Matraces Kitasato de 500 y 1000 mL
- Micropipetas de 0-10, 0-50, 100-1000  $\mu$ L
- Mortero de porcelana
- Papel de aluminio
- Papel Whatman 601
- Parafilm
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL
- Pizetas
- Placa petri
- Probetas volumétricas de 10, 50, 100, 250 y 1000 mL
- Tamiz, malla N° 35
- Termómetro de mercurio (-20°C a 60°C)
- Tips para micropipeta
- Tubos de ensayo de 5 y 10 mL
- Tubos eppendorff de 1.5, 2, 2.5, 5 y 45 mL
- Vasos precipitados de 50, 100, 250, 600 y 1000 mL

#### 3.3.2. Reactivos

- Acetato de sodio anhidro ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Kossodo)
- Ácido clorhídrico (HCl) (Fisher)
- Agua destilada
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich)
- Alcohol
- Carbonato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Kossodo)
- Cloruro de sodio (NaCl) (Merck)
- Etanol absoluto (Sigma Aldrich)

- Éter de petróleo (Cimatec)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Kossodo)
- Reactivo Fenol Folin Ciocalteau (Merck)
- Sulfato cúprico pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) (Merck)
- Tartrato de sodio y potasio (Kossodo)

### 3.4. Equipos

- Agitador magnético calefactor (Velp Scientifica - 92960, 1200 rpm, 370°C)
- Balanza analítica (OHAUS - PA224, sensibilidad 0.0001 g)
- Bomba de vacío para filtración (Millipore, 34L/min)
- Campana de flujo laminar (ESCO - LVC-4A, filtro ULPA)
- Centrifuga (THERMO - D-37520, 5300 rpm)
- Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz (HANON - i8, 190-1100 nm)
- Estufa (MEMMERT, 30-250°C)
- Liofilizador de mesa (LABOTEC - 01.JL/12F8)
- Licuadora (Oster)
- Potenciómetro (BOECO - BT-675, pH 0-14,00, precisión ±0.01)
- Selladora manual
- Vórtex (ISOLAB, 0-2500 rpm)
- Baño maría (MRC - LHC-4A3, 5-100°C)

### **3.5. Métodos de análisis**

A continuación, se describen los métodos de análisis que se realizaron en la presente investigación, los mismos que se realizaron por triplicado.

#### **3.5.1. Análisis fisicoquímico**

Se realizó el análisis fisicoquímico a la harina de semilla de Huingo (Anexo 8.1.1), para sus distintas comparaciones y discusión. Estos análisis consistieron en la determinación de humedad, grasa, proteína, fibra y cenizas, en base a las normas de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (2005) (Anexo 8.4.2) mediante un servicio externo en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos del Departamento Académico de Nutrición de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima). Y constó de:

- Determinación de humedad (A.O.A.C. 950.46)
- Determinación de grasa (A.O.A.C. 2003.05)
- Determinación de proteína (A.O.A.C. 984.13)
- Determinación de fibra (A.O.A.C. 962.09)
- Determinación de ceniza (A.O.A.C. 942.05)

#### **3.5.2. Determinación de proteína total**

El contenido de proteína total fue determinado por el método de Kjeldahl (A.O.A.C. 984.13 - 2005), utilizando como factor de conversión de nitrógeno 6.25, se determinó para la harina (HSH), harina desgrasada (HDSH) y concentrado proteico de semillas de Huingo (CPSH) (Anexo 8.1). Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **3.5.3. Perfil de aminoácidos**

Se realizó sobre la harina de semillas de Huingo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa, en base a *Analytical Biochemistry* (1984), mediante un servicio externo en el Laboratorio La Molina Calidad Total de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima) (Se describe en el Anexo 8.4.3).



### 3.5.4. Determinación de proteína soluble

El contenido de proteína soluble se determinó sobre los sobrenadantes del centrifugado posterior a los tratamientos de extracción (Etapa II y III), con la finalidad de evaluar el rendimiento de la extracción. El método utilizado fue el de Lowry *et al.* (1951), ligeramente modificado usando una alta concentración de la solución alcalina de cobre para dar una curva de calibración más lineal (Hartree, 1972) (Anexo 8.4.5).

Este método está basado en la reacción de Biuret, donde el péptido obtenido de proteínas reacciona con el cobre bajo condiciones alcalinas formando enlaces y originando complejos coloreados, estos complejos cuproproteicos reducen al reactivo Folin Ciocalteu el cual vira a color azul oscuro y cuya intensidad depende proporcionalmente de los aminoácidos tirosina y triptófano.

El procedimiento realizado fue el siguiente: 400  $\mu$ L de muestra convenientemente diluida con suero fisiológico (0.09% NaCl) fue mezclado con 2 mL del reactivo D (contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% en 0.1M de NaOH, tartrato de sodio potasio al 4% en agua destilada y solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2% en agua destilada, estas tres soluciones fueron mezcladas en proporciones 100/1/1), el conjunto se agitó y reposó por 20 min a temperatura ambiente, luego a esta mezcla se añadió 400  $\mu$ L del reactivo Folin Ciocalteu (diluido en proporción 1/1 en agua destilada), el conjunto se agitó y reposó por 40 min a temperatura ambiente en oscuridad y luego se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 750 nm contra un blanco preparado con suero fisiológico (0.09%). Los resultados fueron expresados en mg/mL utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones (Anexo 8.4.4).

### 3.5.5. Rendimiento de proteína

El rendimiento de la extracción de proteína de la HDSH, fue calculado para las Etapas II y III, utilizando la siguiente formula:

$$\text{Rendimiento de proteína (\%)} = \frac{\text{g Proteína soluble en el sobrenadante (Lowry)}}{\text{g Proteína total en la muestra HDSH (Kjeldahl)}} \times 100$$

### 3.5.6. Capacidad de absorción de agua (CAA)

Se realizó para la caracterización del concentrado proteico (Etapa IV). Se utilizó el método reportado por Ajibola *et al.*, (2016), con algunas modificaciones. La muestra (300 mg) fue dispersada en 5 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga previamente pesado. La dispersión fue vortexada por 1 min, reposada por 30 min y

centrifugada a 5300 rpm por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue decantado y el agua excedente fue drenada. El tubo conteniendo el residuo proteico fue pesado nuevamente para determinar la cantidad de agua retenida por gramo de muestra.

### **3.5.7. Capacidad de absorción de lípidos (CAL)**

Se realizó para la caracterización del concentrado proteico (Etapa IV). Se utilizó el método reportado por Ajibola *et al.*, (2016), con algunas modificaciones. La muestra (300 mg) fue dispersada en 5 mL de aceite de maíz en un tubo de centrífuga previamente pesado. La dispersión fue vortexada por 1 min, reposada por 30 min y centrifugada a 5300 rpm por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue decantado y el aceite excedente fue drenado. El tubo conteniendo el residuo proteico fue pesado nuevamente para determinar la cantidad de aceite retenido por gramo de muestra.

### **3.5.8. Capacidad de formación y estabilidad de la espuma (CFE, CEE)**

La evaluación de formación de espuma y estabilidad se realizó de acuerdo a la metodología de Armenta (2012), con ligeras modificaciones. Se pesó 0.5 g de concentrado proteico y se solubilizó en 100 mL de agua destilada. La solución fue agitada a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente, con una batidora de mano electrónica. Inmediatamente la espuma formada fue transferida a una probeta graduada y se midió el volumen de espuma formado. Se reportó como porcentaje (%CFE) y se calculó con la siguiente ecuación:

$$(\%CFE) = \frac{Vol. Total después de agitado - Vol. Antes de agitado}{Vol. Antes de agitado} \times 100$$

El material anterior reposó durante una hora a temperatura ambiente y al final se midió el volumen de espuma residual, su estabilidad se expresó como porcentaje de estabilidad de espuma (%EE) y fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\% CEE = \frac{Vol. Espuma después de reposo}{Vol. Inicial de espuma} \times 100$$

Luego de medir el volumen total del batido, se tomó nota del volumen de la espuma del recipiente para estudios de estabilidad de espuma a 10, 30 y 60 minutos.

### **3.6. Metodología experimental**

#### **3.6.1. Acondicionamiento de la muestra**

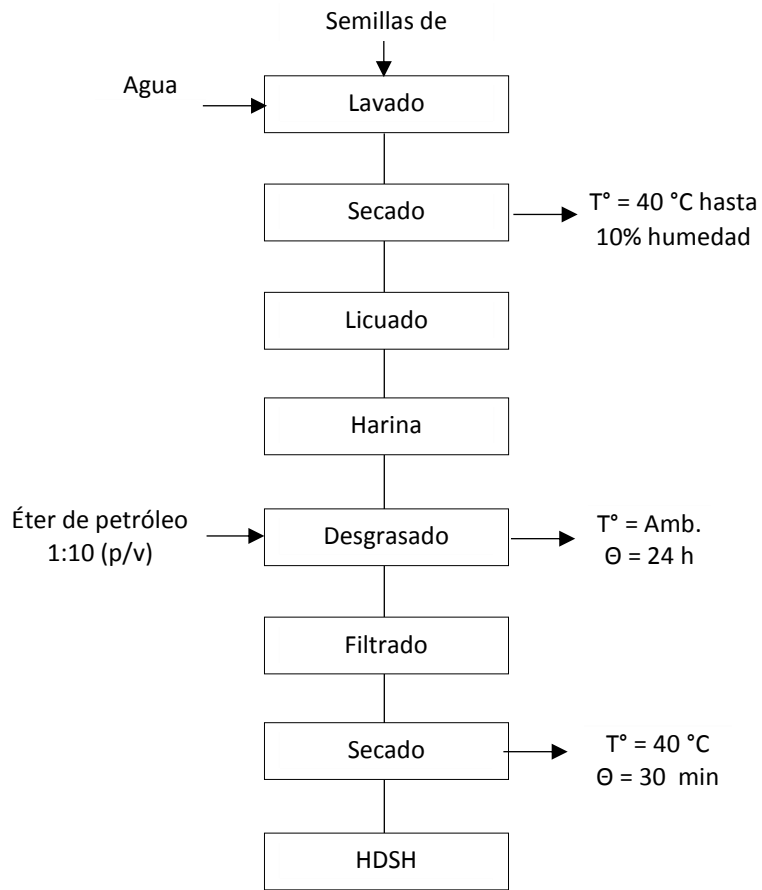
Como se ha referido anteriormente, la muestra para la presente investigación fue la harina desgrasada de semillas de Huingo, la cual se obtuvo siguiendo la metodología de Martínez *et al.*, (2011) y Guerrero-Ochoa *et al.*, (2015), con algunas modificaciones.

Las semillas de Huingo fueron lavadas en una bandeja con sustituciones sucesivas de agua, secadas en estufa a 40°C hasta alcanzar peso constante. Se procedió a licuarlas y molerlas hasta obtener una harina capaz de pasar por una malla N° 35 (500µm), cuya finalidad es facilitar el proceso de extracción proteica. La harina obtenida fue desgrasada con éter de petróleo en una relación de harina/solvente de 1/10 (g/mL), utilizando agitación magnética continua a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se filtró a vacío y el éter de petróleo excedente se eliminó por evaporación colocando la muestra en la estufa a 40°C por 30 minutos. La harina así obtenida, se empacó herméticamente en bolsas de polietileno y se almacenó a 4°C hasta su uso. El diagrama de flujo para la obtención de harina desgrasada de semillas de Huingo, se muestra en la Figura 8.

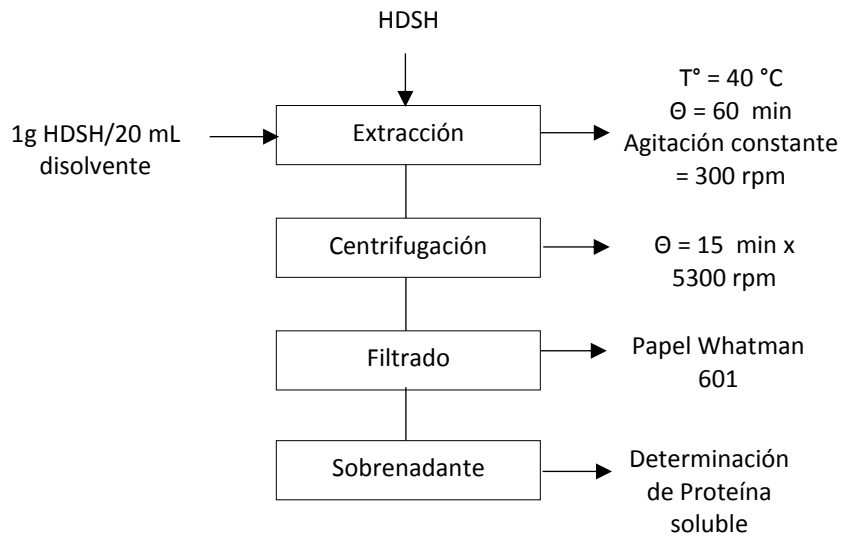
#### **3.6.2. Determinación del solvente de extracción**

Se basó en la metodología descrita por Shridhar *et al.*, (2012) con algunas modificaciones. Los disolventes acuosos que se utilizaron para evaluar la solubilización de la mayor cantidad de proteínas a partir de la HDSH fueron: A) agua destilada, B) 2 M NaCl, C) 0.05 M Buffer de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.5), D) 0.1 M de borato de solución salina buffer (BSB, 0.1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.025 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.75 M NaCl, pH 8.45), E) 0.1 M NaOH, F) 70% (v/v) etanol acuoso (EtOH). El pH de la suspensión se ajustó usando HCl 1 M y NaOH 1 M.

En un matraz de 50 mL se pesó 1 g de harina desgrasada de semillas de Huingo y se disolvió con 20 mL de cada disolvente. Luego se llevó a baño maría bajo agitación constante (300 rpm) a temperatura de 40 °C durante 60 min. Al final del período de extracción, la suspensión se centrifugó a 5300 rpm por 15 min. Se recogió el sobrenadante, se filtró al vacío (papel Whatman 601) y se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry *et al.* (1951) (Anexo 8.4.5). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El diagrama de flujo para determinar el solvente de extracción, se muestra en la Figura 9.



**Figura 8.** Diagrama de flujo del proceso de obtención de la HDSH  
**FUENTE:** Elaboración propia.



**Figura 9.** Diagrama de flujo para determinar el solvente de extracción  
**FUENTE:** Elaboración propia.

### **3.6.3. Extracción alcalina y obtención de extracto proteico**

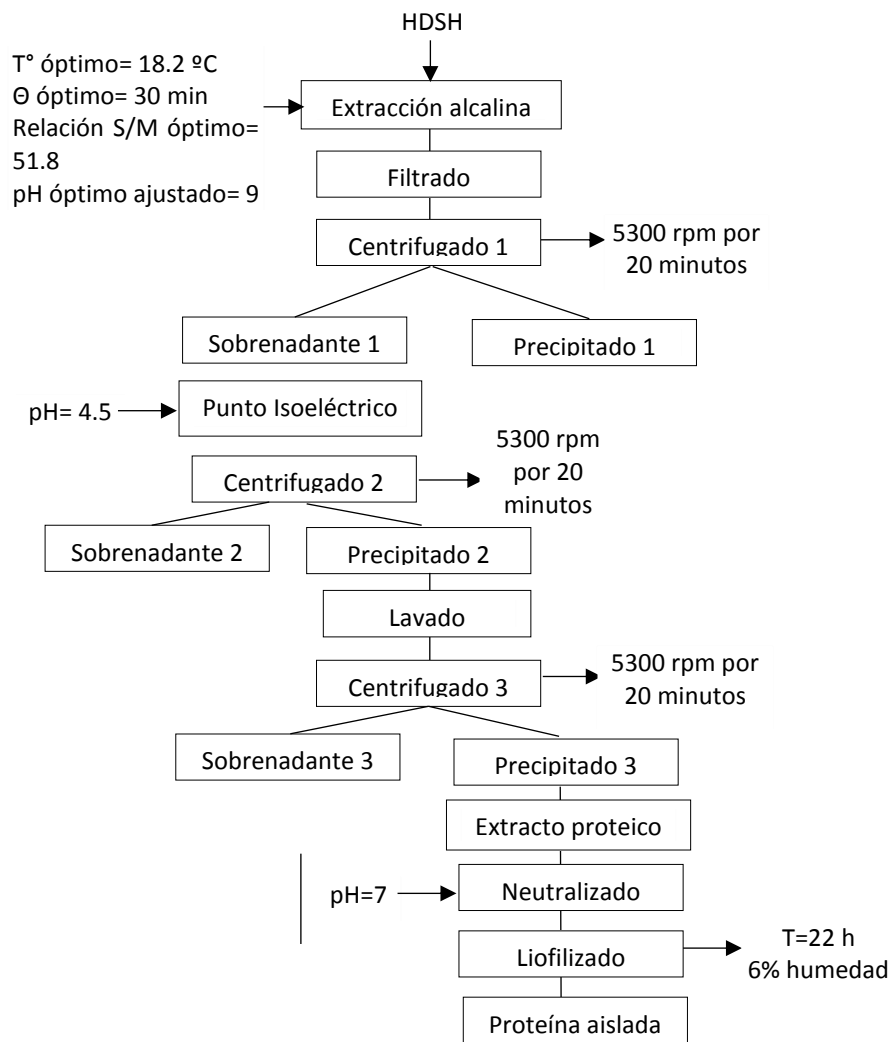
Se basó en la metodología descrita por Chee y Ayob (2013) y Guerrero-Ochoa *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se consideraron cuatro factores (variables independientes): tiempo, temperatura, relación solvente/muestra y pH (Wani *et al.*, 2008; Urrutia, 2010; Armenta, 2012; Chee y Ayob, 2013; Jarpa-Parra *et al.*, 2014; Guerrero-Ochoa *et al.*, 2015).

En un matraz de 50 mL se pesó 1 g de la harina desgrasada de semillas de Huingo y se disolvió con 10 mL de agua destilada. Se adicionó NaOH 6N, hasta ajustar al pH requerido para los ensayos (pH 7 a 9), seguidamente se añadió la solución restante para completar los 15 mL de solvente, para obtener la relación materia prima/solvente 1/15 (p/v) (se realiza el mismo procedimiento cuando varía la relación materia prima/solvente entre 1/15 a 1/35 p/v), según diseño experimental. Luego se llevó a baño maría bajo agitación constante (300 rpm) a una determinada temperatura (20 a 40 °C) y tiempo de extracción (20 a 40 min) en relación con el diseño experimental. Al final de la extracción, la suspensión se centrifugó a 5300 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, obteniendo un sobrenadante el cual se filtró a vacío utilizando papel Whatman 601 y se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry *et al.* (1951) (Anexo 8.4.5). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Luego de la extracción proteica en medio alcalino, el sobrenadante se sometió a precipitación isoeléctrica con HCl hasta llegar a su punto isoeléctrico (pI) de 4.5; determinado previamente. Esta solución se dejó reposar en refrigeración (4 °C) por 24h hasta que termine el proceso de precipitación de la mayor cantidad posible de proteínas. Terminada las 24 h se volvió a centrifugar a 5300 rpm por 20 min y se midió el volumen del precipitado para posteriormente lavarlo con 3 volúmenes de agua destilada, manteniendo siempre a pH 9 (pH óptimo). El extracto obtenido, ya lavado, se procedió a neutralizarlo, ajustándolo a pH 7 con NaOH 6N, luego se almacenó hasta su posterior liofilización. El diagrama de flujo del proceso se muestra en la Figura 10.

