

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN AISLADO PROTEICO A PARTIR DE TORTA DESENGRASADA DE PIÑÓN BLANCO (*Jatropha curcas* L.)”.

TESIS

Para optar por el título profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presentado por el bachiller

JORGE ARTEMIO FASANANDO AMACIFUEN

TARAPOTO - PERÚ

2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN AISLADO PROTEICO A PARTIR DE TORTA DESENGRASADA DE PIÑÓN BLANCO (*Jatropha curcas* L.)”.

TESIS


Para optar por el título profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

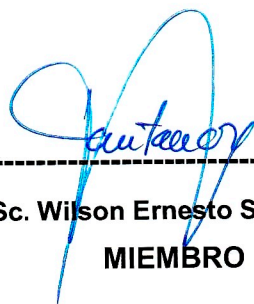
Presentado por el bachiller


JORGE ARTEMIO FASANANDO AMACIFUEN

SUSTENTADO Y APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO


Ing.M.Sc. Epifanio Efraín MARTINEZ MENA
PRESIDENTE


Ing. Dr. Euler NAVARRO PINEDO
SECRETARIO


Ing. M. Sc. Wilson Ernesto SANTANDER RUIZ
MIEMBRO


Ing. Dr. Oscar Wilfredo MENDIETA TABOADA
ASESOR

TARAPOTO – PERÚ

2012

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	7
AGRADECIMIENTO	8
RESÚMEN	9
SUMMARY	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Origen y distribución del piñón blanco	12
2.2. Características botánicas	13
2.2.1. Taxonomía	13
2.2.2. Descripción botánica	14
2.2.2.1. Ciclo Vegetativo	18
2.2.3. Sistemas de propagación del piñón blanco	18
2.3. Localización y producción	20
2.3.1. Áreas potenciales para el cultivo de piñón blanco.....	20
2.3.2. El cultivo del piñón en la Amazonía peruana	21
2.4. Variedades	21
2.5. Usos y composición química del piñón blanco	22
2.5.1. Usos	22
2.5.2. Composición química	24
2.5.2.1. Componentes químicos de las semillas y aceite de piñón blanco ..	25
2.6. Proteína.....	26
2.6.1. Fuentes de proteínas	26
2.6.2. Análisis de proteínas en alimentos.....	27
2.6.3. Características de las proteínas.....	27
2.6.4. Funciones de las proteínas	28
2.6.5. Propiedades de las proteínas.....	28
2.6.6. Clasificación de las proteínas	29
2.6.6.1. Según su forma	29
2.6.6.2. Según su composición química.....	29
2.6.7. Estructura de las proteínas	29
2.6.7.1. Niveles de estructuración.....	30
2.6.7.1.1. Estructura primaria	30
2.6.7.1.2. Estructura secundaria	31
2.6.7.1.3. Estructura terciaria	32
2.6.7.1.4. Estructura cuaternaria	32
2.7. Desnaturalización de las proteínas.....	33
2.7.1. Pérdida de función	34
2.7.2. Factores desnaturalizantes	35
2.7.2.1. Efecto de la polaridad del disolvente sobre la estructura de las proteínas.....	35
2.7.2.2. Efecto del pH sobre la estructura de las proteínas.....	35
2.7.2.3. Efecto de la temperatura sobre la estructura de las proteínas	36
2.7.2.4. Determinación de la estabilidad proteica	36
2.8. Aislados proteicos	38
2.9. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos.....	46

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
3.1. Lugar de ejecución.....	48
3.2. Materiales y equipos	48
3.2.1 Equipos	48
3.2.2. Materiales de laboratorio	48
3.2.3. Reactivos	49
3.3. Desarrollo experimental.....	49
3.3.1. Metodología experimental	49
3.3.2. Descripción del proceso	50
3.3.3. Cinética de extracción de la proteína.....	53
3.3.4. Diseño Experimental y Análisis de datos	55
3.3.5. Análisis físico químico.....	56
3.3.6. Cálculo para la determinación del contenido de aminoácidos	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1. Análisis físico químico.....	57
4.2. Curva Patrón de proteína.....	58
4.3. Cinética de extracción	59
4.4. Superficie de Respuesta	67
4.5. Rendimiento de extracción de proteínas	74
4.6. Cálculo para la determinación del contenido de aminoácidos	74
V. CONCLUSIONES.....	76
VI.RECOMENDACIONES.....	77
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	78
VIII. ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Hojas, flores y frutos de piñón blanco.....	14
Figura 2:	Raíz de piñón blanco.	15
Figura 3:	Hoja de piñón blanco.	15
Figura 4:	Flor de piñón blanco.	16
Figura 5:	Fruto de piñón blanco.....	17
Figura 6:	Semilla de piñón blanco.	18
Figura 7:	Áreas potenciales para el cultivo de <i>Jatropha curcas</i> L. en el Perú.	20
Figura 8:	Estructura de las proteínas.	33
Figura 9:	Desnaturalización de la proteína.....	33
Figura 10:	Delineación de la superficie de respuesta del porcentaje de proteína extraída Y_1	41
Figura 11:	Delineación de la superficie de respuesta de la concentración de proteína extraída en el maní Y_2	42
Figura 12:	Área superpuesta de las delineaciones de Y_2 sobre Y_1	42
Figura 13:	Efecto del pH en la extracción de la proteína de la torta de piñón. ...	43
Figura 14:	Efecto de la temperatura en la extracción de la proteína en la torta de piñón	44
Figura 15:	Obtención de Aislado Proteico.	50
Figura 16:	Torta desengrasada de piñón blanco	51
Figura 17:	Precipitación de la proteína.....	52
Figura 18:	Proteína precipitada y deshidratada.	53
Figura 19:	Curva patrón de concentración de proteína.....	59
Figura 20:	Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 9.	60
Figura 21:	Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 9	60
Figura 22:	Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 10.....	61
Figura 23:	Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 10	62
Figura 24:	Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 11.....	62
Figura 25:	Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 11	63
Figura 26:	Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/5.....	64
Figura 27:	Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/5	64
Figura 28:	Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/10.....	65
Figura 29:	Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/10	66
Figura 30:	Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/15.....	66
Figura 31:	Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/15	67
Figura 32:	Estimación de los efectos en la extracción.....	68
Figura 33:	Coeficientes de Regresión	69
Figura 34:	Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón.....	70
Figura 35:	Comportamiento de los distintos valores de pH.....	71
Figura 36:	Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la	

	concentración de proteínas de piñón.....	72
Figura 37:	Comportamiento de las distintas relaciones de extracción de proteínas.....	72
Figura 38:	Efecto del tiempo de extracción sobre la concentración de proteínas de piñón.....	73
Figura 39:	Área óptima de proceso.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Áreas con potencial para el cultivo de piñón blanco en la Amazoníaperuana.	21
Cuadro 2: Análisis fisicoquímicos de frutos de piñón blanco	25
Cuadro 3: Análisis químico de la semilla de piñón blanco.....	26
Cuadro 4: Composición de aminoácidos del concentrado proteico obtenido de la tortade piñón	40
Cuadro 5: Composición química de la torta de piñón (g/Kg de materia seca).	40
Cuadro 6: Aminoácidos en la torta de piñón.	45
Cuadro 7: Composición química de la torta de piñón y su aislado proteico (base seca).....	45
Cuadro 8: Valores reales y codificados para la realización del análisis estadístico	55
Cuadro 9: Composición físico - química promedio (%) de la torta de semilla de piñón y su aislado proteico.	57
Cuadro10: Datos experimentales para la elaboración de la curva patrón.....	58
Cuadro 11: Datos experimentales de concentración de proteína.	59
Cuadro 12: Contenido de aminoácidos del aislado proteico según elmétodo teórico de cómputo de aminoácidos.	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Análisis de varianza de los datos experimentales.....	82
Anexo 2: Valores de los parámetros de control del ajuste de los datos (Mayor R^2)	82
Anexo 3: Valores de los parámetros de control del ajuste de los datos (Menor R^2).....	83
Anexo 4: Prueba de significancia de Tuckey para la relación de extracción..	83
Anexo 5: Prueba de significancia de Tuckey para el pH de extracción.	83
Anexo 6: Balance de masa del proceso.	84

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación, le dedico con todo mi amor y cariño a mi hijo **Fabio Antonio**, a mis padres: **Jorge Fasanandoy Norma Amacifueny** por supuesto a toda mi familia, que con su dedicación, ejemplo y amor; inculcaron en mí, valores que ayudaron a formarme y crecer como persona, apoyándome y motivándome siempre, para cumplir con mis objetivos y metas trazadas.