### **3.6.4. Concentrado de proteínas**

El concentrado de proteínas se llevó a cabo mediante el proceso de liofilización, el cual consiste en una previa congelación de la muestra y la sublimación directa del hielo a presión subatmosférica, con el fin de estabilizar y conservar el producto, reduciendo las pérdidas de compuestos lábiles y aquellos responsables del sabor y aroma (Orrego, 2008).



**Figura 10.** Diagrama de flujo general para la extracción alcalina y obtención de proteínas aisladas (concentrado proteico).

**FUENTE:** Elaboración propia.

El proceso realizado para el concentrado de proteínas fue el siguiente: El extracto proteico en cantidad de 236 mL se almacenó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y luego se colocó en un liofilizador de mesa durante 22 horas hasta que la muestra estuvo completamente seca, llegando a 6% de humedad. De esta manera se obtuvo proteínas concentradas de semillas de huingo, el cual se empacó en papel impermeable aluminizado y se almacenó a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior caracterización.

### 3.7. Diseño experimental

La investigación se realizó haciendo uso de dos diseños experimentales: (a) Diseño factorial de media fracción con réplicas en el punto central (primer orden) para el *screening* o tamizaje de factores experimentales con efectos significativos sobre el rendimiento de la extracción, y (b) Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) (segundo orden) mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta (RSM) para la determinación del modelo matemático que represente al proceso de extracción y la determinación de la mejor combinación de factores (variables) significativos que permitan maximizar el rendimiento de la extracción. Para la selección y diseño se utilizó el software estadístico *statgraphics Centurion XVI* (Statpoint Technologies Inc., 2013).

#### 3.7.1. Diseño para el *Screening* o tamizaje

Creada con la finalidad de determinar cuál(es) variable(s) son las más importantes para la extracción de proteína de harina desgrasada de las semillas de Huingo (HDSH). En esta etapa se consideraron los siguientes factores o variables:

Variables independientes: tiempo ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ), relación solvente/muestra ( $X_3$ ) y pH ( $X_4$ ).

Variable dependiente: Y (rendimiento de extracción de proteínas).

Por lo tanto, los factores (variables) más eficientes podrían reducir los experimentos posteriores, lo que requiere un menor número de pruebas. El diseño seleccionado fue un Factorial de media fracción  $2^{k-1}$ , con réplicas en el punto central, lo cual sirve para dar una estimación promediada del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995; Jarpa-Parra *et al.*, 2014). Éste fue corrido en 13 experimentos: 8 corridas del diseño de media fracción más 5 puntos centrales. Cada variable fue codificada en tres niveles: -1, 0 y 1; como se muestra en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Variables independientes y sus niveles evaluados en el *screening*

Variable Independiente	Codificado	No codificado	Niveles		
			-1	0	1
Tiempo (minutos)	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	20	30	40
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	20	30	40
Relación solvente/muestra (mL/g)	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	15	25	35
pH	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	7	8	9

**FUENTE:** Elaboración propia

Los factores y sus niveles (mínimo y máximo) fueron establecidos en base a la literatura (Wani *et al.*, 2008; Urrutia, 2010; Armenta, 2012; Jarpa-Parra *et al.*, 2014; Guerrero-Ochoa *et al.*, 2015) y de las pruebas preliminares. La importancia de cada factor en la etapa de *screening* se determinó mediante el diagrama de Pareto estandarizado y el análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha=0.05$ ).

### 3.7.2. Diseño para la optimización

Los factores que fueron identificados como significativos en la etapa anterior (*Screening*), se optimizaron mediante la metodología de superficie de respuesta y la función de deseabilidad. El análisis de superficie de respuesta de segundo orden para Y, se realizaron mediante un Diseño Compuesto Central Rotable (Ayala y Pardo, 1995; Quanhong y Caili, 2005; Wani *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2010; Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010; Chee y Ayob, 2013). El número de corridas se calculó con la siguiente fórmula:

$$N=2^k + 2K + n_0, \text{ en la que } K= 3 \text{ y } n_0= 5$$

Donde:

Corridas del 1 al 8: Un factorial  $2^k = 2^3$  (ocho experimentos principales)

Corridas del 9 al 14:  $2K = 2(3)$  Seis puntos axiales o estrellas en los ejes coordenadas (a una distancia  $\alpha$ ).

Corridas del 15 al 19:  $n_0$  (Cinco puntos centrales replicados, para la estimación de la suma de cuadrados del error puro)

Así, el número de corridas resultó ser diecinueve.

Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró  $\alpha = (n_i)^{1/4} = (8)^{1/4} = 1.682$  que, garantiza un diseño central compuesto rotatable (Montgomery, 2005). Cada variable fue codificada en cinco niveles: -1.682; -1; 0; 1 y 1.682; como se muestra en el Cuadro 6.



**Cuadro 6.** Variables independientes y sus niveles evaluados en la optimización

Variable Independiente	Codificado	No codificado	Niveles				
			-1.628	-1	0	1	1.628
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	18.2	25	35	45	51.8
Relación solvente/muestra (mL/g)	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	9.8	20	35	50	60.2
pH	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	6.8	7.5	8.5	9.5	10.2

**Fuente:** Elaboración propia

Las variables independientes  $X_i$  se codificaron como  $x_i$ , que se define como adimensional, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (11)$$

Donde  $x_i$  es el valor adimensional de una variable independiente;  $X_i$  es el valor real de una variable independiente;  $X_0$  es el valor real de una variable independiente en el punto central;  $\Delta X_i$  es el valor de cambio gradual. Cada experimento fue realizado por triplicado. Los códigos específicos son:

$$x_2 \text{ (Temperatura)} = (X_2 - 35) / 10$$

$$x_3 \text{ (Relación s/m)} = (X_3 - 35) / 15$$

$$x_4 \text{ (pH)} = (X_4 - 8.5) / 1$$

El modelo propuesto para la variable respuesta, rendimiento de extracción de proteínas (Y), fue analizado y ajustado a un modelo de segundo orden, que incluye la curvatura de la superficie y la dependencia de dicha respuesta en función de los factores bajo estudio. Dicho polinomio de segundo orden (cuadrática) corresponde a la ecuación (12):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k=3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k=3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^{k=3} \sum_{i < j}^{k=3} \beta_{ij} x_i x_j$$

Donde:

Y: Rendimiento de proteína estimado (% g de proteína soluble/100 g de proteína total)

$\beta_0$ : Es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño.

$\beta_i$ : Coeficientes de regresión lineal.

$\beta_{ii}, \beta_{ij}$ : Coeficientes de regresión cuadráticos.

$x_i, x_j$ : Variables independientes o factores.

$k$ : Número de variables independientes o factores.

Posteriormente, se realizó el ANOVA y la prueba de significancia de los coeficientes del modelo estimado ( $p < 0.05$ ). La prueba de bondad de ajuste de la ecuación de regresión de las observaciones experimentales fue verificada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ). También

se realizó la gráfica de dispersión, relacionando los resultados observados con los estimados (predichos).

Con la finalidad de brindar una visión panorámica de la variación del rendimiento de extracción de proteínas (Y) en función a los factores estudiados, se graficó la superficie de respuesta (tridimensional) correspondiente a la Ecuación 12, que representa el efecto de dos factores sobre la respuesta. Las condiciones óptimas se determinaron utilizando el software Statgraphics Centurión XVI. El software se configuró con la finalidad de encontrar una deseabilidad óptima para la variable respuesta, siendo el máximo rendimiento de proteína (Y, %).

### **3.7.3. Función de deseabilidad**

Los valores estimados o predichos ( $Y_i$ ) se transforman en un valor de deseabilidad individual ( $d$ ), que varía en el rango  $0 \leq d < 1$ , y mide el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo destinado a ser alcanzado. En este caso se ha querido que la variable dependiente sea lo más alto posible. El valor óptimo ideal es  $d = 1$ ; pero un valor aceptable puede ser entre 0.6 y 0.8 (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010). El valor  $d$  se incrementa conforme a la deseabilidad de la variable respuesta se incrementa (Derringer y Suich 1980). En la función de deseabilidad individual, se utilizó el programa Statgraphics Centurión XVI.

### **3.7.4. Validación del modelo**

Las condiciones óptimas de los niveles de las variables independientes en la extracción de proteínas, se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta. Para la validación se realizó la verificación de los resultados, contrastando el resultado obtenido experimentalmente (con los niveles óptimos de las variables independientes) (valor observado), con el obtenido por el modelo (valor predicho o estimado por el modelo), esta evaluación fue realizada considerando tres repeticiones experimentales.

## **3.8. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos correspondientes a la metodología superficie de respuesta (MSR) en la extracción alcalina, se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurión XVI versión 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., 2013. Warrenton, VA, US). Para la representación gráfica de los diagramas de superficies de respuesta se utilizó el *software* Statistica 10 (Statistica, Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización fisicoquímica y nutricional de las semillas de Huingo

#### 4.1.1. Caracterización fisicoquímica

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del análisis fisicoquímico realizado a la harina de las semillas de Huingo (HSH), cada análisis se realizó por triplicado, de acuerdo a la metodología reportada por la AOAC (2005).

**Cuadro 7.** Composición química de las harinas de semilla de *Crescentia cujete* L.

Análisis	HSH	HDSH
a. Humedad	10.28 %	10.07%
b. Proteína Total <sup>1</sup>	16.94 %	22.63%
c. Grasa	27.30 %	
d. Fibra cruda	22.44 %	
e. Ceniza	2.30 %	
f. ELN <sup>2</sup>	20.74 %	

<sup>1</sup>Factor de conversión de nitrógeno = N x 6.25

ELN<sup>2</sup> = Extracto Libre de Nitrógeno

El resultado del análisis reveló que el contenido de proteína en harina de semillas de *Crescentia cujete* fue menor (16.94%) que al reportado por Smith y Dollear (1947), (30.25%) para la misma especie, posiblemente se debe al lugar de procedencia de la semilla, las diferentes condiciones climáticas donde se desarrollaron o su tratamiento poscosecha (Ruíz *et al.*, 2013), es similar a las semillas de sandía (16.34%) reportado por Wani *et al.*, (2008), pero superior al contenido proteínico reportado para otra especie similar, la *Crescentia alata* (6.32-7,04%) (Luna, 2007); y superior también a otras semillas de consumo habitual como es el caso del maíz (10%), trigo (14%), arroz (8%) y avena (15.3%) (Lazcano y Cuellar, 2004). Valor que justifica el uso potencial de la semilla de *Crescentia cujete* como fuente de proteína para dietas de humanos y animales.

El contenido de lípidos en la harina de *Crescentia cujete* (27.30%) fue menor que el reportado por Smith y Dollear (1947), (34.10%) pero más alto que el reportado para otras semillas oleaginosas de importancia comercial, como lo es la soya (24%) y la de algodón (22-24%), lo que confirma a la semilla de Huingo es una fuente importante de lípidos (Simaj *et al.*, 2004; Zamora *et al.*, 2001; Madhukar *et al.*, 2013).

El resultado para el análisis de fibra mostró un contenido total de 22.44%, mayor al reportado por Smith y Dollear (1947), para la misma variedad de *Crescentia* (12.98%), y menor al reportado por Luna, 2007 para *Crescentia alata* (33.36-37.95%). El contenido de humedad y ceniza se encuentra entre los rangos de semillas estudiadas anteriormente. El contenido de proteína total de la harina desgrasada de semillas de Huingo (HDSH) también se muestra en el Cuadro 7.

El valor de proteína aumentó en un 5.7% luego del desgrasado con éter de petróleo (22.63%), y este valor se usó como valor base para los cálculos posteriores. También se observa el contenido de humedad (10.7%). El contenido de proteína de harina desgrasada de semilla de Huingo supera a las proteínas de semillas de amaranto (14.7%) y torta de palma con 16.9% (Chee y Ayob, 2013), es similar a las semillas de garbanzo con 22.7% y semillas de pimiento con 26.02% (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010); pero es menor en comparación con las semillas de girasol con 31.2% (Vioque *et al.*, 2001), semillas de tomate (31.3 %) (Lqari *et al.*, 2002) y semillas de ajonjolí (47.7%) (Khalid *et al.*, 2003). Esta diferencia puede ser atribuida al método de extracción de grasa o el tipo de solvente (López *et al.*, 2009; Badwaik *et al.*, 2012).

Murray (2005) menciona que para aumentar la concentración de proteínas en el producto seco se debe desgrasar la materia prima antes de la extracción de proteína debido a que la grasa diluye la proteína; además, la presencia de la grasa en el producto seco puede conducir a rancidez y otros problemas relacionados con la grasa, incluyendo escasa solubilidad y aglomeración en la extracción de proteínas.

#### **4.1.2. Evaluación nutricional**

Para la caracterización nutricional se realizó el análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa, en base a *Analytical Biochemistry* (1984), mediante un servicio externo en el Laboratorio La Molina Calidad Total de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 8.4.3).

En el Cuadro 8 se muestra la composición de aminoácidos en semillas de *C. kujete*, determinado junto con la composición en otras semillas. Allí se puede observar que las semillas del Huingo contienen 17 aminoácidos, de los cuales nueve son esenciales: treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, arginina y triptófano; los que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser aportados por la dieta o en caso contrario pueden producir trastornos en la salud.

**Cuadro 8.** Composición en aminoácidos de *C. kujete* y otras semillas (g AA/100 g muestra)

Aminoácidos	<i>C. kujete</i> *	Quinoa (Cervilla <i>et al.</i> , 2012)	Vicia disperma (Megias <i>et al</i> 2015)	Garbanzo (Boye <i>et al.</i> , 2010)	Frejol (Boye <i>et al.</i> , 2010)	Arroz (FAO, 1970)	Chía (Sandoval, 2012)*
Ác. Aspártico	0.06	0.84	0.04	0.58	1.36	0.81	0.05
Ác. Glutámico	0.17	1.47	0.11	1.67	1.88	1.62	0.07
Serina	0.03	0.11	0.03	0.12	0.61	0.43	0.03
Glicina	0.04	0.66	0.09	0.26	0.43	0.39	0.02
Histidina	NC	0.90	0.10	0.24	0.30	0.20	0.01
Treonina	0.09	0.35	ND	0.06	0.26	0.31	0.02
Alanina	0.01	0.48	0.01	0.26	0.30	0.47	0.03
Arginina	0.08	0.89	0.11	0.48	0.42	0.65	0.04
Prolina	0.07	0.09	ND	0.24	0.38	0.37	0.02
Tirosina	0.01	0.28	0.14	0.19	0.45	0.28	0.02
Valina	0.02	0.71	0.01	0.38	0.65	0.43	0.03
Metionina	0.01	0.11	0.02	0.12	0.23	0.18	0.02
Isoleucina	0.02	0.43	0.01	0.36	0.54	0.30	0.02
Leucina	0.04	0.71	0.01	0.48	0.72	0.65	0.04
Fenilalanina	0.06	0.43	0.01	0.42	0.69	0.41	0.02
Lisina	0.02	0.6	0.01	0.91	0.83	0.30	0.03
Triptófano	0.91	ND	ND	0.91	ND	ND	-

ND=No detectado

NC=No cuantificable (por debajo del punto más bajo de la curva de calibración: 100-1000pmol).

\* g aminoácido/g muestra en base seca.

Se observó una mayor proporción de ácido glutámico, treonina y arginina. El alto contenido de ácido glutámico es de suma importancia, ya que los alimentos con altos niveles de este aminoácido resultan de interés en la industria alimentaria debido al fortalecimiento del sistema inmune, a la estimulación del sistema nervioso central y al mejoramiento de la condición en deportistas (Blenford, 1996), las fuentes ricas en arginina colaboran en la prevención de enfermedades cardíacas (Pszczola, 2000), características muy favorables para el consumo de esta semilla.

De igual modo, se observó un alto contenido en aminoácidos aromáticos (triptófano y fenilalanina), representando beneficios a la salud debido a que ayudan a regular los niveles adecuados de serotonina en el cerebro, intervienen en la regulación hormonal y del sistema nervioso (Blenford, 1996).

La lisina es uno de los aminoácidos esenciales más escasos en los alimentos de origen vegetal, y en las semillas del Huingo se encontró en baja proporción, similar resultado se obtuvo en harina de quinua (Ranhotra *et al.*, 1993), mientras que, para los restantes aminoácidos esenciales, los aportes son semejantes. Esta información

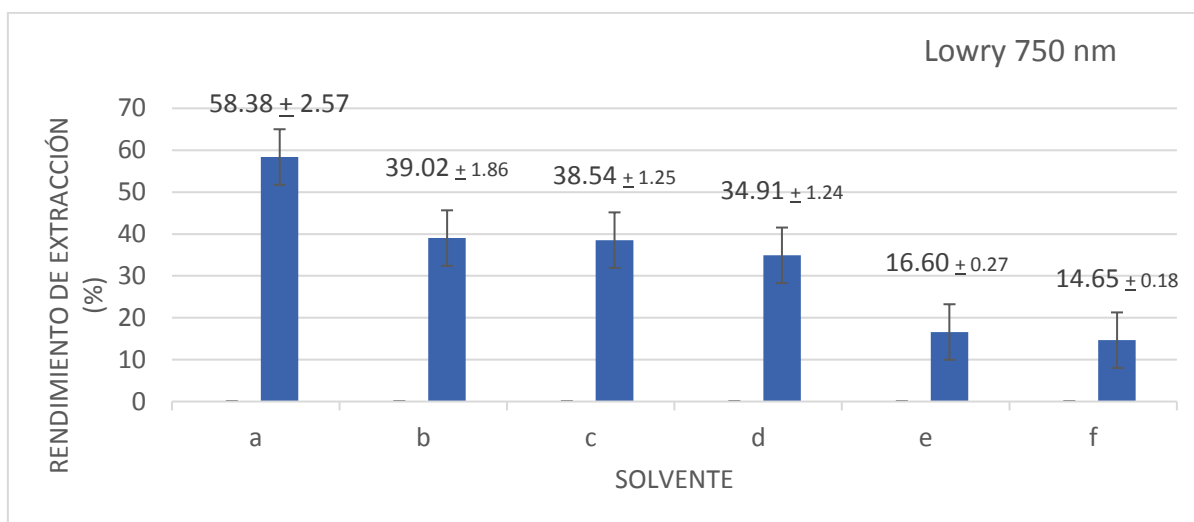
es de utilidad para la formulación en dietas para adultos, y para el caso de dietas para niños debe ser complementada por leguminosas u otro alimento rico en lisina.