A mis abuelitos **Carmela, Artemio, Estela y Eli**, a mis hermanas **Cintya Cristina y Tatiana Miluska**, que me acompañaron y brindaron su apoyo moral durante mi formación profesional, y muy en especial a mi sobrino: **Alexis Fabián** que es mi alegría y fuerza para seguir adelante.

ADiana Carolina; madre de mi hijo y a quien amo y adoro mucho por ser una persona maravillosa que está conmigo apoyándome en todo momento brindándome su apoyo moral y material para la realización de mis metas trazadas.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Dr. **Oscar Wilfredo Mendieta Taboada**, por el asesoramiento brindado en la elaboración del presente trabajo de investigación.

Al Ing. **Richer Garay Montes** como co-asesor y al Ing. **Alex Enrique Mendoza Espinoza** por el apoyo incondicional y conocimientos brindados durante la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por brindarme las facilidades para la utilización de las instalaciones de dicha institución durante la realización del presente trabajo de investigación, así como también al Fondo para la Innovación Ciencia y Tecnología (FINC y T).

A mis amigos y compañeros **Jhonny Alegría, Leandro Paredes** y a todos aquellos que me alentaron de cerca, por el apoyo brindado durante la elaboración del presente trabajo.

A la señora **Dolly Flores** y al señor **Porfirio Guerrero** por el apoyo y las facilidades brindadas en los laboratorios y la biblioteca especializada respectivamente durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

Finalmente un agradecimiento especial a todas aquellas personas que me acompañaron a lo largo de esta hermosa vida universitaria, haciendo que el camino a seguir a pesar de todas sus dificultades, sea más fácil y llevadero, amigos míos, gracias por todo, ¡los llevaré presente siempre!

RESÚMEN

La extracción del aceite de piñón, conduce a la generación de una gran cantidad

De torta, esta torta tiene entre sus principales componentes fibra y proteínas. De la torta, se pueden hacer abonos orgánicos o alimentos para el ganado, previa eliminación de las toxinas y el aceite restante presente en ella. En la actualidad esta torta desengrasada es utilizada como un subproducto de bajo valor agregado, principalmente para la alimentación del ganado.

Con el objetivo de determinar el efecto de las variables relación torta/solución extractora (1/5, 1/10 y 1/15), pH (9, 10 y 11) y tiempo de proceso (30, 60 y 90 minutos) sobre el rendimiento de extracción de las proteínas presentes en la torta desengrasada de piñón blanco, se realizaron ensayos a nivel laboratorio empleando un diseño factorial completo, siendo los resultados analizados usando metodología de superficie de respuesta. La torta utilizada, desengrasada por el método Soxhlet, fue suspendida en solución de hidróxido de sodio con la finalidad de extraer las proteínas. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Biuret con lectura en espectrofotómetro a 545 nm. La proteína, precipitada con ácido clorhídrico fue lavada con agua destilada y finalmente secada. El secado del aislado proteico se llevó a cabo en estufa, a 80°C, durante 6 horas.

Los resultados indicaron que los parámetros: relación torta/solución extractora de 1/5, pH 10 y tiempo de 30 minutos, fueron los más adecuados para alcanzar un buen rendimiento. Los análisis realizados a los aislados proteicos obtenidos, arrojaron resultados similares a los reportados en otros estudios para diferentes materias primas vegetales.

Palabras clave: *Jatropha curcas* L., pH, rendimiento, aislado proteico, torta desengrasada.

SUMMARY

The pinion oil extraction, leads to the generation a great amount of cake, cake that has among its main components fiber and protein. Of cake, can be made organic fertilizers or food for cattle, prior elimination of toxins and there remaining oil present in it. Currently this cake defatted is used as a byproduct low value-added, primarily for livestock feed.

With the aim of determining the effect of the variables: relation cake/buffer solution (1/5, 1/10 and 1/15), pH (9, 10 and 11) and processing time (30, 60 and 90 minutes) on the efficiency of extraction of the proteins present in the defatted cake of physic nut, tests were conducted at laboratory using a full factorial design, the results were analyzed using response surface methodology. The cake used; defatted by the Soxhlet method was suspended in sodium hydroxide solution in order to extract the proteins. The protein concentration was determined by the Biuret method with spectrophotometer reading at 545 nm. The protein was precipitated with hydrochloric acid, washed with distilled water and dried. Drying of protein isolate was carried out in an oven at 80 ° C for 6 hours.

The results indicated that the parameters: the ratio cake/extracting solution of 1/5, pH 10 and time 30 minutes, were most suitable for achieving a good yield. Analyses of protein isolates obtained from these parameters, show similar results to those reported in other studies with different plant materials.

Keywords: *Jatropha curcas* L., pH, yield, protein isolate, defatted cake.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú el fruto de *Jatropha curcas* L. es comúnmente conocido como piñón blanco y existen variedades que no son tóxicas, cuyo empleo en la alimentación es prometedor; además, presentan un contenido de proteína entre 27-32%, el cual aumenta hasta un 90% al someterla a tratamientos de solubilización y precipitación, obteniendo concentrados proteínicos que al ser sometidos a hidrólisis enzimática generan hidrolizados, que contienen proteínas de bajo peso molecular, aminoácidos y péptidos

La Región San Martín es uno de los territorios que cuenta con mayor cantidad de áreas deforestadas por los cultivos tradicionales, además de la tala ilegal. Frente a este peligro, el cultivo de piñón, es una alternativa para el productor de la región. Se cuenta con un área instalada de cultivo de piñón de 580 has. en 9 provincias, con 268 beneficiarios, siendo la Empresa Verdal RSM Perú SAC la que cuenta con la mayor extensión del cultivo (157.4 has. instaladas) y la provincia de Picota es la que cuenta con la mayor extensión con 353.5 has .y en cosecha de 5230Kg de semillas (**Proyecto Piñón – DRASAM 2011**) además, la extracción del aceite da lugar a la generación de una gran cantidad de torta como sub producto.

El piñón blanco es un cultivo que no interfiere con la producción de alimentos, puede ser opción viable en proyectos de energías renovables porque ofrece ventajas adicionales sobre otros cultivos. La composición de los aminoácidos; el porcentaje de aminoácidos esenciales; y el contenido de minerales de la torta resultante de la extracción de aceite, pueden ser comparados con tortas similares utilizadas como forraje. Pero, debido a diversos principios tóxicos en el piñón blanco, incluyendo lectina (curcina); ésteres de forbol; saponinas; inhibidores de proteasas y fitatos; la semilla o la torta resultante de la extracción de aceite, puede ser utilizada en la alimentación animal o humana previo tratamiento.

De acuerdo a lo indicado, el presente trabajo de investigación plantea los siguientes objetivos:

1. Determinar los parámetros óptimos de extracción para obtener un aislado proteico a partir de la torta desengrasada de piñón blanco.
2. Determinar el contenido de proteínas presentes en el aislado proteico.
3. Efectuar la caracterización físico-química del aislado proteico obtenido.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origen y distribución del piñón blanco

Héller (1996), menciona que el piñón blanco está distribuido desde Sudamérica tropical hasta México, las Indias occidentales y regiones de la cuenca amazónica y habría llegado a África en las galeras portuguesas que traficaban con esclavos hacia Brasil. Su área de dispersión en Sudamérica abarca Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Galápagos, Paraguay, Perú y Venezuela, llegando a la Argentina, habiéndosela reconocido en las provincias de Misiones y Corrientes.

Henning (1996), menciona que en el Perú, está distribuido en los departamentos de Loreto (Yarina, río Napo; Momón, río Nanay; Pan guana 1º y 2º zona, río Amazonas; Ushpacaño y San José, río Itaya; Tamshiyacu y Tapiro, Fernando Lores; Indiana, Corazón de Jesús, Mazán; Carretera Iquitos-Nauta km 45); Ucayali, Piura (Huancabamba), Cajamarca; San Martín (Tarapoto); Lima y Cusco.