Estos niveles de aminoácidos son más bajos que los de la mayoría de proteínas animales como los valores de la carne de vaca, el huevo y la leche de vaca (Bodwell *et al*, 1985). Sin embargo, todos los aminoácidos esenciales de la semilla del Huingo están dentro del rango de los valores revisados en la referencia de la FAO/OMS/UNU (1985). Al igual que las proteínas de la semilla de Huingo, las proteínas de otras semillas oleaginosas muestran un alto contenido de ácido glutámico, ácido aspártico y arginina, lo que demuestra que la semilla de Huingo tiene una composición de aminoácidos similar a otras semillas oleaginosas (Bodwell y Hopkins., 1985).

Al comparar la composición de aminoácidos de semillas de Huingo con otras semillas se puede observar que se obtuvieron resultados similares en todos los aminoácidos, y a pesar de las bajas proporciones aminoacídicas detectadas a comparación de otras semillas, es de gran valor destacar que la calidad de una proteína no puede ser juzgada únicamente en relación al patrón de referencia, ya que cuando es comparada con los patrones de requerimientos de aminoácidos esenciales para cada edad, puede resultar inadecuada para el niño y ser adecuada para el adulto.

#### 4.2. Determinación del solvente de extracción de proteínas

En la Figura 11 se muestra un gráfico de barras sobre el rendimiento de extracción utilizando seis solventes para la extracción sobre las proteínas de la harina desgrasada de semillas de Huingo, determinando el contenido de proteína soluble según Lowry *et al.*, (1951) (Anexo 8.4.5).



**Figura 11:** Rendimiento de extracción de las proteínas con diferentes solventes.

**FUENTE:** Elaboración propia

Las proteínas de la harina desgrasada de semillas de Huingo fueron solubilizadas con los siguientes solventes:

- a) 0.1 M NaOH
- b) 0.1 M Buffer Borato Salino
- c) 0.05 M Buffer Fosfato
- d) 0.1 M NaCl
- e) EtOH 70%
- f) H<sub>2</sub>O destilada.

Se observa que el agua fue el disolvente menos eficaz para solubilizar las proteínas, con un rendimiento de extracción del 14.65%. El mayor porcentaje de solubilidad (58.38%) se obtuvo con NaOH, quien fue el disolvente más eficaz para solubilizar las proteínas de la HDSH. Según Vioque, (2001), aunque muchas de las proteínas vegetales son solubles a pH próximos a la neutralidad, se prefiere extraer las proteínas a pH alcalinos para favorecer la solubilización de las proteínas desnaturalizadas durante la preparación de los concentrados. Además, algunas proteínas, como las glutelinas, requieren pH alcalinos para ser extraídas. Se puede decir entonces que las semillas de *C. cujete* contienen una importante cantidad de glutelinas ya que son más solubles bajo condiciones alcalinas; es así que del lado alcalino las proteínas de *C. cujete* tendrán una carga neta negativa probablemente mayor que la carga neta positiva que presenta en medio ácido, de este modo las fuerzas repulsivas a pHs alcalinos serán más importantes que las fuerzas de atracción aumentando la solubilidad (Abugoch, 2006).

El hidróxido de sodio como solvente alcalino, solubilizó mejor las proteínas de las semillas de Huingo, respaldando a Pinciroli *et al.*, (2006); Rivera (2006) y Urrutia (2010), los cuales refieren que la solubilización de las proteínas debe llevarse a cabo con un solvente alcalino. Por ejemplo, Bejarano, 2008, extrajo proteínas de *Amaranthus sp*, mediante la solubilización alcalina a pH 9. Así mismo Jayasena *et al.*, (2010), evaluaron los parámetros de solubilización de proteínas de *Lupinus mutabilis sweet*, identificando que la máxima solubilización ocurre a pH alrededor de 9.

Sin embargo, se sabe también que la exposición a bases fuertes o alcalinas alteran a las proteínas a través de la desamidación de aminoácidos y por lo tanto pueden alterar las propiedades de las proteína (Zhao *et al.*, 2011); así también, Callisaya y Alvarado (2009), indican que los tratamientos alcalinos altos (pH>9) afectan negativamente a los aminoácidos azufrados y a otros aminoácidos esenciales tales como la lisina, generando lisino-alanina, además de causar desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, bajando así la calidad del concentrado proteico posterior. Es importante mencionar el resultado observado para la solubilización con NaCl (34.91%), el cual no fue muy eficaz para extraer las proteínas posiblemente debido a la naturaleza no polar de la superficie de las proteínas de *C. cujete*,

ocurriendo un fenómeno conocido como precipitación salada y también observada con proteínas de soja (Lee *et al.*, 2003).

### 4.3. Optimización de la extracción de proteínas

#### 4.3.1. Screening o cribado

Se evaluaron cuatro variables o factores diferentes durante la selección de las variables significativas que participan en la extracción de proteína a partir de la harina desgrasada de las semillas de Huingo. Estas cuatro variables: tiempo, temperatura, relación solvente/muestra y pH, se ensayaron usando un diseño factorial de media fracción. Estas variables fueron evaluadas en tres niveles para identificar los que tienen un impacto significativo en el rendimiento de la extracción de proteína. Las variables fueron codificadas (Cuadro 9) y los niveles fueron determinados en base a experimentos preliminares y a diferentes fuentes literarias (Wani, *et al.*, 2008; Urrutia, 2010; Armenta, 2012; Jarpa-Parra *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 2015).

Con la aplicación del diseño factorial de media fracción se ha generado una matriz de trece corridas experimentales durante la etapa de *Screening*. La adición de pruebas en el punto central del diseño, sirve para dar una estimación del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995) (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Diseño de *screening* o cribado con las variables codificadas y no codificadas: Factorial de media fracción  $2^{4-1}$

Corrida	Variables codificadas				Variables no codificadas				Rendimiento en proteína (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	
1	-1	-1	-1	-1	20	20	15	7	9.1 ± 0.17
2	1	-1	-1	1	40	20	15	9	24.85 ± 0.29
3	-1	1	-1	1	20	40	15	9	37.14 ± 2.76
4	1	1	-1	-1	40	40	15	7	13.17 ± 0.78
5	-1	-1	1	1	20	20	35	9	41.81 ± 0.95
6	1	-1	1	-1	40	20	35	7	20.79 ± 0.89
7	-1	1	1	-1	20	40	35	7	23.16 ± 1.28
8	1	1	1	1	40	40	35	9	45.19 ± 0.08
9	0	0	0	0	30	30	25	8	26.71 ± 0.59
10	0	0	0	0	30	30	25	8	26.87 ± 0.45
11	0	0	0	0	30	30	25	8	26.87 ± 0.45
12	0	0	0	0	30	30	25	8	27.03 ± 0.45
13	0	0	0	0	30	30	25	8	25.43 ± 0.35

X<sub>1</sub>: Tiempo (min), X<sub>2</sub>: Temperatura (°C), X<sub>3</sub>: Relación solvente/muestra RS/M (ml/g) y X<sub>4</sub>: pH.

El Cuadro 9 muestra los resultados del rendimiento en proteína para cada corrida experimental según el diseño de *Screening*, en el cual se puede observar que los valores experimentales de rendimiento en proteína están dentro del rango 9.1-45.19%,



donde el rendimiento más bajo (9.1%) se encontró en la corrida número 1, perteneciente a la combinación: tiempo 20 minutos, temperatura 20 °C, RS/M 15ml/gr y pH 7, respectivamente; el porcentaje de rendimiento más alto (45.19%) resultó de la combinación: tiempo 40 minutos, temperatura 40°C, RS/M 35 ml/gr y pH 9, perteneciente a la corrida número 8; indicando con ello que este punto (corrida) se encontraría en la región más cercana a la óptima.

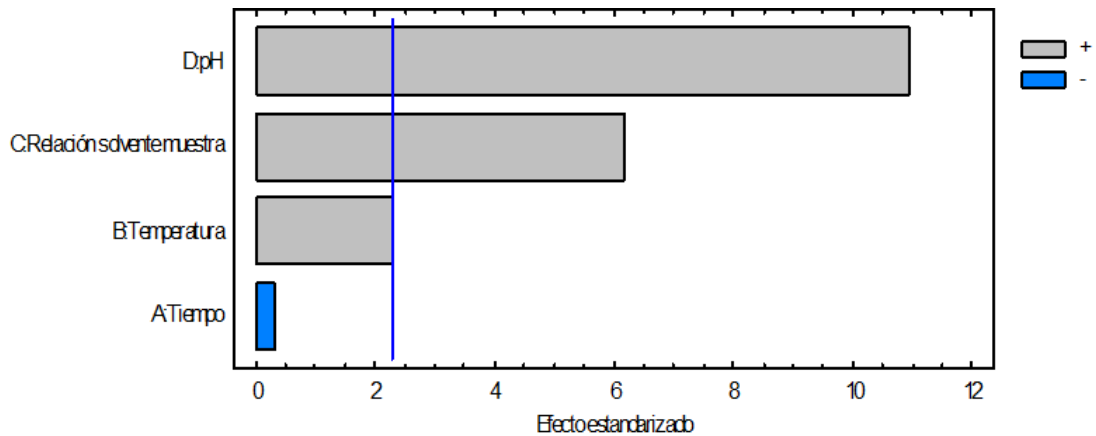
La corrida número 5 demuestra que el pH y la RS/M, en sus niveles altos son altamente significativas; mientras que el tiempo y temperatura en sus niveles bajos no son significativas, con estas condiciones se obtiene un rendimiento alto, capaz de igualar a la corrida número 8. De las corridas número 2 y 3 se puede observar que el pH fue el más significativo, se observa también la influencia mayor de la temperatura sobre el tiempo, similar a la corrida número 6 y 7 donde se corrobora esta influencia, pero con una cantidad superior de solvente, lo que compensa su disminución del pH; y tomando en cuenta el valor de la temperatura de dichas corridas, se puede decir que su nivel alto influye significativamente en el rendimiento.

Los puntos centrales (corridas número 9 al 13) no alcanzaron el valor deseado de rendimiento ya que estos no demuestran con claridad qué variables se deberían tomar en cuenta para su utilización en la etapa posterior. De la comparación del tratamiento número 2 y 5 se puede observar la influencia mayor de la RS/M. De la comparación de la corrida número 2 y 9 se puede corroborar la influencia mayor de la RS/M y de la temperatura, que compensa el efecto de la disminución del pH en una unidad. De la comparación del tratamiento número 4 y 5 se puede observar que el tiempo y la temperatura influyen mínimamente.

De las comparaciones expuestas se concluye que tomando los máximos valores de las variables codificadas se obtiene mayor rendimiento, esto se refleja en la corrida número 8.

Es evidente también que el pH tiene efecto significativo, seguido de la relación solvente muestra y temperatura, no encontrando significancia del factor tiempo sobre la producción de proteína, esto se demuestra en el ANOVA, donde el valor-P de cada variable es menor que 0.05 ( $P < 0.05$ ), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

La importancia de cada factor en la etapa de screening, se observó también mediante el diagrama de Pareto Estandarizado (Figura 12), donde están representados los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) de los diferentes factores evaluados en orden de importancia decreciente, así como el efecto positivo o negativo en la variable respuesta evaluada.



**Figura 12.** Diagrama de Pareto Estandarizado para el *screening* con arreglo factorial  $2^{k-1}$

La longitud de cada barra es proporcional al impacto de cada efecto correspondiente en la respuesta mostrando sólo la significancia de los efectos principales. Cualquier barra o factor que se extiende más allá de la línea vertical, que representa el nivel significativo seleccionado (5%), es estadísticamente significativo. Para el caso, los factores significativos en orden de importancia decreciente, que afectaron el rendimiento y el contenido de proteína, respectivamente ( $p < 0.05$ ) correspondieron a: pH > Relación solvente/muestra > Temperatura.

El pH y la relación solvente muestra presentan el mayor efecto sobre la extracción de proteínas influyendo en el rendimiento en el rango evaluado, esto lo corroboran otros estudios en proteínas vegetales (Mizubuti *et al.*, 2000; Wani *et al.*, 2008; Bejarano 2008; Jarpa-Parra *et al.*, 2014). Al igual que con la temperatura la tendencia es positiva es decir que mientras se incrementan los valores del pH, RS/M y temperatura se incrementa el rendimiento de extracción.

Los distintos valores encontrados en diferentes investigaciones no difieren significativamente con los obtenidos en esta investigación, debido a la naturaleza de las materias primas. Por ejemplo, Ventura *et al.*, (2005), determinaron que se logra buena extracción proteica a relaciones muestra/solvente de 1/15 ya que permite la máxima extracción de proteínas a partir de nuez de marañón. Así también para extraer proteínas de tarwi (*Lupinus mutabilis sweet*), Jayasena *et al.* (2010) determinaron que la relación muestra/solvente de 1/10 es lo adecuado; por último, Pedroche *et al.* (2004)

concluyeron que la relación 1/20 permite la máxima extracción proteica en colza (*Brassica napus*).

Sin embargo, hasta este punto no se asume la linealidad del modelo (primer orden), y no se evaluó ningún efecto curvatura. Este efecto se evalúa con las repeticiones en el centro y por ello es necesario hacer un análisis de varianza, el cual muestra que la significancia de los efectos aditivos de los factores podría llevar a resultados óptimos, que se corroboraron con estudios de optimización.

El Análisis de varianza ANOVA (Cuadro 10), confirma lo establecido en el diagrama de Pareto revelando a cinco factores significativos en el rendimiento en proteína, con un valor-P menor que 0.05 ( $P < 0.05$ ), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%, estos fueron: pH (D), relación solvente/muestra (C) y temperatura (B), así como las interacciones AC+BD y AD+BC; la relación solvente/muestra y pH fueron altamente significativas ( $P < 0.01$ ).

**Cuadro 10.** ANOVA para el modelo lineal en la etapa de *screening*.

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	0.762612	1	0.762612	1.88	0.2282
B:Temperatura	37.7146	1	37.7146	93.18	<b>0.0002</b>
C:Relación solvente/muestra	272.495	1	272.495	673.26	<b>0.0000</b>
D:pH	856.359	1	856.359	2115.84	<b>0.0000</b>
AB+CD	1.38611	1	1.38611	3.42	0.1235
AC+BD	24.3951	1	24.3951	60.27	<b>0.0006</b>
AD+BC	29.4528	1	29.4528	72.77	<b>0.0004</b>
Error total	2.02368	5	0.404736		
Total (corr.)	1224.59	12			

GL: Grados de libertad

R-cuadrada = **99.8347%**

R-cuadrada ajustada= **99.6034%**

Error estándar del est=**0.636189**

Error absoluto medio=**0.217988**

Estadístico Durbin-Watson=1.3084 (P=0.2528)

El factor tiempo (A) no afectó significativamente ( $P > 0.05$ ). El coeficiente de determinación fue satisfactorio ( $R^2 = 0.9983$ ), indicando un buen ajuste del modelo dado porque al menos la  $R^2$  debe ser superior a 0.8000 (Joglekar *et al.*, 1987) y un  $R^2$  ajustado = 0.9960, que explican la variabilidad del rendimiento, lo que significa que la optimización va por buen camino, pues se recomienda que el  $R^2$  ajustado sea al menos 75% para considerar la posibilidad de continuar con la metodología, de no ser así es muy probable que el procedimiento nos lleve por un camino errado que hará desperdiciar recursos en la investigación (Centro de Ingeniería de Calidad, 2011).

### 4.3.2. Optimización

Para la optimización de la extracción de proteínas de la HDSH, se sometieron a evaluación los 3 factores significativos determinados en la etapa de *Screening*: pH, relación solvente/muestra (RS/M) y temperatura. De igual modo se convirtieron las variables codificadas a variables naturales con la fórmula mostrada en la metodología (ítem 3.7.2, Cuadro 6). El criterio de optimización usado fue maximizar el rendimiento de proteína de la HDSH (función objetivo). El diseño utilizado para la metodología de superficie de respuesta fue el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) de segundo orden que consiste en un factorial 2k, ampliado con puntos axiales y centrales que aportan la curvatura necesaria para la estimación de los efectos cuadráticos (Goundan, 1992), reportando diecinueve corridas experimentales. Los valores experimentales del rendimiento en proteínas obtenidos con el Diseño Compuesto Central Rotable se muestran en el Cuadro 11, donde se observa una semejanza entre los valores experimentales y los predichos del rendimiento, el hecho de que los valores sean cercanos indica un modelo óptimo.

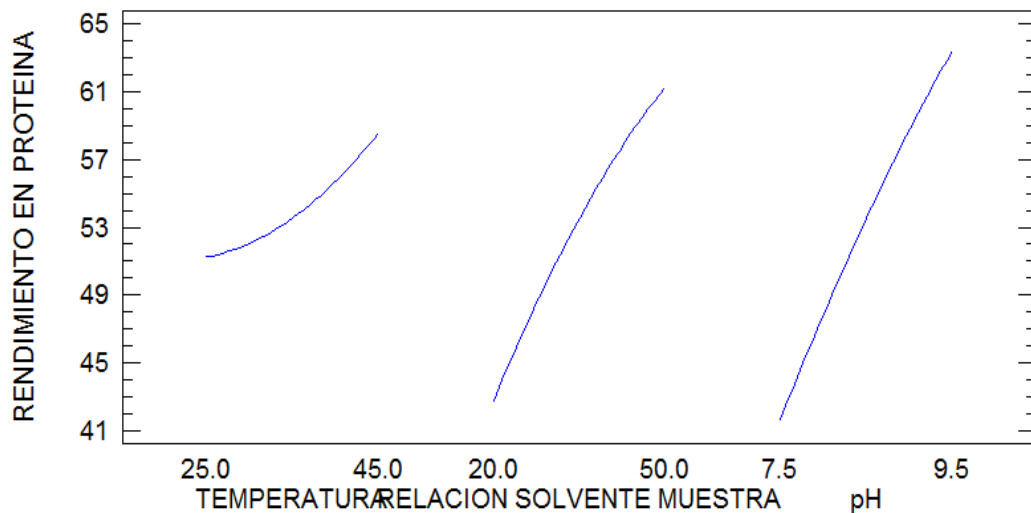
**Cuadro 11.** Diseño Compuesto Central con valores experimentales (observado) y predichos (estimado) del rendimiento en proteína en la etapa de optimización.

Corrida	Variables codificadas			Variables no codificadas			Rendimiento o en proteína (%)	Rendimiento o en proteína (%)
	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Experimental	Predicho
1	-1	-1	-1	25	20	7.5	19.95 ± 0.18	21.31
2	1	-1	-1	45	20	7.5	36.48 ± 0.19	34.98
3	-1	1	-1	25	50	7.5	54.92 ± 3.78	49.13
4	1	1	-1	45	50	7.5	62.78 ± 0.57	60.90
5	-1	-1	1	25	20	9.5	56.50 ± 0.32	56.86
6	1	-1	1	45	20	9.5	55.46 ± 0.34	59.76
7	-1	1	1	25	50	9.5	67.90 ± 0.38	67.89
8	1	1	1	45	50	9.5	71.76 ± 0.25	68.88
9	-1.682	0	0	18.2	35	8.5	49.61 ± 0.82	51.30
10	1.682	0	0	51.8	35	8.5	63.18 ± 0.12	63.63
11	0	-1.682	0	35	9.8	8.5	37.17 ± 1.06	33.77
12	0	1.682	0	35	60.2	8.5	59.29 ± 1.49	64.84
13	0	0	-1.682	35	35	6.8	28.58 ± 2.08	32.49
14	0	0	1.682	35	35	10.2	70.87 ± 2.68	69.10
15	0	0	0	35	35	8.5	55.59 ± 0.13	53.52
16	0	0	0	35	35	8.5	47.45 ± 0.16	53.52
17	0	0	0	35	35	8.5	56.52 ± 0.58	53.52
18	0	0	0	35	35	8.5	54.22 ± 0.34	53.52
19	0	0	0	35	35	8.5	54.20 ± 0.13	53.52

X<sub>2</sub>: Temperatura (°C), X<sub>3</sub>: Relación solvente/muestra RS/M (ml/g) y X<sub>4</sub>: pH.