Héller (1996), comenta que en su lugar de origen las precipitaciones anuales bordean entre los 480 a 1000 mm y la temperatura media anual es superior a 18°C. Sólo las variedades Cabo Verde y Malí crecen con 250-300 mm de precipitación anual.

Las heladas de baja intensidad y duración corta son toleradas aunque pueden disminuir el rendimiento hasta un 25%.

Puede soportar largos períodos de sequía, desprendiéndose de sus hojas para reducir la evapotranspiración. El piñón blanco sobrevive y crece en las tierras marginales y erosionadas (**Jones y Miller, 1992**).

Por lo tanto posee un alto potencial para nuestro país, por que puede adaptarse a diferentes condiciones agroecológicas.

2.2. Características botánicas

2.2.1. Taxonomía

Mejía (2006), plantea la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Plantae
Subreino	:	Tracheobionta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	<i>Jatropha</i>

Especie : *curcas*

✓ **Nombre común en distintos países:** Coquito, Capate, Tempate, piñón blanco, Piñoncito, Piñol, piñón blanco Botija, Higos del duende, Barbasco, Piñones purgativos, Higo de infierno, Purga de fraile, Tuatua, nuez, pinhao manso, etc.

2.2.2. Descripción botánica

Mejía (2006), menciona que el piñón blanco es un arbusto o árbol pequeño de 2 a 6 m de altura con corteza blanco-grisácea, que exuda un látex translúcido. A continuación en la figura 1 se muestran algunas partes de la planta.

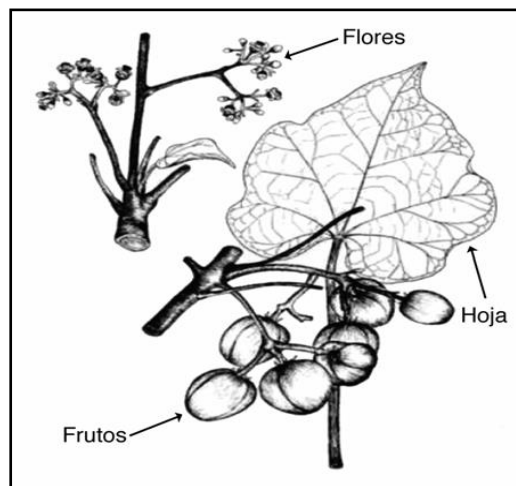


Figura 1: Hojas, flores y frutos de piñón blanco.

✓ **Detalle general**

A. Copa: ancha e irregular.

B. Tallo: Los tallos crecen con una discontinuidad morfológica en cada incremento, es un cilindro verde robusto que produce ramas con savia láctea o rojiza viscosa.

C. Raíz: Normalmente se forman 5 raíces de los arbolillos, 1 central y 4 periféricas, como se muestra en la figura 2.



Figura 2: Raíz de piñón blanco.

D. Hojas: Las hojas se forman normalmente con 5 a 7 lóbulos acuminados pocos profundos y grandes.

Tienen pecíolos largos con una longitud de 10 a 15 centímetros, de 9 a 15 centímetros de ancho, se colocan de forma alterna a subalterno opuestos con una fitotaxis espiral y se caen durante la época seca.

Son hojas anchamente ovadas, levemente lobadas, abiertamente cordadas en la base con 5 nervaduras y pubescentes en las nervaduras del envés, **Mejía (2006)**, tal como se muestra en la figura 3.



Figura 3: Hoja de piñón blanco.

E. Flores: Las flores no manifiestan diferencias estructurales, poseen cinco sépalos, cinco pétalos y cinco glándulas nectáreas. En las flores

unisexuales masculinas se presentan siempre los tejidos del androceo durante todo el desarrollo floral. Las flores femeninas presentan tres carpelos y dos estigmas. El raquis del piñón blanco, se desarrolla en varias ocasiones con inflorescencias femeninas, cuyas flores se encuentran entre dos ramas de su inflorescencia, mientras que las flores masculinas florecen en los extremos de las ramas de los racimos de las inflorescencias. La flor del piñón blanco se muestra en la figura 4.



Figura 4: Flor de piñón blanco.

F. Frutos: Son cápsulas drupáceas y ovoides, después de la polinización, se forma una fruta trilocular de forma elipsoidal.

Las frutas son cápsulas inicialmente verdes pero volviéndose a café oscuro o negro en el futuro.

Las cápsulas de los frutos son de 2,5 a 4 centímetros de largo por 2 centímetros de ancho, elipsoidales y lisas que cuando maduran van cambiando a amarillas. Al inicio son carnosas pero dehiscentes cuando son secas. Se producen los frutos en invierno cuando el arbusto pierde sus hojas, puede producir varias cosechas durante el año si la humedad de la tierra es buena y las temperaturas son suficientemente altas. Cada inflorescencia rinde un manojo de aproximadamente 10 frutos ovoides o más. El desarrollo del fruto necesita 90 días desde la floración hasta que madura la semilla, **Martínez (2006)**, mostrado en la figura 5.



Figura 5: Fruto de piñón blanco.

G. Semillas: La fruta produce tres almendras negras, cada una aproximadamente de 2 centímetros de largo y de 1 centímetro de diámetro. El peso de 1000 semillas es 500g promedio, contiene aproximadamente 50 - 60% de aceite, 30-32% de proteína y 60-66% de lípidos. La cáscara es aproximadamente 43% de la semilla y el grano 57%, del cual el 30% es grasa cruda. Su producción anual es de 5 Tn/ha promedio.

La semilla contiene minerales como fósforo, calcio, sodio, potasio y magnesio, **Mejía (2006)**.

La semilla es cosechada cuando la cápsula está madura, o cuando ésta cambia de color verde a amarillo, y esto ocurre a los 37 días de la fructificación.

Las semillas descascaradas, negruzcas, delgadas, se parecen a las semillas de la higuera pequeña. Son separadas del fruto manualmente. Las semillas de piñón blanco están disponibles durante la estación seca que facilita la colección y procesamiento. Los rangos de producción de semilla son de aproximadamente 0,4 toneladas por hectárea al primer año hasta los 3.3Tn/ha al cuarto año. El volumen de aceite es 35-40% en las semillas y 50-60% en la almendra.

El aceite contiene 21% de ácidos grasos saturados y 79% de ácidos insaturados.

Hay algunos elementos químicos en la semilla que son venenosos siendo no apropiado para el consumo humano ,**Mejía (2006)**; las semillas se muestran en la figura 6.



Figura 6: Semilla de piñón blanco.

2.2.2.1. Ciclo Vegetativo

Es una planta perenne, cuyo ciclo productivo se extiende de 45 a 50 años. Es de crecimiento rápido y con una altura normal de 2 a 3 m. En condiciones especiales llega hasta 5 m. El grosor del tronco es de 20 cm, con crecimiento desde la base en distintas ramas.

2.2.3. Sistemas de propagación del piñón blanco

Alfonso (2008), menciona que el piñón blanco se puede propagar sexualmente por semilla y asexualmente por partes vegetativas (esquejes), también se le puede propagar a través de injertos (experimentalmente). Los resultados a la fecha se inclinan más al uso de semilla, debido a que las plantas propagadas a partir de semilla muestran un desarrollo más rápido y un sistema radicular más fuerte. Las plantas propagadas vegetativamente son más precoces en producción pero su sistema radicular es muy débil por ausencia de la raíz principal, causando

desprendimiento de la planta por el peso de la misma y la pérdida de la cosecha a falta de un anclaje adecuado.

Es muy común la siembra vegetativa utilizada en cercas vivas y en el trazo de linderos, el alambre y la poda de la planta mantienen la misma en un tamaño manejable como poste de cerca pero con poca producción.