El rendimiento en proteína varía de un 19.95% a un 71.76% de valor experimental (4.51 a 16.24 g de proteína/100 g de muestra), siendo el máximo rendimiento en proteína el tratamiento correspondiente a la corrida número 8, con las siguientes condiciones: 45°C, RS/M 50 mL/g y pH 9.5, siendo el valor estimado 68.88%.

Los estimados del rendimiento en proteína como una función de cada factor experimental pueden observarse en la gráfica de efectos principales de las variables independientes sobre la variable de respuesta (Figura 13).



**Figura 13.** Gráfico de Efectos Principales.

Este análisis muestra la influencia de los factores experimentales en forma individual (variables independientes) sobre el rendimiento en proteína (variable de respuesta).

En cada gráfica, el factor de interés varía de su nivel bajo a su nivel alto, a medida que la pendiente sea mayor, es decir que la diferencia entre el nivel más bajo y alto es más grande, el efecto sobre la respuesta es más influyente. En este sentido los tres factores evaluados presentaron una relación directa positiva con el rendimiento de extracción en proteína, es decir que el rendimiento se incrementó a medida que se incrementaron el pH y la relación solvente/muestra, la temperatura influyó en menor medida, en el rango evaluado. Esta gráfica confirmó, también, que el pH fue el que presentó el efecto más influyente en su nivel más alto, es decir a 9.5. Resultados similares fueron reportados por Salcedo-Chávez *et al.* (2002), Urrutia (2010), Arango *et al.* (2012) y Jarpa-Parra *et al.* (2014), quienes determinaron que el rendimiento de extracción de proteína es directamente proporcional al aumento de pH y a la cantidad de solvente utilizado.

En el Cuadro 12, se presenta los coeficientes de la ecuación de regresión cuadrática para el rendimiento de extracción de proteínas.

Donde:

$X_2$  = Temperatura

$X_3$  = Relación muestra / solvente

$X_4$  = pH

**Cuadro 12.** Coeficientes de regresión de la ecuación de segundo orden (modelo de predicción) para rendimiento en proteína.

Coeficientes	Factores	Estimado
<b>Intersección</b>		
$\beta_0$	Constante	53.52230
<b>Lineal</b>		
$\beta_1$	$X_2$	3.66570
$\beta_2$	$X_3$	9.23648
$\beta_3$	$X_4$	10.88413
<b>Cuadrático</b>		
$\beta_{11}$	$X_2^2$	1.39530
$\beta_{22}$	$X_3^2$	-1.49147
$\beta_{33}$	$X_4^2$	-0.96292
<b>Interacción</b>		
$\beta_{12}$	$X_2 X_3$	-0.47500
$\beta_{13}$	$X_2 X_4$	-2.69250
$B_{23}$	$X_3 X_4$	-4.20000

#### a. Evaluación del modelo

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, es una relación empírica entre el rendimiento de extracción de proteínas y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación de regresión:

$$\% \text{Rendimiento} = 53.52230 + 3.66570 x_2 + 9.23648 x_3 + 10.88413 x_4 + 1.39530 x_2^2 - 1.49147 x_3^2 - 0.96292 x_4^2 - 0.47500 x_2 x_3 - 2.69250 x_2 x_4 - 4.20000 x_3 x_4$$

Esta expresión es importante pues muestra el valor del rendimiento en proteína en el punto central representado por el valor constante de la expresión, es decir que en el punto central el rendimiento en proteína es del 53.522%.

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta de la siguiente manera:

$$\% \text{Rendimiento} = 301.311 + 1.7919 X_2 + 3.5680 X_3 + 46.4932 X_4 + 0.013945 X_2^2 - 0.006632 X_3^2 - 0.963717 X_4^2 - 0.00314167 X_2 X_3 - 0.269625 X_2 X_4 - 0.27975 X_3 X_4$$

Así, esta expresión es el modelo matemático que representa a las variables en los rangos estudiados, y como se vio anteriormente presenta un ajuste adecuado con una función de tipo cuadrático en donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

### b. Análisis de significancia para el ANOVA

El ANOVA (Cuadro 13) reveló que la aplicación del DCCR dio resultado un modelo significativo ( $P < 0.05$ ), indicando un buen modelo para la optimización con  $R^2 = 0.9466$  (94.66%) y  $R^2$  ajustado = 0.8933 (89.33%), este explica la variabilidad del rendimiento, lo que significa un buen ajuste y que la optimización va por buen camino, pues se recomienda que el  $R^2$  ajustado sea al menos 75% para considerar la posibilidad de continuar con la metodología, de no ser así es muy probable que el procedimiento nos lleve por un camino errado que hará desperdiciar recursos (Centro De Ingeniería De Calidad, 2011).

**Cuadro 13.** ANOVA para el modelo cuadrático en la etapa de optimización.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-P	Significancia
Modelo	3236.9799	9	359.664	17.715	<b>0.003</b>	**
A:Temperatura	183.512	1	183.512	9.04	<b>0.014</b>	**
B:Relación solvente/ muestra	1165.10	1	1165.10	57.39	<b>0.000</b>	***
C:pH	1617.85	1	1617.85	79.69	<b>0.000</b>	***
AA	26.575	1	26.575	1.31	0.282	n.s
AB	1.805	1	1.805	0.09	0.772	n.s
AC	57.9965	1	57.9965	2.86	0.125	n.s
BB	30.3647	1	30.3647	1.50	0.252	n.s
BC	141.12	1	141.12	6.95	<b>0.027</b>	*
CC	12.6567	1	12.6567	0.62	0.450	n.s
Error total	182.71	9	20.3019			
Total (corr.)	3429.64	18				

$R^2 = 94.6647\%$   
 $R^2$  ajustado = **89.3294%**

\* Significancia a un nivel de  $\alpha = 0,05$ ;

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha = 0,01$ ; n.s.= No significativo.

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha = 0,001$ .

El modelo cuadrático indica que es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) para la variable de respuesta % (rendimiento en proteína) y por lo tanto es utilizado para los siguientes análisis. Cada coeficiente del modelo estimado fue analizado mediante el valor- P ( $\alpha = 0.05$ ). Según Amin y Anggoro (2004) las variables o factores correspondientes serán más significativos si el valor-P se hace más pequeño.

Se puede observar del Cuadro 13 que los términos lineales altamente significativos sobre el rendimiento de extracción de proteína fueron el pH ( $x_4$ ) ( $p < 0.001$ ) y la relación

solvente/muestra ( $x_3$ ) ( $p < 0.001$ ), indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%. Especialmente, el pH tuvo la mayor influencia sobre el rendimiento de extracción de proteína de HDSH (valor  $F = 79.69$ ) La temperatura ( $x_2$ ) fue significativa ( $p < 0.05$ ).

Con respecto al término cuadrático, el pH ( $x_4^2$ ), relación solvente/muestra ( $x_3^2$ ) y la temperatura ( $x_2^2$ ), y los términos de interacción temperatura ( $x_2^2$ ) - relación solvente/muestra ( $x_3^2$ ), temperatura ( $x_2^2$ ) - pH ( $x_4^2$ ) no tuvieron un efecto significativo ( $p > 0.05$ ), sobre el rendimiento de extracción de proteína. Mientras que el término de interacción, Relación solvente/muestra – pH ( $x_3x_4$ ) ( $0.0273 < 0.05$ ). tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ).

Por lo tanto, los efectos del término lineal fueron más significativos que los efectos del término cuadrático. Esto significa que los factores como el pH ( $x_4$ ) y la relación muestra/solvente ( $x_3$ ), tienen una relación directa en la extracción de proteína de la harina desgrasada de las semillas de Huingo (HDSH).

### c. Contrastación de Hipótesis

La hipótesis global más importante sobre un modelo de regresión consiste en ver si la regresión es significativa. Utilizando el ANOVA (cuadro 13) para el rendimiento de extracción de proteínas, se puede probar la hipótesis siguiente:

$H_0$ : El modelo no es adecuado

$H_1$ : El modelo es adecuado

La probabilidad obtenida para el modelo es de 0.003, lo que implica un rechazo de la hipótesis nula, por lo que concluimos que el modelo es adecuado con un nivel de significancia de 0.05. Por otra parte el coeficiente de determinación calculado es:

$R^2 = \frac{3236.97}{3429.64} = 0.94$  Del coeficiente de determinación  $R^2 = 0.946$  podemos concluir que el modelo matemático es aceptable pues es mayor a 0.5

Este coeficiente indica que el modelo explica el 94.6 % de la variabilidad en la respuesta, por lo que se podría pensar que el modelo explica de forma adecuada esta variabilidad.

Para efectuar las pruebas individuales se probó su significancia, en este caso, las hipótesis a plantear son:



$$H_0: \beta_j = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0$$

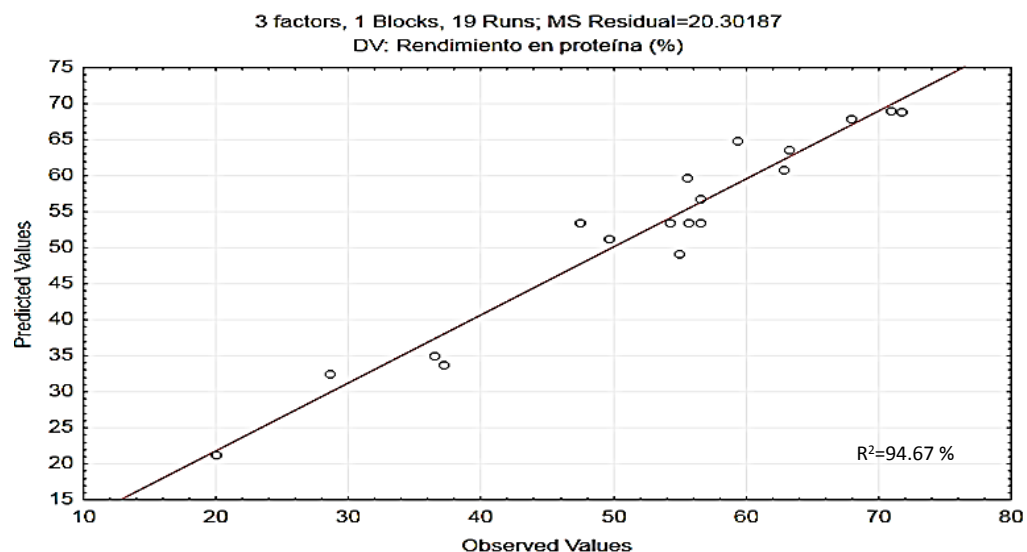
Aceptar  $H_0$  significa que ningún término o variable en el modelo tiene una contribución significativa al explicar la variable de respuesta. Mientras que rechazar  $H_0$  implica que por lo menos una de las variables independientes es significativa en el modelo, la cual contribuirá de manera significativa a explicar la variable de respuesta. Se rechazará la hipótesis nula, en el caso de que la probabilidad calculada sea menor que el nivel de significancia especificado, en este caso se utilizó  $\alpha = 0.05$ .

El pH y RS/M ( $0.000 < 0.05$ ) son altamente significativas, se rechaza la hipótesis nula. La temperatura ( $0.0149 < 0.05$ ) y la combinación RS/M-pH ( $0.0273 < 0.05$ ) son significativas, se rechaza la hipótesis nula.

Los términos cuadráticos ( $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ ) y los términos de interacción (AB, AC) no fueron significativos, se acepta la hipótesis nula.

Por lo general estos resultados implican un rechazo de la hipótesis nula, por lo que concluimos que se han encontrado por lo menos tres términos o variables con un nivel de significancia de 0.05.

Para mostrar una similitud entre los resultados experimentales y estimados por el modelo cuadrático, se puede observar en la Figura 15, donde determina que la desviación entre los valores ajustados por el modelo (valores predichos) y los valores observados (valores experimentales) fue mínima indicando que el  $R^2$  da un modelo óptimo.



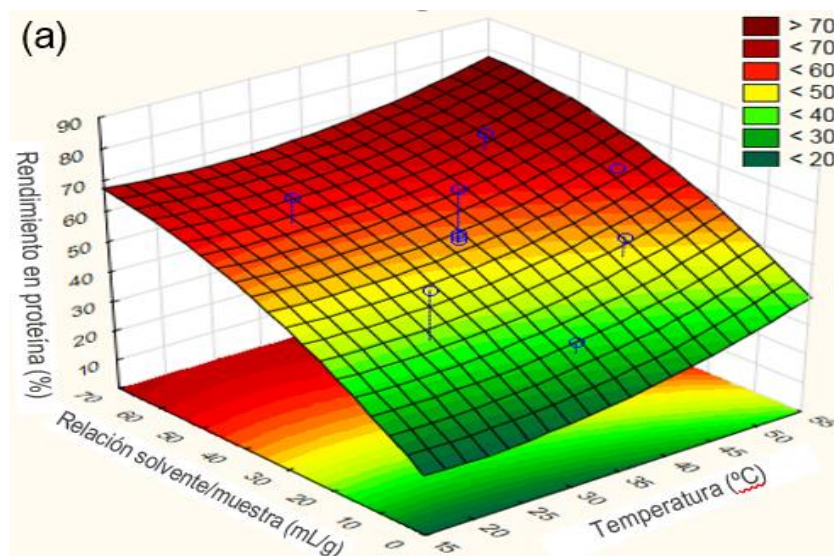
**Figura 14.** Valor experimental (observado) vs el valor estimado (predicho) por el modelo cuadrático.

El valor del coeficiente de determinación ajustada ( $R^2$  ajustada) es también muy alto por lo que defiende la alta significancia del modelo. La  $R^2$  predicha concuerda razonablemente con la  $R^2$  ajustada, estadístico que ofrece cierto indicio de la capacidad predictiva del modelo de regresión. Por lo tanto podría esperarse que el modelo explique cerca del 89% de la variabilidad al predecir nuevas observaciones, en comparación con el aproximadamente 94% de la variabilidad en los datos originales que explica el ajuste de mínimos cuadrados. La capacidad predictiva global del modelo basado en este criterio es satisfactoria.

Por lo tanto, en la figura se cumple que  $0 < R^2_{aj} \leq R^2 < 1$ ; para hablar de un modelo que tiene un ajuste satisfactorio es necesario que ambos coeficientes tengan valores superiores a 0.7. Cuando en el modelo hay términos que no contribuyen de manera significativa a éste, él tiende a ser menor que el  $R^2$ .

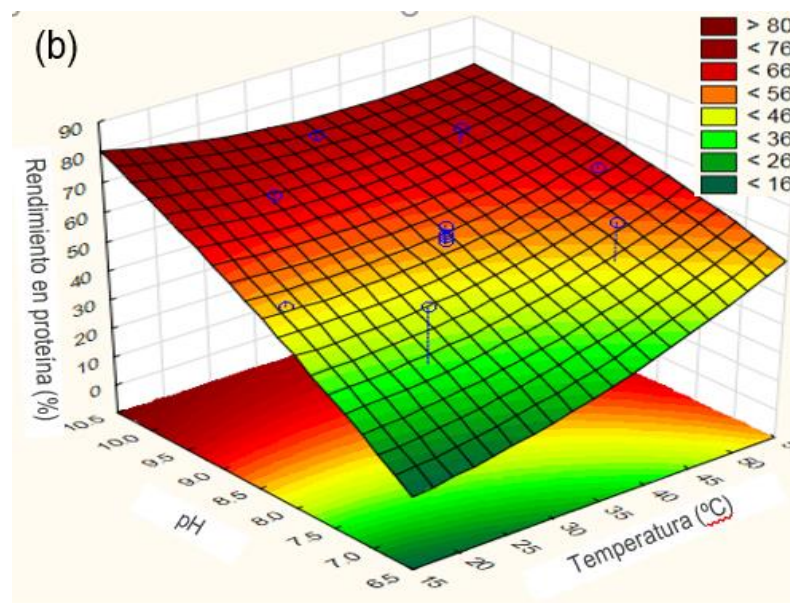
#### d. Análisis de la superficie de respuesta

La gráfica de superficie de respuesta (tridimensional), se elaboró a partir del modelo cuadrático (Ecuación de segundo orden) para ilustrar los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre la variable respuesta (rendimiento de proteína). El criterio principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes (pH, relación solvente/muestra y temperatura) de manera eficiente para maximizar la respuesta (rendimiento en proteína). Estas gráficas (Figura 15a, 15b y 15c) se obtuvieron mediante la fijación de una variable independiente codificada a nivel cero, mientras que las dos variables restantes varían dentro del rango experimental.



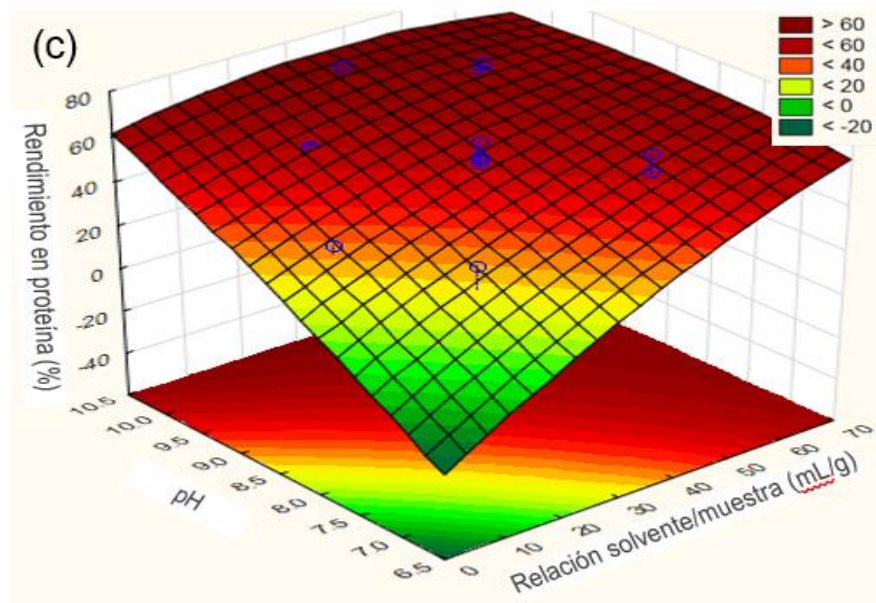
**Figura 15a.** Superficie de Respuesta, vista tridimensional, sobre el rendimiento de proteína en función a la Relación solvente/muestra vs. Temperatura.