A. Propagación por semilla. Previo a la siembra hay que seleccionar la semilla que se va a utilizar. La selección debe ser por tamaño, prefiriendo las semillas más grandes (> 11 mm). Las semillas preferiblemente deben ser recientemente cosechadas o que hayan sido conservadas bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad como máximo 3 meses, libres de daños mecánicos, insectos, etc. La propagación utilizando semillas puede tener dos variantes dependiendo del porcentaje de germinación. Cuando contamos con semilla con menos del 80% de germinación lo más adecuado es utilizar germinadores para colocar en la bolsa solamente las plántulas germinadas. Cuando la semilla tiene más del 80% de germinación no es necesario utilizar el germinador y se procede a sembrar directamente en la bolsa o en el campo. En el caso de la semilla de piñón blanco destinada para la siembra se debe disminuir el tiempo de almacenaje después de haber sido cortada ya que es una semilla con alto contenido en aceite y pierde rápido su poder de germinación, **Alfonso (2008)**.

B. Propagación por estacas. Las primeras siembras fueron hechas con estacas, hay evidencias en cercas vivas establecidas en varios lugares de Honduras. El alambre de la cerca permite mantener vertical la planta ante la falta de un sistema radicular pivotante. Comercialmente no es adecuado plantar por estaca grandes áreas porque aunque el desarrollo preliminar y la producción de semillas sea mayor y más temprana, respectivamente, la sostenibilidad a largo plazo se ve amenazada por el volcamiento de las plantas por la falta de raíz principal y el peso de la cosecha.

Alfonso (2008), sin embargo dice que se puede aprovechar todos los linderos y cercas que hay en muchas fincas para una producción estacionaria durante la época lluviosa.

2.3. Localización y producción

2.3.1. Áreas potenciales para el cultivo de piñón blanco

IIAP (2008), reporta las áreas potenciales para el cultivo de piñón blanco en el Perú mostrada en la figura 7, estas áreas mayormente se encuentran en la selva alta, donde los suelos han sufrido proceso de degradación e igualmente en la costa, en zonas de transición hacia la cordillera occidental.



Figura 7: Áreas potenciales para el cultivo de *Jatropha curcas* L. en el Perú. Fuente: IIAP (2008)

2.3.2. El cultivo del piñón en la Amazonía peruana

IIAP (2008), reportó que el cultivo a escala comercial de piñón blanco para biocombustible en la Amazonía peruana es incipiente.

Según el estudio realizado por IIAP/SNV (2007), indica que en los departamentos de Loreto, San Martín y Ucayali existen 746,653 has. con potencial para el cultivo de piñón blanco, con una participación homogénea en el rango de 30 a 36%, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1: Áreas con potencial para el cultivo de piñón blanco en la Amazonía peruana.

Departamento	Área	(%)
Loreto	255049	34
San Martín	223650	30
Ucayali	267954	36
Total	746653	100

Fuente: IIAP/SNV (2007).

2.4. Variedades

Kiefer (1986), comenta que la variedad más conocida es la denominada “Cabo Verde” desarrollada en el occidente del continente africano en la isla de Cabo Verde. Entre las características de esta variedad están, planta de porte medio a bajo, que produce muchos tallos y tiene cosecha desde el primer año, resistente a condiciones adversas de clima y suelo. Existen otras variedades desarrolladas localmente en la India, Brasil, etc., pero es necesario evaluarlas comercialmente para tener mejores argumentos para su distribución en otras zonas.

2.5. Usos y composición química del piñón blanco

2.5.1. Usos

Schmook y Sánchez (2005), mencionan los siguientes usos para el piñón blanco.

➤ **Reforestación agrícola.** El piñón blanco es una especie de uso potencial en áreas deforestadas, constituyendo una excelente alternativa en suelos marginales, ociosos y agotados, con una vida útil de 30 a 50 años.

En los trópicos se cultiva ampliamente como cercas vivas, puesto que las hojas, ni los tallos, ni los frutos son consumidos por el ganado.

Crece sin necesidad de protección y puede usarse como cerco para proteger los cultivos. Ampliamente usada como sombra y ornato en parques y jardines.

En México y Guatemala se ha usado durante largo tiempo como planta hospedera de un insecto que produce una laca muy apreciada, que se utiliza como barniz para pulir guitarras y otros artículos de madera. En Madagascar la planta se usa como tutor para soporte de vainilla. En la isla de Cabo Verde y Bolivia se ha plantado en zonas áridas en altas densidades para controlar la erosión del suelo.