En la Figura 15a se muestra el efecto de la temperatura y la relación solvente/muestra en el rendimiento en proteína, el factor Relación solvente/muestra ejerce un efecto ligeramente cuadrático sobre el rendimiento en proteína, y este efecto cuadrático también se evidencia en la Figura 15c, mientras que el factor Temperatura ejerce un efecto lineal a partir del valor 35°C. Los puntos señalados dentro de la superficie de respuesta indican el área de trabajo estudiado, donde revela que mayores rendimientos en proteína se obtiene cuando la relación solvente/muestra se encuentra entre los valores de 40 a 60 y la temperatura se encuentra entre 35°C a 55°C, mientras que el factor pH fue 8.5 (nivel 0).



**Figura 15b.** Superficie de Respuesta, pH vs. Temperatura

En la Figura 15b se muestra el efecto del pH y la temperatura en el rendimiento en proteína, el factor pH ejerce un efecto lineal sobre el rendimiento en proteína, éste efecto lineal también se pone en manifiesto en la Figura 15c, indicando que el rendimiento es directamente proporcional al aumento de pH, mientras que el factor Temperatura ejerce un efecto lineal a partir del valor 35°C. La figura revela que mayores rendimientos en proteína se obtiene cuando el pH se encuentra entre los valores de 9 a 10 y la temperatura se encuentra entre 35°C a 55°C, mientras que el factor relación solvente/muestra fue 35 (nivel 0).



**Figura 15c.** Superficie de Respuesta, pH vs. Relación solvente/muestra.

En la Figura 15c se muestra el efecto del pH y la relación solvente/muestra en el rendimiento en proteína, indicando que el factor pH ejerce un efecto lineal sobre el rendimiento en proteína mientras que el factor relación solvente/muestra ejerce un efecto ligeramente cuadrático. La figura revela que mayores rendimientos en proteína se obtiene cuando el pH se encuentra entre los valores de 9 a 10 y la relación solvente/muestra se encuentra entre 40°C a 60°C, mientras que el factor temperatura fue 35 (nivel 0). Los resultados indican que tanto el incremento de pH o relación solvente/muestra son los principales contribuyentes a la extracción de proteínas de HDSH.

Según se observa, hay un rango por cada factor como los máximos y mínimos valores evaluados para la obtención del concentrado proteico de *Crescentia cujete*; sin embargo, existen valores óptimos para cada factor, éstos fueron estimados mediante el método de deseabilidad (la variable dependiente se fijó al valor máximo de deseabilidad igual a  $d=1.00$ ), utilizando el programa Statística 10, los cuales correspondieron a un pH de 10.2; RS/M de 51.8 y Temperatura de 18.2°C (Cuadro 14); el tiempo de agitación utilizado fue constante de 30 minutos, con el que se obtiene un rendimiento máximo del 75.96%.

Se puede ver una amplia gama de rendimientos de extracción de proteínas en diversos estudios que se centran en la optimización de la extracción de proteínas a partir de diferentes fuentes de alimentos. Por ejemplo, Zhang *et al.*, (2009), extrajeron proteínas de fresno espinoso y obtuvieron un máximo rendimiento de 18.9%, con las siguientes condiciones de extracción: temperatura de 35°C, relación solvente/muestra de 17.5/1

(v/w), pH 8.78 en un tiempo de 60 min; Chee y Ayob, (2013), extrajo la proteína de la torta de palma para obtener un rendimiento en proteínas del 28.3% con las siguientes condiciones de extracción: pH 10, temperatura de 50°C, y una relación de solvente/muestra de 70/1 (v/w); Ma *et al.*, (2010), recuperó 65.3% de proteína de harina desgrasada de maní con una concentración de etanol de 85 ml/100 ml usando una extracción secuencial con las siguientes condiciones: relación solvente/muestra de 11.7/1 (v/w), 36.3°C de temperatura durante la primera etapa de extracción y una relación solvente/muestra de 8/1 (v/w), a una temperatura de 38.4°C durante la segunda etapa de extracción.

Sin embargo, es importante mencionar que la proteína puede estar disminuida en su valor nutricional a pHs altos, por la fuerte alcalinidad, que favorece la formación de compuestos como lisinoalanina y ornitolalanina, que bajan la disponibilidad biológica de los aminoácidos esenciales (Alanis, 1993; Arango *et al.*, 2012). A pH 11 se esperaría un máximo rendimiento en el proceso, sin embargo, Provanzal *et al.*, (1975) han descrito en dichas condiciones la formación de isopéptidos y compuestos que no son degradados por el organismo humano; así mismo el uso de altos pH pueden afectar las propiedades funcionales de las proteínas, incluso la estructura misma, imposibilitando la renaturalización proteica (Linden *et al.*, 1996), tal como se demuestra en la investigación de Armenta (2012), la cual mostró cambios estructurales de la proteína de quinua durante la alcalinización a un pH mayor de 10, lo que produjo una significativa desnaturalización estructural (agregación/disociación).

En este sentido, también se encontró investigaciones que realizando extracciones de proteínas a pHs menores se obtiene altos rendimientos de extracción, como en la investigación de Ventura *et al.*, (2005), quienes determinaron que realizando la extracción alcalina a partir de nuez de marañón según los parámetros adecuados (pH=9, harina:Solvente=1/15, temperatura=50 °C y 30 minutos de agitación) se obtiene de un 85 a un 91% en rendimiento en proteína. Del mismo modo, Jayasena *et al.*, (2010), determinaron los parámetros óptimos de extracción de proteínas a partir de *Lupinus mutabilis sweet*, siendo estas: pH 9, relación de harina/solvente 1/10, temperatura de 20°C, tiempo de agitación de 60 minutos y precipitación isoeléctrica a pH 4.5, obteniendo un rendimiento de proteína de 80 %. Finalmente, Jarpa-Parra *et al.*, (2014), optimizaron la extracción alcalina de proteínas de harina desgrasada de lentejas con las siguientes condiciones: relación harina/solvente 1/10 (g/ml) y pH 9, con un rendimiento de 82 % a 22 °C y 60 min de extracción.

Entonces, basado en estos antecedentes para evitar cualquier tipo de desnaturalización y disminución del valor nutricional de las proteínas de semillas de Huingo, se decidió ajustar el pH óptimo obtenido (10.2) a un valor menor, este valor fue 9,0; con estos valores se realizó la validación de los resultados.

#### **4.3.3. Validación**

La validación de las respuestas se hizo con el fin de verificar las respuestas predichas generadas por MSR.

Obtenido el modelo matemático de optimización y la combinación óptima de parámetros con los cuales se consigue la máxima extracción de proteína, se realizó la validación de los mismos contrastando el resultado obtenido experimentalmente (valor observado), con el obtenido por el modelo (valor predicho). De esta manera se corroboró experimentalmente la idoneidad del modelo matemático generado para predecir el rendimiento máximo de proteína.

Entonces, se validó las condiciones obtenidas por el modelo tanto a condiciones óptimas (pH = 10.2), como a condiciones ajustadas (pH ajustado a 9.0), recomendado por el modelo de optimización, estos resultados se muestran en el Cuadro 14. A condiciones ajustadas se obtuvo un rendimiento de extracción de proteína del 65.28% (14.77 g de proteína/100 g de HDSH). Este valor es similar al valor predicho por el modelo matemático (65.70%), por lo tanto, confirma la validez del modelo (Cuadro 12).

A pesar que el valor de rendimiento en proteína obtenido a pH 9.0 es menor en comparación al valor de rendimiento a pH 10.2; el rendimiento de proteína obtenido a partir de HDSH sigue siendo mayor que los valores reportados en estudios previos de otras fuentes de alimentos (Guerrero-Ochoa *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Chee y Ayob, 2013).

**Cuadro 14.** Rendimiento del Valor predicho vs Rendimiento de validación, con pH óptimo y pH ajustado, utilizando la función de deseabilidad.

<b>Factor</b>	<b>Valor</b>	<b>Rendimiento del valor predicho (estimado) (%)</b>	<b>Rendimiento de validación (experimental) (%)</b>
<b>pH de extracción óptimo</b>	10.2		
<b>Relación solvente/muestra (mL/g)</b>	51.8	75.96	74.77 ± 1.19
<b>Temperatura de extracción (°C)</b>	18.2		
<b>pH de extracción ajustado</b>	9.0		
<b>Relación solvente/muestra (mL/g)</b>	51.8	65.70	65.28 ± 1.71
<b>Temperatura de extracción (°C)</b>	18.2		

**FUENTE:** Elaboración propia

#### 4.4. Caracterización funcional del concentrado proteico

##### 4.4.1. Proteína total

Teniendo los parámetros óptimos de extracción alcalina y siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 10, se ha obtenido un concentrado proteico de semillas de Huingo (CPSH). El concentrado obtenido, se sometió a un análisis de proteína total, siendo importante también la determinación de humedad (Cuadro 15), antes de la debida caracterización funcional. Cada análisis se realizó por triplicado de acuerdo a la metodología reportada por la AOAC (2005).

**Cuadro 15.** Determinación de proteína total del concentrado proteico de semillas de Huingo

<b>Análisis</b>	<b>Resultado (%)</b>
a. Proteína total	62.8 ± 0.02*
b. Humedad	6.02 ± 0.04

\* base seca

**FUENTE:** Elaboración propia

La liofilización del concentrado proteico permitió obtener un producto con un menor contenido de humedad (6%), debido a que en las condiciones del proceso se elimina no solo agua libre sino además parte del agua ligada, adicionalmente se obtuvo un concentrado de mejor calidad (62.8% de proteína en base seca); en esta etapa se evitó el pardeamiento no enzimático y la pérdida de sustancias volátiles.

El resultado obtenido en esta investigación puede compararse con investigaciones donde se han utilizado condiciones similares: a pH 9 para extracción y pH 4.5 para precipitación. Así se han obtenido aislados proteicos con alta pureza como los de

amaranto con 83.4% (Salcedo–Chávez *et al.*, 2012) y 93.1% de proteínas (Cordero de los Santos *et al.*, 2005), así como porcentajes relativamente bajos luego de purificar, como el de Escudero *et al.* (2004), que utilizaron pH 11 para la extracción y pH 4.5 para la precipitación y obtuvieron un concentrado con menos concentración de proteínas (52.6%) que el obtenido en el concentrado de este trabajo.

Mayores rendimientos de purificación podrían obtenerse con técnicas adicionales como las aplicadas por Fidantsi y Doxastakis., (2001), que prepararon concentrados de proteínas de amaranto por precipitación isoelectrica (pH 10 para extracción y pH 4.6 para precipitación) además de diálisis a través de una membrana con poder de corte de 12-14 KDa, llegando a un concentrado de mayor porcentaje de proteínas con la separación por diálisis (67%) que con la precipitación isoelectrica obtenían 36% (N x 6.25), el poder del corte de la membrana puede ser causante de la diferencia del concentrado por diálisis, sin embargo se evidencia baja recuperación en el método de precipitación.

#### **4.4.2. Caracterización funcional**

Conociendo el contenido de proteína total del concentrado proteico de semillas de Huingo y con el fin de determinar el potencial de este concentrado para su aprovechamiento a escala agroindustrial, se procedió a desarrollar investigaciones acerca de sus características funcionales. Se investigó sobre la capacidad de absorción de agua (CAA), capacidad de absorción de lípidos (CAL) y la capacidad de formación de espuma (CFE) y su estabilidad (EE).

Así mismo, los tratamientos alcalinos y la precipitación isoelectrica para extraer proteínas, pueden causar modificaciones químicas de algunos residuos de aminoácidos, reduciendo las propiedades funcionales de las proteínas en su posible uso en alimentos. (Moure, *et al.*, 2006).

En el Cuadro 16 se muestran los resultados (promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar) de la caracterización funcional del concentrado proteico de semillas de Huingo (CPSH).



**Cuadro 16.** Características funcionales del concentrado proteico.

Función	Resultado
Capacidad de absorción de agua (CAA)	4.80 ± 0.32 g/g de muestra
Capacidad de absorción de lípidos (CAL)	4.65 ± 0.08 g/g de muestra
Capacidad de formación de espuma (CFE)	70 ± 0.07 %
Estabilidad de espuma (EE):	
10 minutos	75 ± 3.6%
30 minutos	49.05 ± 3%
60 minutos	3.14 ± 0.3%

**FUENTE:** Elaboración propia

El valor de la CAA del CPSH (4.80 g agua/g muestra) es comparable a concentrados y aislados proteicos de diferentes fuentes alimentarias. Por ejemplo, la capacidad de absorción de agua del aislado proteico de *Arthrospira platensis* fue 4.28 g/g (Benelhadj *et al.*, 2015), semillas de Chía fue 4.06 g/g (Olivos-Lugo *et al.*, 2010). Sin embargo, la CAA del CPSH fue más alto que la reportada para lentejas (3.9 g/g) y garbanzos (2.3 g/g) (Toews y Wang, 2013), cáscara de nuez de marañón (2.56 g/g) (Chi, *et al.*, 2014), tarwi (0.98 g/g) (Urrutia, 2010), de *Anacardium occidentale* L. (2.2 mL/g) (Olalekan *et al.*, 2009), soya (4 mL/g), *Jatropha curcas* (2 mL/g) (Armenta, 2012) y nogal (2.94 g/g) (Mao y Hua, 2012) (considerando 1mL=1g).

Esta característica hidrófila se puede atribuir no sólo a la estructura porosa del concentrado proteico de semillas de Huingo luego del proceso de liofilización, sino también a la presencia de mucílago (Kaushik *et al.*, 2016), y también es función de cómo se encuentran las moléculas proteicas en los agregados luego del tratamiento. Solamente aquellos agregados en que las proteínas tienen los grupos polares más accesibles al agua serán los que posean mayor capacidad de absorción de agua (Abugoch, 2006). La mayor capacidad de absorción de agua es resultado de una mayor desnaturalización de las proteínas.

Por otro lado, la absorción de lípidos es una propiedad funcional muy importante de las proteínas en sistemas alimenticios ya que involucra las interacciones proteína-lípido (Kinsella, 1979).

El valor de la CAL del CPSH (4.65 g aceite/g muestra) también fue comparable a los valores para diferentes concentrados y aislados proteicos, como a la capacidad de absorción de lípidos del frijol africano (4.8 g/g) (Adebowale *et al.*, 2009), semillas de otra variedad de frijol africano (4.05 g/g) (Ajibola *et al.*, 2016), cáscara de nuez de

marañón (4.28 g/g) (Chi, *et al.*, 2014), semillas de Chía (4.06 g/g) (Olivos-Lugo *et al.*, 2010) y al de *Anacardium occidentale L.* (4.42 mL/g) (Olalekan *et al.*, 2009). Fue inferior al valor de 13.7 g/g de proteínas de semilla de cáñamo (Malomo *et al.*, 2014), sugiriendo que las proteínas de semillas de cáñamo probablemente tienen niveles más altos de agrupaciones hidrofóbicas expuestas en comparación con las proteínas de semillas de Huingo. Sin embargo, el CPSH tiene mucho mayor capacidad de absorción de lípidos que el de lentejas (2.1 g/g) y garbanzos (2.1 g/g) (Toews y Wang., 2013), nogal (2.50 g/g) (Mao *et al.*, 2012), el de tarwi (1.6 g/g) (Urrutia, 2010), de *Arthrospira platensis* (2.52 g/g) (Benelhadj, 2015), *Jatropha curcas* (2.6 mL/g) (Armenta, 2012) y de coco (1.6 g/g) (Viena *et al.*, 1993).

El Nasri y El Tinay (2007) informó de que el área superficial, la hidrofobicidad y el alto contenido en proteínas mejora la capacidad de absorción de grasa. Según Ogunwolu *et al.*, (2009), la capacidad de la proteína para unirse a la grasa es muy importante para aplicaciones como sustituto de la carne y extensores, principalmente debido a que mejora la retención del sabor y mejora la sensación en la boca. Además, una alta capacidad de absorción de lípidos hace que sea un buen ingrediente para la industria de la carne fría, especialmente para embutidos, donde la proteína puede ligar la grasa y el agua con la finalidad de obtener un buen producto (Mao y Hua, 2012).

En este sentido, los resultados obtenidos indican que el concentrado proteico de semillas de Huingo tiene buena capacidad de absorción de agua y lípidos, haciéndolo un buen ingrediente para la industria de la carne fría, especialmente para embutidos, donde la proteína normalmente funciona como puente de la grasa y el agua, así también estas propiedades hacen que este concentrado sea un ingrediente potencial en la industria de panes y pasteles.

Finalmente, la CFE del CPSH fue de 70%, este resultado se comparó con los resultados de otros concentrados y aislados proteicos, encontrando que la CFE del CPSH fue mayor a la del garbanzo (48%) (Toews y Wang, 2013), nogal (38.78%) (Mao y Hua, 2012), torta de coco (50%) (Viena *et al.*, 1993) y de *Anacardium occidentale L.* (45%) (Olalekan *et al.*, 2009; pero fue menor a comparación de las semillas de tarwi (78%) (Urrutia, 2010), cáscara de nuez de marañón (76.88%) (Chi, *et al.*, 2014) y mucho menor que del concentrado proteico de *Phaseolus lunatus* (394%) (Marrugo *et al.*, 2012) y de lentejas (553%) (Toews y Wang, 2013).

Las variaciones en los resultados de diferentes estudios podrían deberse al proceso de generación de espuma (batido a altas velocidades), ya que puede disminuir la

capacidad espumante de concentrados proteicos y hacer que presente desnaturalización proteica (Granito *et al.*, 2004), así como también a las diferencias en la pureza de la proteína de las muestras estudiadas (Boye *et al.*, 2010). Se ha observado también, que la presencia de lípidos en aislados y concentrados afectan desfavorablemente las propiedades espumantes de las proteínas debido a que en vez de que las proteínas se absorban en la interfase aire-agua estas se absorben en la interfase lípido-agua, dando como resultado una baja formación de espuma (Lestari *et al.*, 2011, Martínez *et al.*, 2011).

La CFE se relaciona con el aumento de las cargas netas de las proteínas, lo cual debilita las interacciones hidrofóbicas e incrementa la flexibilidad de la proteína. Esto conduce que estas proteínas se difundan más rápidamente a la interfase aire-agua para encapsular burbujas de aire y para mejorar la formación de espuma (Aluko y Yada, 1995). Similar explicación se ha descrito para hidrolizados de semillas de quinua (Aluko y Monu, 2003).

Con respecto a la EE, ésta se vio afectada por el tiempo, a medida que el tiempo aumenta la espuma disminuye (Saetae *et al.*, 2011). El volumen de espuma se registró después de 10, 30 y 60 minutos siendo los resultados 75, 49.05 y 3.14 %, respectivamente, observando que la espuma disminuye de volumen desde 52.5 mL a 2,2 mL, estos valores son similares al 59.2% de estabilidad en 30 minutos en semillas de garbanzo (Boye *et al.*, 2010), al 50% de estabilidad en 90 minutos en semillas de maracuyá (Martínez, 2011) y al 55% a los 60 min en *Anacardium occidentale L.* (Olalekan *et al.*, 2009); en este sentido Wu *et al.*, (2009) recomiendan que la estabilidad de la espuma debe ser las adecuadas entre 50 y 70%, dependiendo del producto para los sistemas alimentarios que requieren espuma como las tortas y el helado. Así mismo, Damodaran (1997) menciona que la capacidad y estabilidad de la espuma mejoran cuando hay una mayor concentración de proteínas, ya que esto aumenta la viscosidad y facilita la formación de una multicapa, película de proteína de cohesión en la interfase.

## V. CONCLUSIONES

Acorde a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que:

Se caracterizaron fisicoquímicamente las semillas del Huingo (*Crescentia cujete L.*), presentando un alto contenido de proteínas (16.94%) y grasa (27.30%), además de humedad, fibra, ceniza y extracto libre de nitrógeno de 10.28%, 22.44%, 2.30% y 20.74%, respectivamente en la harina sin desgrasar, siendo el contenido de proteínas luego de desgrasar 22.63%; y se caracterizó nutricionalmente obteniendo 17 aminoácidos, de los cuales 9 son esenciales (treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, arginina y triptófano), representando un buen balance de éstos.

Se determinó que entre los seis solventes utilizados para la extracción (NaOH, Buffer borato salino, Buffer fosfato, NaCl, EtOH y agua destilada), el mejor solvente fue NaOH a 0.1 M, que solubilizó la mayor cantidad de proteínas, con un rendimiento de 58.38%, es así que las proteínas de la harina desgrasada de las semillas de Huingo fueron más solubles en condiciones alcalinas que en condiciones ácidas.

Se optimizó la extracción de proteínas de la harina desgrasada de las semillas de Huingo, identificándose en la etapa de *Screening* las variables o factores más significativos sobre el rendimiento de extracción, éstos fueron: pH, relación solvente/muestra y temperatura. En la etapa de optimización se determinó los parámetros óptimos de extracción, éstos fueron: pH 10.2; relación solvente/muestra 51.8 mL/g y temperatura 18.2°C con el que se alcanzó 74.77% de rendimiento de extracción; sin embargo, se ajustó a pH 9 para evitar la desnaturalización de las proteínas, con estas condiciones se ha obtenido un rendimiento de extracción de 65.28% (14.77 g de proteína/100 g de muestra).

Se obtuvo un concentrado proteico con 62.80% de proteína total (Kjeldhal  $fc=6.25$ ) que se caracterizó funcionalmente, mostrando buenas propiedades funcionales. La capacidad de absorción de agua y grasa fueron 4.80 g/g y 4.65 g/g, respectivamente. La capacidad de formación de espuma fue 70% y su estabilidad de espuma en 10, 30 y 60 minutos fueron 75, 49.05 y 3.14%, respectivamente, haciendo que éste concentrado sea excepcionalmente apto para su utilización a escala agroindustrial.

## VI. RECOMENDACIONES

Para la extracción de proteínas se debe evaluar el efecto de otros factores no considerados en este estudio, tales como el tamaño de partícula y concentración de solvente. Así mismo, se recomienda realizar una segunda extracción de proteínas antes de continuar con el proceso de centrifugado con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de proteínas. Se recomienda utilizar equipos de mayor capacidad, para ahorrar tiempo, esfuerzo y energía, y evitar pérdidas de materia prima.

Realizar este estudio empleando otros métodos de extracción, como la extracción ácida, extracción enzimática y extracción salina con el fin de comparar los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a rendimientos y contenido proteico.

Adicionalmente, con el fin de determinar el potencial de aprovechamiento del concentrado proteico de la harina de semillas de Huingo se recomienda realizar investigaciones sobre su utilización en el desarrollo de productos que incorporen este concentrado. Así mismo, se requiere desarrollar investigaciones acerca de otras propiedades funcionales (capacidad de gelificación, capacidad de emulsificación, entre otros), compuestos antinutricionales, estudios de digestibilidad, valor biológico, PER y alergenicidad.

Se recomienda realizar al concentrado proteico obtenido, un análisis toxicológico por químicos farmacéuticos.

Realizar el fraccionamiento de Osborne para conocer las fracciones proteicas derivadas de las proteínas de las semillas de Huingo.

Se recomienda realizar estudios de caracterización química y comportamiento reológico del aceite extraído de las semillas de Huingo.

Establecer líneas de investigación que se centren en el estudio de proteínas de diferentes materiales vegetales, así mismo obtener concentrados o aislados con más pureza y mayor porcentaje proteínico que los concentrados que actualmente circulan en el mercado.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A. 2001. Estudio de prefactibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de lupino. Depart. de Ingeniería Química. Universidad de la Frontera. CH.
- Abugoch J, LE. 2006. Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral. Universidad de La Plata, Facultad de ciencias exactas. BA.AR.
- Adebowale, YA; Henle, T; Schwarzenbolz, U. 2009. Acetylated and succinylated derivatives of African yam bean (*Sphenostylis sternocarpa* Hochst. Ex A.Rich.) protein isolates.
- Ajibola, CF; Malomo SA; Fagbemi TN; Aluko, RE. 2016. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis sternocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. *Food Hydrocolloids* (2016), doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.12.013.
- Alanis, GJ. 1993. Extracción y caracterización química, nutricional y funcional de proteínas de la semilla de *Brassica campestris* L. Tesis Doctor en ciencias. UANL. Fac. Cs. Biológicas. Monterrey.
- Aluko R, Yada RY. 1995. Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chem.* 53: 259-265.
- Aluko, R; Monu, E. 2003. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science.* 68(4), 1254-1258.
- ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 136, 65-74 (1984)
- Anglemier, A; Montgomery. 1982. Aminoácidos, péptidos y proteínas en: *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Tomo 1, ed M de la Torre. Ed. Reverté. Barcelona. Pág. 240-398
- AOAC (Official Methods of Analysis). 2005. 16° Ed, 4° rev. Association of Official Agricultural Chemists. Arlington, USA.
- Aquino, ME; Chirinos GR. 2016. Optimización del proceso de extracción de las proteínas de la torta de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis Maestría en Tecnología de alimentos. UNALM. Lima. PE.
- Arango, B; Bolaños, P; Ricaurte, G; Caicedo, M. 2012. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). *Revista Univ. Salud.* Vol. 14.
- Armenta, L. 2012. Optimización de variables de extracción para la obtención de aislados proteínicos de semillas de *Jatropha curcas* L. No tóxica. Caracterización química, fisicoquímica, funcional y nutricional. Tesis Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIRUS. Sinaloa. MX.
- Asiain, L., 1999. Las técnicas de filtración tangencial y el medio ambiente.
- Autran, JC; Halford, NG; Shewry PR. 2001. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. *The assimilation of Nitrogen by plants*. Montpellier: INRA. Pag. 295
- Ayala, J; Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Lima, PE. CONCYTEC. 261 p.
- Badwaik, L; Prasad, K; Deka, S. 2012. Optimization of extraction conditions by response surface methodology for preparing partially defatted peanut. *International Food Research Journal* 341–346.
- Bejarano LD, L. 2008. Obtenção de concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus* sp) por diferentes processos e avaliação de seus efeitos em algumas propriedades. Universidade Estadual de Campinas. Brasil.
- Benelhadj, S; Gharsallaoui, A; Degraeve, P; Attia, H; Ghorbel, D. 2015. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate, *Food Chemistry* (2015), doi:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.133>

- Blenford, DE. 1996. Use of amino acids and peptides in sport nutrition. *International Foods Ingredients*.
- Bodwell, CE; Hopkins DT. 1985. Nutritional characteristics of oilseed proteins. In: Altschul A.M. and Wilcke H.L. *New Protein Foods, Seed Storage Proteins*, Vol. 5, NY. Academic Press, pp. 221-257.
- Boye, JI; Aksay, S; Roufik, S; Ribéreau, M; Mondor, M; Farnworth, E; tros. 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation technological. *Food Research International*. 537-548.
- Box, G; Draper, N. 2007. *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*. Segunda Edición. Wiley 192 Series in Probability and Statistics. John Wiley y Sons Inc. 768p.
- Box, G; Draper, N. 1987. *Empirical model-building and response surfaces*. New York, US, John Wiley and Sons. 669 p.
- Brañas, M; Del Águila C, R; Braga R, G. 2001. Manos trabajadoras tallando el Huingo. Programa de cooperación hispano peruano. Proyecto Araucaria XXI Nauta. MINAM-AECID. Loreto.PE.
- Bridson, E. 1998. *The development, manufacture and control of microbiological cultura media*. 8va Ed. Basingtoke: Oxoid Ltd.
- Callisaya, J; Alvarado, J. 2009. Aislados proteínicos de granos alto andinos Chenopodiaceas; Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y Cañahua (*Chenopodium pallidicaule*) por precipitación isoelectrónica. *Rev. Bol. Quim*. Vol. 26(1):12-20.
- Candioti, L.; De Zan, M.; Cámara, M. y Goicoechea, H. 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Review. Talanta*. 124: 123–138.
- Centro de Ingeniería de Calidad. 2011. *Metodología superficie de la respuesta*. Alternativa para incrementar la productividad de los procesos. CO. Pag. 25
- Cervilla, N; Mufari, J; Calandri, E; Guzman, C. 2012. Determinación del contenido de aminoácidos en harinas de quinoa de origen argentino. *Evaluación de su calidad proteica. Actualización en nutrición*.
- Chee, L; Ayob, MK. 2013. Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction and functional characterization of palm kernel cake protein. *Food Science and Technology International*. 109-122.
- Chi, TM; Huong, H; Phong Ho; Yi-Hsu J. 2014. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. *Food Science and Technology*. 55 (2014) 621-626.
- Cochran, W; Cox, G. 1990. *Diseños experimentales*. 2da ed. Editorial Trillas. ME. 661 p.
- Cordero de los Santos, MY; Osuna, JA; Borodaneenko, A; Paredes, O. 2005. "Physicochemical and functional Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein Isolates Obtained by Isoelectric Precipitation and Micellisation". *Food Science and Tecnology International*. V. 11.
- Cortes, A; Gallardo, Y. 2005. *Obtención de Concentrados Proteicos a Partir de Alfalfa (Medicago sativa)*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. MX.
- Damodaran, S. 1997. Food proteins: An overview. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications*. pp. 1–21. New York: Marcel Dekker.
- Derringer, G; Suich, R. 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*. 12(4): 214-219.
- El Nasri, NA.; El Tinay, AH. 2007. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) protein concentrate. *Food Chem*. 2007, 103, 582–589.

- Escudero, NL; Arellano, ML; Luco, JM; Gimenez, MS Mucciarelli, SI. 2004. Comparison of the chemical composition and nutritional value of Amaranth cruentes flour and its protein concentrate.
- Espitia-Baena, J; Duran-Sandoval, H; Fandiño-Franky, J; Díaz-Castillo, F. y Gómez-Estrada, H. 2011. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). *Revista cubana de plantas medicinales*. 16(4): 337-346.
- FAO, 1970. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Roma, Italia. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Colección alimentación y nutrición.
- FAO, 1997. Cumbre mundial sobre la alimentación. Declaración de Roma sobre la seguridad Alimentaria Mundial y Plan de acción de la cumbre mundial sobre la alimentación. FAO. Roma.
- FAO/OMS/UNU, 1985. Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/ WHO/UNU Meeting. WHO, Geneva.
- Fennema, O. 2000. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza.ES.
- Fidantsi, A; Doxastakis, G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V. 21.
- Firatligil-Durmus, E; Evranuz, O. 2010. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology*. 43(2): 226-231.
- Flórez, EJ. 2012. Evaluación de pulpa de Totumo (*Crescentia cujete* L.) ensilada en dos estados de maduración como alternativa en alimentación bovina. *UCO. Córdoba, CO*. p. 44-51.
- Gazzola; Gnanasambandam, R; Hettuarachchy, N. 2014. *J. Food Sci*. 1995. 60:1066-1069, 1074.
- Goundan, S. 1992. Isolation and characterization of chenopodin, the major seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). Master's Theses and Graduate Research. San Jose State University. Paper 389.
- Grandtner, MM; Chevrette, J. 2013. Dictionary of Trees. Vol 2. South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology. 1172 p.
- Granito, M; Guerra, M; Torres, A; Guinand, J; 2004. Efecto del procesamiento Sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*. *INCI*. 2004. 29 (9): 521-526.
- Guerrero-Ochoa, MR; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Science and Technology*.
- Hartree, EF. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 48(2): 422-427.
- Hernández, E. y Campos, A. 2007. Utilización del zumo de jícara (*Crescentia cujete* L.) en el tratamiento de la dermatomicosis en terneros de la raza reina en la finca Santa Rosa de la UNA. Tesis. Universidad Nacional Agraria, NI.
- Jacobsen, S; Mujica, A. 2003. The genetic resources of Andean grain amaranths (*Amaranthus caudatus* L., *A. cruentus* L. and *A. hypochondriacus* L.) in America. *Plant Genetic Resources Newletters* .1-8.
- Jarpa-Parra, M; Bamdad, F; Wang, Y; Tian, Z; Temelli, F; Jay Han; Chen. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT-Food Science and Technology*. 57(2014):461-469.



- Jayasena, V; Chij; Nasar-Abbas. 2010. Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at Various pH Levels. *Food Science and Technology*. 17(27): 25-32.
- Joglekar, M. y May, T. 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Food World*.
- Karaca, AC; Low, N; Nickerson, M. 2011. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*.
- Kaushik, P; Dowling, K; McKnight, S; Barrow, CJ; Wang, B; Adhikari, B. 2016. Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolated. *Food Chemistry*.
- Khalid, EK; Babiker, EE, El Tinay AH. 2003. Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration, *Food Chem*.
- Kinsella, JE. 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of American Association of Oil Chemists' Society*, 56, 242-258.
- Lampart-Szczapa, E. 2001. Chemical and functional properties of food proteins. (Z. E. Sikorski, Ed.) Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- Lazcano, M; Cuellar, D. 2004. Caracterización de una golosina amaranto-avena-miel. *Memorias VI Congreso de Ciencias de los Alimentos. Revista Salud Pública y Nutrición*. Ed.6.
- Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, S. H., Kim, J. T., Han, S. J., Jung, M. Y., & Chung, I. M. 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(11), 3382-3389.
- Lestari, D; Mulder, W; Sanders, J. 2011. Jatropha seed protein functional properties for technical applications. *Biochemical Engineering Journal*. 3(53):297-304
- Linden, G; Loriet, D. 1994. *Bioquímica agroindustrial. Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Ed. Acribia. 1994:65-70.
- López, O; Márquez, T; Salomón, S; Gonzalez, M. 2009. Extracción de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(2): 1–6.
- López S, SE. 2011. Tesis. Caracterización bioquímica y Solubilización de los precipitados formados en el jugo clarificado de Arazá (*Eugenia stipitata*) obtenido por procesos enzimáticos y membranarios. Riobamba, EC. Pag. 9.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randal, RJ. 1951. Protein analysis with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265–275.
- Lqari, H; Vioque, J; Pedroche, J; Milan, F. 2002. Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization, *Food Chem*.
- Luna, G. 2007. Análisis fisicoquímico y evaluación del rendimiento de extracción del aceite de semilla de Morro (*Crescentia alata* HBK) proveniente de las regiones de Estanduela, Zacapa y San Agustín Acasagatlán, El Progreso. Tesis Ingeniería Química. Universidad de San Carlos de Guatemala. GU
- Luque G, MV. 2009. Estructura y propiedades de las proteínas. Centro de investigaciones. Universidad de Valencia. ES.
- Ma, T; Wang, Q; Wu, H. 2010. Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 43(9):1450-1455.
- Mabberley D, J. 2008. *The Plant Book: A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses*. Cambridge University Press. Cambridge. P. 227.

- Madhukar; Virendra, K; Sunil KS; Nawal, K; Dubey. 2013. Revision of Genus *Crescentia* L. (Bignoniaceae) in India. *American Journal of Plant Sciences*. 4:1164-1168 (en línea). Consultado 25 setiembre 2014. Disponible en <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.46143>
- Malomo, SA; He, R; Aluko, RE. 2014. Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, 79, C1512-C1521.
- Mao, X; Hua, Y. 2012. Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 1561-1581.
- Marrugo, LY; Montero C, Piedad, Duran LM. 2012. Propiedades funcionales de concentrados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata*. *Vitae*, vol. 19, núm. 1, 2012, pp. S403-S405. Universidad de Antioquia. Medellín. CO.
- Martínez, J; Medina, O; Zambrano, R. 2011. Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya (*Passiflora edulis* f.). Universidad de Pamplona. CO. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 9, núm. 1, 2011, pp. 70-76.
- Mathews, CK; Van Holde, KE; Ahern, KG. 2002. *Bioquímica*. PEARSON 3 ed.
- Megías, C; Cortés-Giraldo, I; Girón-Calle, J; Vioquw, J; Alaiz, M. 2015. Determination of L-canavanine and other free aminoacids in *Vicia disperma* (Fabaceae) seeds by precolumn derivatization using diethyl ethoxymethylenemalonate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta* 131 (2015) 95-98.
- Mizubuti, IY; Junior, OB; Souza, LW; Silva, RS; Ida, EI. 2000. Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry*, 70, 259-265.
- Montgomery, D. 2005. *Diseño y análisis de experimentos*. 2 ed. Ed. Limusa. Universidad Estatal de Arizona. EE.UU.
- Moure, A; Domínguez, H; Parajó, JC. 2006. Functionally of oilseed protein products: A review. *Food Research International*. 2006, 39:945–963.
- Murgueitio, E; Ibrahim, M. 2004. Conferencia agroforestería, ganadería y medio ambiente en américa latina. XII congreso venezolano de producción e industria animal. 190-192 p.
- Murray, K; Robert; Granner K. Daryl; Meyes A. Peter y Rodwell W. Victor. 2005. *Bioquímica de Harper*. 14 ed ES. ED. Acribia. Zaragoza. ES.
- Nandita D; Ekramul I; Nusrat J; Mohamed S, I; Alam K; Rafikul I; Shahnaj P. 2014. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14:45 (en línea). Consultado 16 setiembre 2014. Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/45>
- Naranjo B, MF; Suquilanda P, MT. 2013. Obtención de Concentrado Proteico por Hidrólisis Enzimática a partir del Salvado de Arroz de Variedades Ecuatorianas. Tesis de Grado en ingeniería de Alimentos. Fac. Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. ESPOL. Guayaquil, EC.
- Nelson, D; Cox, M. 2001. *Principios de bioquímica*. Legninger. 4 ed. ES.
- Olalekan, OS; Folake, O; Henshaw; Mock; Hans-Peter; Santos, A; Awonorin, SO. 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut, *Food Chemistry* 115 (2009) 852–858.
- Olivos-Lugo, BL; Valdivia-López, MA; Tecante, A. 2010. Thermal and Physicochemical Properties and Nutritional Value of the Protein Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International*. 89-96.

- Orrego C. 2008. Congelación y liofilización de alimentos. 1ª ed. Manizales, CO. Artes gráficas Tizan.
- Otero R; Núñez V; Barona J; Fonnegra R; Jiménez S; Osorio R. 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol.* 7:3233-41.
- Pedroche Justo, María M. Yust, Cristina Megías, Hassane Lqari. 2004. Utilisation of rapeseed protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Instituto de la Grasa. Sevilla- ES.
- Peralta, ME. 2004. Caracterización bioquímica de las proteínas de las semillas de *Jatropha Curcas* L. Tesis Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos.
- Phillips, L. G; Whitehead, D. M; Kinsella, J. 1994. Structure-function properties of food proteins. San Diego, California, Estados Unidos de Norteamérica: Academic Press.
- Pinciroli N; Bezus, R; Maiale, S; Vidal, A. 2006. Caracterización de aislados proteicos de arroz de variedades de alto y normal contenido de proteína. UNLP. La Plata. AR.
- Pomeranz, Y. 1991. Functional properties of food components (2 ed.). San Diego, California, Estados Unidos de Norteamérica: Academic Press.
- Provanzal, MP; Cuq, JL. A.; Cheftel, JC. 1975. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid cross-links and isomerization of lysine residues. *J. Agric. Food Chem.* 23, 938-943.
- Pszczola DE. 2000. Genes and diet: the specialized role ingredients may play. *Food Technology.* 82-84.
- Quanhong, L; Caili, F. 2005. Application of response Surface methodology for extraction optimization og germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry* 92: 701-706.
- Ranhotra, G; Gelroth, J; Glaser, B; Lorenz, K; Jhonson, D. 1993. Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal Chemistry.* 70(3) 303-305.
- Rivera, MM. 2006. Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de quinua orgánica (*Chenopodium Quinoa*). Tesis Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas,
- Robles, M; Mora, R. 2007. Influencia del Método de Obtención en las Características Fisicoquímicas, y Estructurales de Aislados de soya. Depart. de Graduados en Alimentos. Sto. Tomás, MX.
- Rodríguez, R; Sánchez, C; Rodríguez, J. 2002. Efecto de la temperatura sobre películas de un aislado proteico del suero bovino (WPI) adsorbidas sobre la interfase aceite-agua. Facultad de Química. Universidad de Sevilla. ES.
- Rosset, M; Acquaro, VR; Beléia, DP. 2014. Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation.* 38(3):784-790.
- Ruíz, C; Díaz, C; Anaya, J; Rojas, R. 2013. Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de dos especies del sachu inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Rev. Sociedad Química Perú.* 79(1):29-36.
- Saetae, D; Kleekayai, T; Jayasena, V; Suntomsuk, W. 2011. Functional properties of protein isolate obtained from Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) seed cake. *Food Science and Biotechnology.*
- Salcedo-Chávez , B; Osuna- Castro, JA; Guevara-Lara F; Dominguez, J; Paredes, O. 2012. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from Amaranth (*Amarantus cruentus*) seeds” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . V. 50

- Salazar, R; Soihet, C. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. CATIE. Costa Rica. (En línea). Consultado en setiembre de 2014. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/a0009s/a0009s.htm>
- Sandoval, MR. 2012. Aislamiento y caracterización de las proteínas de reserva de chíá (*Salvia hispanica* L.). Tesis Mg. Ciencia y Tecnología de alimentos. Fac. Química. UAQ. Santiago de Querétaro, Qro.
- Sari, Y; Bruins, M; Sanders, J. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*. 43: 78– 83.
- Sathe, SK; Kshirsagar, HH; Sharma, GM. 2014. Solubilization, fractionation and electrophoretic characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) Protein. *Plant Food Hum Nutr* 67:247-255.
- Serratos, AJ. 2001. Aislamiento y caracterización de proteínas de semillas maduras de *Enterolobium cyclocarpum* para su aprovechamiento alimenticio. Tesis Doctor en Ciencias pecuarias. Universidad de Colima. Colima, MX. 76p.
- Shewry, PR. 2002. Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53:947-958.
- Shridar, K; Sathe; Harshal, H. Kshirsagar, Girdhari M. Sharma. 2012. Solubilization, fraccionation, and electrophoretic Characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. *Plant Foods Hum. Nutr* (2012) 67:247-255.
- Simaj; García, R. 2004. Utilización del zumo de guira (*Crescentia cujete*) en el tratamiento de endometritis en hembras bovinas. Villa Clara. CU.
- Smith, BA; Dollear, FG. 1947. Oil from Calabash seed, *Crescentia cujete* L. Southern Regional Research Laboratory. New Orleans, Louisiana. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*. Pp. 52-54 (en línea). Consultado 25 setiembre 2014. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02642127>
- Spiegel, M. 1991. Estadística. 2º ed. ED.McGraw-Hill. Madrid, ES. 556 p.
- Toews, R; Wang, N. 2013. Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *R*. 52 (2013) 445–451.
- Urrutia GW. 2010. Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de Tarwi (*Lupinus mutabilis*). Tesis Ing. Agroindustrial. Fac. Ingeniería. UNMBA. Abancay, PE.
- Velázquez, G. 2006. Fundamentos de alimentación saludable. Editorial universidad de Antioquia. Medellín. CO. 84p (en línea). Consultado 26 setiembre de 2014. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=8eFgywpXq8EC&pg=PA101&dq=proteinas.pdf&hl=en&sa=X&ei=3LwTVJwms5CxBJ3wgvL&ved=0CCIQ6AEwAQ#v=onepage&q=proteinas.pdf&f=false>
- Ventura, M; Elías, C; Salvá, B. 2005. Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios. UNALM. Lima. PE.
- Vieira, R. 2003. Fundamentos de bioquímica. Edición electrónica. Belém. Pará.
- Viena, VL; Mendieta, TO; Briceño BL. 1993. Estudio de las propiedades funcionales de aislado proteínico de torta de coco. *Folia Amazónica* Vol. 5(1-2). IIAP.
- Vioque, J; Clemente, A; Pedroche, J; Yust, M; Millán, F. 2001. Grasas y Aceites. Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, 4, 41012-

- Sevilla. SPAIN. Vol. 52 (2): 132-136. (en línea). Consultado 27 setiembre 2014. Disponible en <http://digital.csic.es/bitstream/10261/22048/1/388.pdf>
- Wani, A; Kaur, D; Ahmed, I; Sogi, S. 2008. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. Journal Elsevier Inc. Vol. 41(8):1514-1520 (en línea). Consultado 28 setiembre 2014. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807003295>
- Wu, H; Wang, Q; Maa, T; Ren, J. 2009. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Res. Int.* 42: 343–348.
- Zamora, S; García, J; Bonilla, G; Aguilar, H; Harvey, C; Ibrahim, M. 2001. ¿Cómo utilizar los frutos de Guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), guácimo (*Guazuma ulmifolia*), genízaro (*Pithecellobium saman*) y jícaro (*Crescentia alata*) en alimentación animal?. *Agrofestería en las Américas*. 45-49.
- Zhao, J; Tian, Z; Chen, L. 2011. Effects of deamidation on aggregation and emulsifying properties of barley glutelin. *Food Chem* 128:1029–1036.
- Zhang, T; Jiang, B; Mu, W; Wang, Z. 2009. Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*. 23(1), 146–152.

## VIII. ANEXOS

### 8.1. Constancias

#### 8.1.1. Informe de ensayo del análisis químico de la harina de Huingo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE NUTRICIÓN  
LABORATORIO DE EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS  
Av. La Molina s/n - La Molina  
TELEFAX 3480830

#### INFORME DE ENSAYO LENA N° 0444/2015

CLIENTE : RICARDO GUERRERO  
NOMBRE DEL PRODUCTO : Harina de Huingo  
(Denominación responsabilidad del cliente)  
MUESTRA : PROPORCIONADA POR EL CLIENTE  
FECHA DE RECEPCIÓN : 20-04-2015  
FECHA DE ANÁLISIS : Del 20/04/15 al 23/04/15  
CANTIDAD DE MUESTRA : 64.34 gramos  
PRESENTACION : Muestra en bolsa de polietileno  
IDENTIFICACION : AQ-0444/2015

#### RESULTADOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

ANÁLISIS	Resultados
a.- HUMEDAD, %	10.28
b.- PROTEÍNA TOTAL (N x 6.25), %	16.94
c.- GRASA, %	27.30
d.- FIBRA CRUDA, %	22.44
e.- CENIZA, %	2.30
f.- ELN <sup>1</sup> , %	20.74

ELN<sup>1</sup> = EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO

#### Métodos utilizados:

a.- AOAC (2005), 960.46      d.- AOAC (2006), 962.09  
b.- AOAC (2005), 984.13      e.- AOAC (2006), 942.05  
c.- AOAC (2006), 2003.05

Atentamente,

La Molina, 23 de Abril del 2015

Ing. Gloria Palacios Pinto  
Jefe del Laboratorio de Evaluación  
Nutricional de Alimentos

8.1.2. Informe de ensayo del análisis químico de la harina desgrasada de semillas de Huingo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION  
LABORATORIO DE EVALUACION NUTRICIONAL DE ALIMENTOS  
Av. La Molina s/n - La Molina  
TELEFAX 3480830

INFORME DE ENSAYO LENA N° 0650/2015

CLIENTE : Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía  
NOMBRE DEL PRODUCTO : Harina de Huingo  
(Denominación responsabilidad del cliente)  
MUESTRA : PROPORCIONADA POR EL CLIENTE  
FECHA DE RECEPCIÓN : 10-06-2015  
FECHA DE ANÁLISIS : Del 10/06/15 al 11/06/15  
CANTIDAD DE MUESTRA : 06 gramos  
PRESENTACION : de la muestra en bolsa de polietileno sellada  
IDENTIFICACION : AQ-0650/2015

RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICO

ANALISIS	Resultados
a.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	22.63

Métodos utilizados:

a.- AOAC (2005), 984.13

Atentamente,

Ing. Gloria Palacios Pinto  
Jefe del Laboratorio de Evaluación  
Nutricional de Alimentos

La Molina, 11 de Junio del 2015

### 8.1.3. Informe de ensayo del análisis químico del concentrado proteico



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION  
LABORATORIO DE EVALUACION NUTRICIONAL DE ALIMENTOS  
Av. La Molina s/n - La Molina  
TELEFAX 3480830

INFORME DE ENSAYO LENA N° 0217/2016

CLIENTE : UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONÍA

NOMBRE DEL PRODUCTO : Concentrado Proteico  
(Denominación responsabilidad del cliente)

MUESTRA : PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

FECHA DE RECEPCIÓN : 09-02-2016

FECHA DE ANÁLISIS : Del 09/02/16 al 10/02/16

CANTIDAD DE MUESTRA : 218 gramos

PRESENTACION : Muestra en bolsa platinada y sellada

IDENTIFICACION : AQ16-0217

RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICO

ANALISIS	Resultado
a.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	62.80

Métodos utilizados:  
a.- AOAC (2005), 984.13

Atentamente,

La Molina, 10 de Febrero del 2016

  
Dra. Gladys Carrión Carrera  
Jefe (e) del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos





## 8.1.4. Análisis del perfil de aminoácidos



# LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



## INFORME DE ENSAYOS

N° 009122- 2016

**SOLICITANTE** : UNIVERSIDAD NACIONAL INTERCULTURAL DE LA AMAZONIA  
**DIRECCIÓN LEGAL** : CARRETERA SAN JOSE KM. 0,3 - YARINACOCCHA - CORONEL PORTILLO - UCAYALI  
 RUC : 20393146657 Teléfono : ---  
**PRODUCTO** : SEMILLAS DE HUINGO  
**NUMERO DE MUESTRAS** : Uno  
**IDENTIFICACIÓN/MTRA** : HSH  
**CANTIDAD RECIBIDA** : 177 g (+ envase) de muestra proporcionada por el solicitante.  
**MARCA(S)** : S.M.  
**FORMA DE PRESENTACIÓN** : Envasado, la muestra ingresa en bolsa de polietileno cerrado.  
**SOLICITUD DE SERVICIOS** : S/S N°EN- 004465 -2016  
**REFERENCIA** : PERSONAL  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 31/08/2016  
**ENSAYOS SOLICITADOS** : FÍSICO / QUÍMICO  
**PERÍODO DE CUSTODIA** : No aplica

### RESULTADOS:

#### ENSAYOS FÍSICOS / QUÍMICOS:

ALCANCE: N.A.

ENSAYOS	RESULTADO
1- Aminoácidos	
- Ácido Aspártico (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,05
- Ácido Glutámico (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,15
- Serina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,03
- Glicina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,04
- Histidina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,00
- Treonina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,08
- Alanina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,01
- Arginina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,07
- Prolina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,06
- Timina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,01
- Valina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,02
- Metionina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,01
- Isoleucina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,02
- Leucina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,04
- Fenilalanina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,05
- Lisina (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,02
2- Proteína (g / 100g de muestra original)(Factor: 6,25)	19,7
3- Triptófano (g de aminoácido / 100 g de muestra original)	0,83

CONTINUA INFORME DE ENSAYOS N° 009122 - 2016

Pág. 1/2

### 8.1.5. Datos de liofilización

#### FORMATO DE FUNCIONAMIENTO DE LIOFILIZADOR

FECHA: 21/01/16	HORA INICIO: 12:09	HORAS/TRABAJADAS/EQUIPO: 19:07:14
CURSO u OTRA ACTIVIDAD: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (TESIS)		
PROFESOR/ASESOR/INVESTIGADOR: ING. HUMBERTO RIVERA		
NOMBRE DEL ALUMNO: HANY RAMIREZ ORSI / ELIZABETH ESPINOZA VÁSQUEZ		
(Persona encargada de monitorear el liofilizado) ING. HUMBERTO RIVERA		
ALIMENTO A LIOFILIZAR: EXTRACTO DE SEMILLA DE HUINGO		

Nº	TIEMPO (h)	Tº MUESTRA (°C)	Tº CONDENS (°C)	PRESION VACIO (Pa)
1	12:09 pm	-15	20	101325 Pa
2	12:39	-27	-53	
3	01:09	-37	-55	
4	01:11	-40	-55	
5	01:29	-18	-52	1 Pa
6	02:29	-18	-51	1 Pa
7	03:29	-18	-51	1 Pa
8	04:29	-17	-51	1 Pa
9	05:29	-17	-51	1 Pa
10	06:29	-17	-52	1 Pa
11	07:29	-17	-52	1 Pa
12	08:29	-16	-52	1 Pa
13	09:29	-15	-52	1 Pa
14	10:29	-14	-52	1 Pa
15	11:29	-12	-52	1 Pa
16	12:29	-11	-53	1 Pa
17	01:29 a.m	-10	-53	1 Pa
18	02:29	-08	-53	1 Pa
19	03:29	-08	-53	1 Pa
20	04:29	-08	-53	1 Pa
21	05:29	-07	-53	1 Pa
22	06:29	-05	-53	1 Pa
23	07:29	-0	-54	1 Pa
24	07:39	+2	-54	1 Pa
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
34				
35				
36				
37				

OBSERVACIONES:

NOMBRE/ENCARGADO/PROCESO DE LIOFILIZADO	<i>Hany Ramirez Orsi</i>	<i>Elizabeth Espinoza Vasquez</i>
<i>Hany Ramirez Orsi</i>	FIRMA	

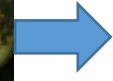
HANY RAMIREZ ORSI  
ELIZABETH ESPINOZA VÁSQUEZ

## 8.2. Fotos

### 8.2.1. Etapa 1. Acondicionamiento de la muestra



FRUTOS DE HUIGO



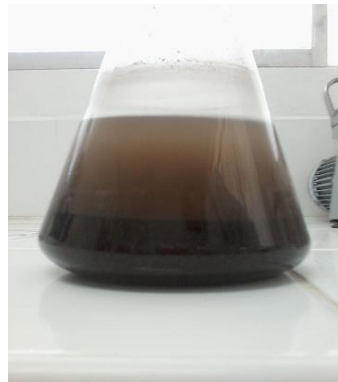
LAVADO DE SEMILLAS



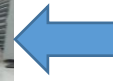
SEMILLAS



SECADO



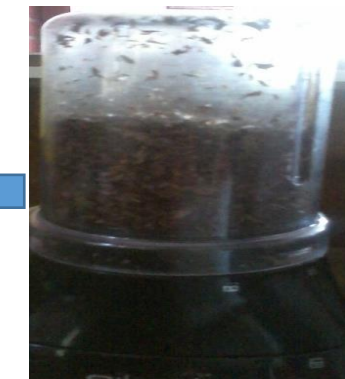
HDSH



DESGRASADO



HARINA DE LA SEMILLA



TRITURADO

### 8.2.2. Etapa 2. Determinación del solvente de extracción

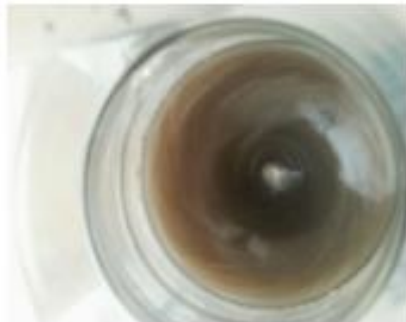


SOLUBILIZACIÓN MEDIANTE  
AGITACIÓN MAGNÉTICA

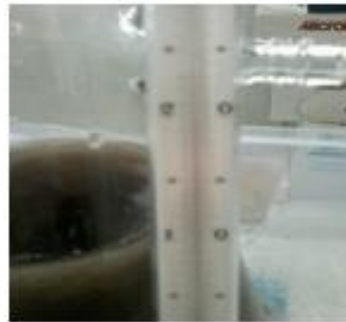


PROTEÍNA SOLUBILIZADA EN  
DIFERENTES SOLVENTES

### 8.2.3. Etapa 3. Extracción de proteína



EXTRACCIÓN CON  $\text{NaOH}$   
MEDIANTE AGITACIÓN MAGNÉTICA



CONTROL DE TEMPERATURA  
ÓPTIMA

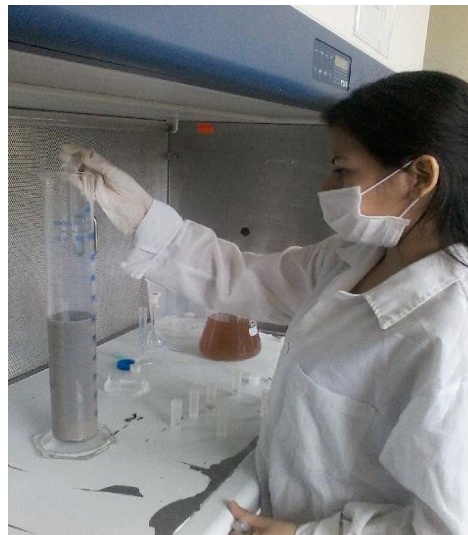
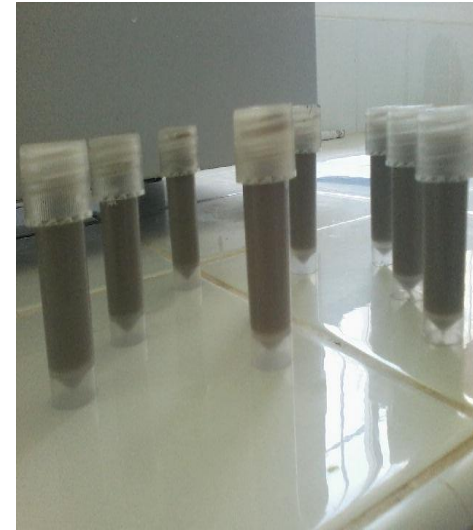


PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNA  
EN EL PUNTO ISOELÉCTRICO



CENTRIFUGACIÓN DE  
PROTEÍNA

#### 8.2.4. Obtención de extracto proteico



### 8.2.5. Aislamiento de la proteína



PRECONGELACIÓN DE LA MUESTRA MEDIANTE AGITACIÓN MAGNÉTICA



EXTRACTO PROTEICO ACOMODADO EN PLATOS DE LIOFILIZADOR PARA SU PROCESO



PROTEÍNA LIOFILIZADA



PROTEÍNA EN PROCESO DE LIOFILIZACIÓN



PROTEÍNA LISTA PARA LIOFILIZAR

### 8.2.6. Pruebas funcionales



PROTEÍNA EN AGUA LUEGO DE CENTRIFUGACIÓN



PROTEÍNA EN ACEITE LUEGO DE CENTRIFUGACIÓN

### 8.3. Otras evidencias de la investigación

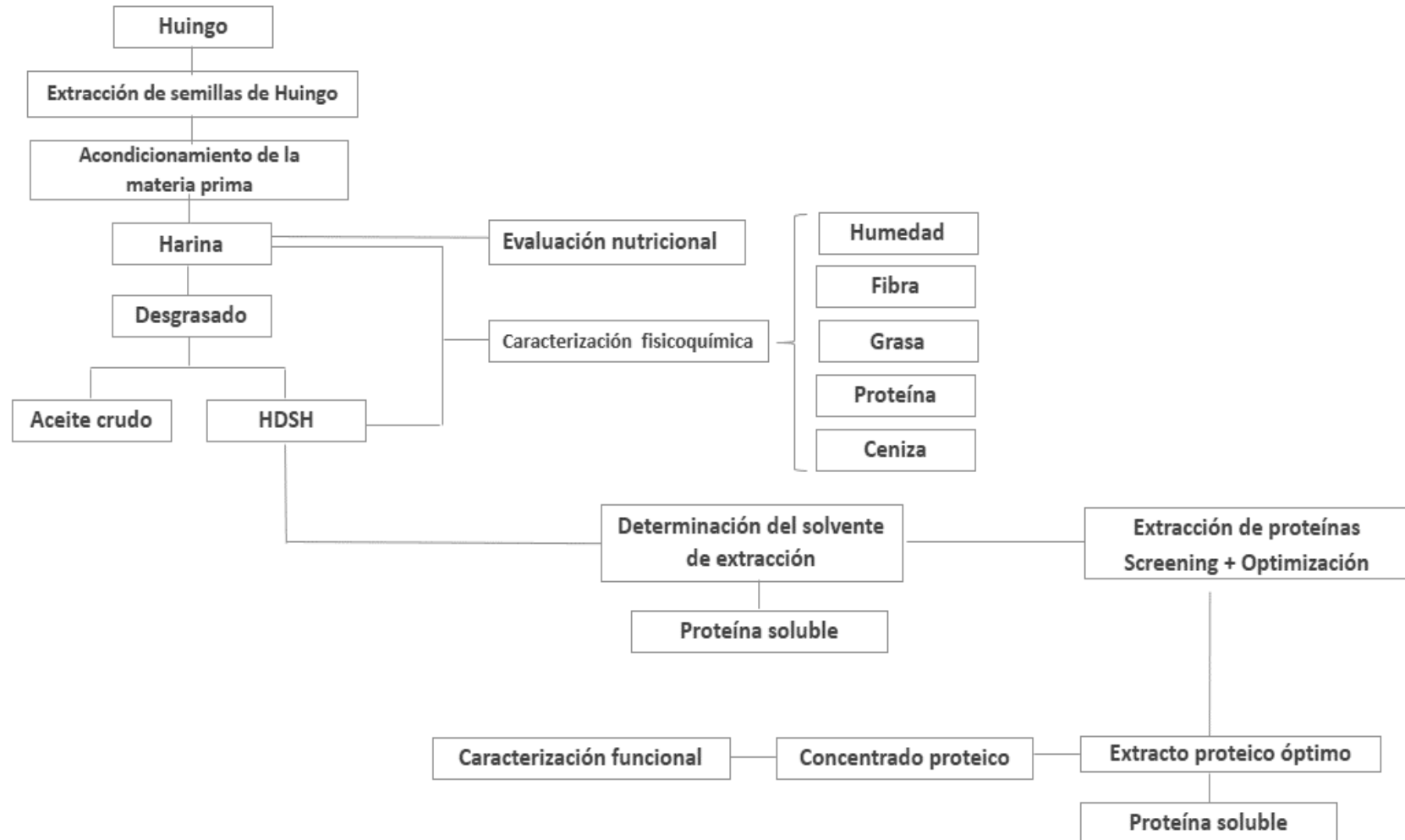
#### 8.3.1. Formato de codificación de semillas de Huingo

CÓD.	FRUTO		SEMILLAS			
	PESO (gr)	N. SEMILLAS	PESO (gr)	DIAMETRO (cm)		
				LARGO	ANCHO	GROSOR
A001	1000	519	24.212	0.8	0.6	0.2
A002	1100	578	27.534	0.8	0.7	0.1
A003	800	289	13.903	0.7	0.6	0.1
A004	600	210	19.795	0.7	0.6	0.1
A005	600	205	19.625	0.7	0.6	0.2
A006	550	176	17.652	0.6	0.5	0.2
A007	800	305	13.726	0.7	0.6	0.1
A008	900	436	22.88	0.8	0.6	0.2
A009	600	217	19.042	0.8	0.6	0.1
A010	3100	672	21.652	0.7	0.7	0.1
A011	2900	573	21.993	0.7	0.6	0.1
A012	1000	538	26.8	0.7	0.6	0.2
A013	1000	600	27.787	0.7	0.5	0.2
A014	700	505	21.565	0.7	0.6	0.1
A015	600	223	25.417	0.7	0.6	0.2
A016	700	314	19.601	0.7	0.6	0.1
A017	2800	434	27.679	0.8	0.7	0.1
A018	3450	758	36.171	0.8	0.7	0.1
A019	700	349	19.705	0.8	0.7	0.2
A020	3600	326	34.832	0.8	0.7	0.2
A021	3510	312	38.244	0.8	0.8	0.1
A022	4200	820	34.832	0.8	0.7	0.2
A023	3200	379	16.257	0.7	0.7	0.1
A024	3500	315	19.444	0.7	0.7	0.1
A025	4000	435	28.116	0.7	0.7	0.1
A026	4100	515	31.256	0.8	0.7	0.2
A027	3900	340	20.375	0.8	0.7	0.2
A028	3000	391	23.726	0.7	0.6	0.1
A029	4200	530	36.818	0.7	0.7	0.2
A030	3400	475	31.160	0.7	0.6	0.1
A031	4000	468	32.222	0.7	0.7	0.1
A032	3800	493	35.502	0.7	0.7	0.1
A033	4800	1514	32.807	0.7	0.7	0.2
A034	2500	652	23.101	0.8	0.7	0.2
A035	1700	785	35.255	0.8	0.7	0.1
A036	3700	1229	18.478	0.8	0.7	0.2
A037	1800	496	28.222	0.9	0.7	0.1
A038	1800	836	34.177	0.9	0.7	0.1
A039	2000	634	31.884	0.8	0.7	0.1
A040	3350	1335	33.154	0.7	0.6	0.2
A041	2300	1190	21.826	0.8	0.7	0.2
A042	3100	1070	23.996	0.8	0.7	0.1

FUENTE: Elaboración propia

## 8.4. Protocolos

### 8.4.1. Esquema general de la metodología del proyecto



FUENTE: Elaboración propia



#### 8.4.2. Métodos de análisis AOAC, 2005.

ANÁLISIS	METODOLOGÍA	CÁLCULO
<b>Humedad</b>	<p>Se pesará alrededor de 5–10 g de la muestra previamente molida y se colocará en un horno a 105°C por un mínimo de 12 h.</p> <p>Se dejará enfriar la muestra en un desecador.</p> <p>Se pesará nuevamente cuidando de que el material no este expuesto al medio ambiente.</p>	$H(\%) = \frac{(B-A) - (C-A)}{(B-A)} \times 100$ <p>A = Peso de la charolilla seca y limpia (g)            B = Peso de la charolilla + muestra húmeda (g)            C = Peso de la charolilla + muestra seca (g)</p>
<b>Lípidos</b>	<p>Se sacará del horno los matraces de extracción.</p> <p>Se enfriará en un desecador y se pesará con aproximación de miligramos. Se pesará en un dedal de extracción manejado con pinzas, de 3 a 5g de la muestra seca con aproximación de miligramos y se colocará en la unidad de extracción.</p> <p>Se conectará al extractor el matraz con éter de petróleo a 2/3 del volumen total. Se llevará a ebullición y ajustará el calentamiento para obtener alrededor de 10 reflujos por hora. Al término, se evaporará el éter con rotavapor y se colocará el matraz en el horno durante hora y media para eliminar el éter.</p> <p>Se enfriarán los matraces en un desecador y se pesará con aproximación de miligramos.</p>	$L(\%) = \frac{(B - A)}{C} \times 100$ <p>A = Peso del matraz limpio y seco (g)            B = Peso del matraz con grasa (g)            C = Peso de la muestra (g)</p>
<b>Proteína cruda</b>	<p>Se pesará con precisión de miligramos 1 g de muestra y se colocará en el matraz Kjeldahl; se agregará 10 g de sulfato de potasio, 0.7 g de óxido de mercurio y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocará el matraz en el digestor en un ángulo inclinado y caliente a ebullición hasta que la solución se vea clara, se calentará por media hora más. Se dejará enfriar; simultáneamente se adicionará poco a poco alrededor de 90 mL de agua destilada y desionizada. Ya frío se agregará 25 mL de solución de sulfato de sodio y mezclará. Se agregará 80 mL de la solución de NaOH al 40% manteniendo inclinado el matraz. Se formarán dos capas. Se conectará rápidamente el matraz a la unidad de destilación, se calentará y colectará 50 mL del destilado conteniendo el amonio en 50 mL de solución indicadora. Al terminar de destilar, se removerá el matraz receptor, se enjuagará la punta del condensador y titulará con la solución estándar de ácido clorhídrico.</p>	$N(\%) = \frac{((A \times B) \times 0.014)}{C} \times 100$ <p>P(%) = Nitrógeno en la muestra x 6,25</p> <p>A = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml)            B = Normalidad del ácido estándar            C = Peso de la muestra (g)</p>

<p><b>Fibra cruda</b></p>	<p>Se pesará con aproximación de miligramos de 2 a 3 g de la muestra desengrasada y se secará. Se colocará en el matraz y adicionará 200 mL de la solución de ácido sulfúrico en ebullición. Se colocará el condensador y llevará a ebullición en un minuto; de ser necesario se adicionará antiespumante. Se dejará hervir por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Se instalará el embudo Buchner con el papel filtro y precalentará con agua hirviendo. Simultáneamente y al término del tiempo de ebullición, se retirará el matraz, se reposa por un minuto y filtrará usando succión; esto en menos de 10 min. Se lavará el papel filtro con agua hirviendo. Se llevará el residuo al matraz conteniendo 200 mL de solución de NaOH en ebullición y dejará hervir por 30 min. Se precalentará el crisol de filtración con agua hirviendo y filtrará después de dejar reposar el hidrolizado por 1 min. Se lavará el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter de petróleo. Se colocará el crisol en el horno a 105°C por 12 horas y enfriará. Se pesarán los crisoles con el residuo (sin manipular) y colocará en la mufla a 550°C por 3 horas, se dejará enfriar en un desecador y pesará nuevamente.</p>	<p><math>F \text{ cruda (\%)} = \frac{(A - B)}{C} \times 100</math></p> <p>A = Peso del crisol con el residuo seco (g)  B = Peso del crisol con la ceniza (g)  C = Peso de la muestra (g)</p>
<p><b>Cenizas</b></p>	<p>En un crisol de porcelana que previamente se calcinará y se llevará a peso constante, se colocará de 2.5 a 5 gramos de muestra seca. Se colocará el crisol en una mufla y se calcinará a 550°C por 12 horas, se dejará enfriar y se pasará a un desecador. Con cuidado se pesará nuevamente el crisol conteniendo la ceniza.</p>	<p><math>Ceniza (\%) = \frac{(A - B)}{C} \times 100</math></p> <p>A = Peso del crisol con muestra (g)  B = Peso del crisol con ceniza (g)  C = Peso de la muestra (g)</p>

Fuente: AOAC (2005)

#### **8.4.3. Determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa (Analytical Biochemistry (1984)).**

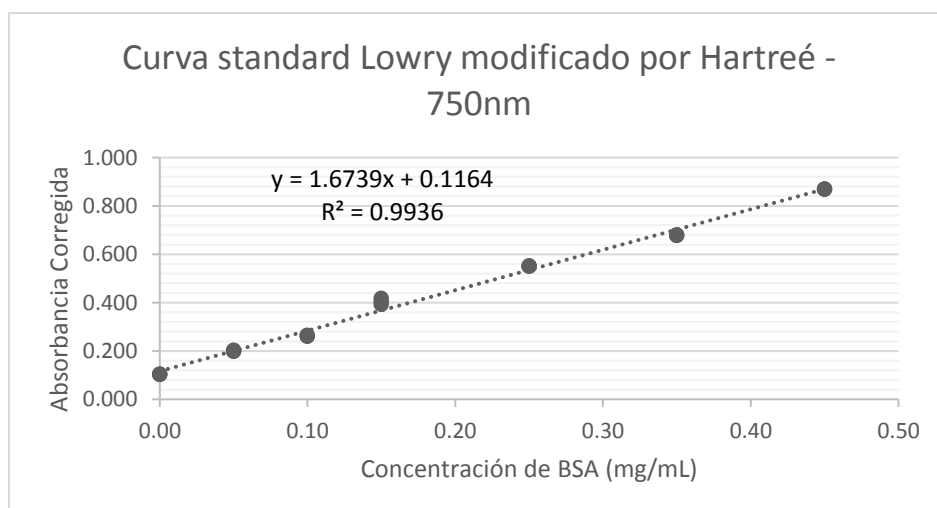
Las muestras de proteínas se hidrolizan en vacío durante 24 h a 110 °C en 6N HCl y el ácido se elimina por evaporación rotatoria. La muestra se analiza como tal en un analizador Dionex 502 y se acopla con fenilisotiocianato para su análisis. Una muestra (10 µL) de la mezcla patrón de aminoácidos en 0.1N HCl conteniendo sulfato de amonio y 25 nmol de cada uno de los 17 aminoácidos: Asp, Glu, Ser, Gly, His, Thr, Ala, Arg, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu, Phe y Lys. Se seca en un tubo de ensayo pequeño y se disuelve en 100 µL de tampón de acoplamiento (acetonitrilo:Piridina:triethylamina:H<sub>2</sub>O, 10:5:2:3). Esta solución se seca por evaporación rotatoria y los aminoácidos residuales se disuelven una vez más en 100 µL de tampón de acoplamiento. A esta solución se le añade 5 µL de fenilisotiocianato. Después de una reacción de 5 minutos a temperatura ambiente, la solución se evapora a sequedad por evaporación rotatoria bajo alto vacío (bomba de vacío: 50-100 mtorr). Los aminoácidos resultantes se disuelven en 250 µL de 0.05M de acetato de amonio, agua, o agua:acetonitrilo (7:2). Se analizan cantidades de 1 a 10 µL (100 a 1000 pmoles de cada aminoácido) por HPLC de fase inversa. Se derivatizan soluciones estándares de 0.01M de aminoácidos individuales incluyendo triptófano. Estos se preparan en agua, pero algunos, como la tirosina, requieren la adición de una pequeña cantidad de tampón de acoplamiento para efectuar la disolución. Alícuotas de 10 µL (100 nmol) se secan y derivatizan como se describió anteriormente, y se analizan porciones de 0.5 nmoles.

#### 8.4.4. Elaboración de Curva Estándar de albúmina de suero bovino

Cada fracción de proteína se ensaya para determinar su cantidad por medio de la utilización de albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar. El procedimiento consiste en elaborar una curva patrón con albúmina disuelta en suero fisiológico (NaCl 0.09%).

Se toma con una micropipeta concentraciones de 0.025, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 mL. Con diferentes puntas eppendorff se completan todos los volúmenes hasta 2.5 mL con suero fisiológico. Se separan cantidades iguales de muestra en tres tubos de ensayo (triplicado). Se agregan las soluciones de Lowry y se deja reposar el tiempo establecido de acuerdo con el método descrito por Lowry. Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 nm.

Los péptidos presentes en el sobrenadante de las muestras se determinan de acuerdo al método descrito por Lowry, la sensibilidad de este método oscila de 0.025 a 0.25 mL de proteínas, por lo que hay que estimar el porcentaje de proteínas aproximado que se espera en la muestra para caer en el rango de la curva (haciendo diluciones). Dibujar la curva de calibración: cantidad de BSA (eje de las abscisas) contra absorbancia obtenida a una longitud de onda de 750 nm (eje de las ordenadas). La absorbancia resultante de las muestras, se interpola a la curva de calibración y se extrapola de esta al eje de las X, para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra. La curva de calibración debe hacerse en paralelo con la medición de la muestra.



Fuente: Elaboración propia

$$y = 1.6739x + 0.1164$$

x: Concentración de BSA (mg/mL)

y: Absorbancia

#### 8.4.5. Método de Lowry *et al.* 1951

Modificado usando una alta concentración de solución alcalina de cobre para dar una curva de calibración más lineal (Hartree, 1972).

Las soluciones stock para Lowry se preparan de la siguiente forma:

- Solución A: 2% w/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Solución B: 4% w/v Tartrato de Sodio y Potasio
- Solución C: 3% w/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 0.1M NaOH
  
- Solución D: Se prepara al instante:

50 mL de Solución C + 0.50 mL de Solución B + 0.50 mL de Solución A

- Solución E: Se prepara fresco:  
Se diluye el Reactivo Folin Ciocalteu en agua, en relación de 1:1.

Ensayo:

- Se mide 0.5 mL de muestra (diluída a 0.25 mg/mL) y adiciona 2.5 mL de Solución D.
- Se mezcla en vórtex y deja reposar por 20 minutos a T° ambiente.
- Se adiciona 0.5 mL de Solución E.
- Se mezcla en vórtex y deja reposar por 40 minutos a T° ambiente (de preferencia sin luz).
- Se mide la absorbancia a 750 nm contra un blanco preparado con suero fisiológico 0.09%.