➤ **Comestible.** Las semillas son purgantes, pero tostadas pierden parcialmente esa propiedad y suelen consumirla en algunas regiones de México. Esta planta ha sido considerada tóxica pues se ha encontrado en la semilla la presencia de alcaloides conocidos como ésteres de forbol, que provocan el efecto purgante y algunos otros síntomas. Solamente en México, se han encontrado variedades con muy bajo contenido de toxinas, las cuales son consumidas después de tostar y en la preparación de platillos tradicionales por los pobladores de la región de Papantla en Veracruz, Blanco en Querétaro, Pueblillo en Veracruz y Huitzilán en Puebla(**Makkaret. al.(1998)**).

La torta que resulta de la extracción de aceite, si proviene de variedades tóxicas solamente se puede usar para fabricar abonos, extraído los alcaloides o si la torta procede de semillas comestibles, la torta puede ser utilizada en alimentación animal.

➤ **Medicinal.** Se aplica localmente para tratamiento de algodoncillo, fuego labial y mal de boca, se le atribuyen propiedades abortivas. Las hojas maceradas en aceite de ricino se utilizan en medicina casera para apresurar la supuración de los granos infectados.

El jugo que mana del tronco (la savia) se emplea como hemostático y para contener hemorragias en heridas no graves, por su propiedad de coagular la sangre de inmediato.

El látex tiene propiedades antibióticas contra algunas bacterias, además de efectos coagulantes y se aplica directamente en heridas y cortes como antiséptico, y para sarpullidos, quemaduras e infecciones de la piel.

➤ **Industrial.** También se usa para preparar barnices después de ser quemado con óxidos de hierro, o como un excelente sustituto para aceites industriales. En Europa se usa en el hilado de lana y manufacturas textiles.

Se usa junto con cenizas de quemar plátano para hacer un duro jabón casero. El jugo de la hoja tiñe las telas de un color negro indeleble.

La corteza tiene un 37% de taninos que dan un colorante azul oscuro. El látex también tiene un 10% de tanino y se puede usar como tintes para telas.

➤ **Combustible** .El aceite de la semilla es una fuente de energía renovable no convencional, de bajo costo y amigable con el ambiente, además de ser un sustituto para diesel, keroseno y otros combustibles.

El aceite se usó en motores en África durante la segunda guerra mundial. Quema sin producir humo y ha sido empleado para la iluminación de algunas calles cerca de Río de Janeiro. La cáscara del fruto y las semillas puede usarse como combustible.

Las semillas secas, cubiertas de aceite de palma se usan como antorchas, que se mantienen encendidas incluso con fuerte viento.

- **Doméstico.** El aceite de las semillas se utiliza para iluminación y como lubricante y para hacer jabones, pinturas y biodiesel.
- **Captura de carbono.** La captura de carbono en plantaciones de piñón blanco, así como en otros tipos de plantaciones, ocurre únicamente durante el desarrollo de las plantas hasta llegar su estado de madurez.

Es en troncos y ramas donde el carbono queda almacenado. La cantidad de carbono (C) que el árbol captura, consiste sólo en el pequeño incremento anual que se presenta en la madera del árbol multiplicado por la biomasa del árbol que contiene carbono. Entre 40% y 50% de la biomasa de un árbol (madera: materia seca) es carbono. Es necesario conservar los árboles para evitar que el carbono (C) contenido en ellos se emita a la atmósfera.

2.5.2. Composición química

Según el **IIAP (2008)**, el análisis fisicoquímico de la fruta que se presenta en el cuadro 2, indica que el porcentaje de aceite en almendra húmeda es el 49.47% y de 1000 g de fruta fresca es el 20.17%.

Cuadro 2: Análisis fisicoquímicos de frutos de piñón blanco

DESCRIPCION	(g)	%
Peso de la fruta		1000,00
Peso de la concha húmeda	325,00	32,50
Peso de la concha seca (g)	261,43	
Humedad de la concha	63,57	19,56
Peso de la nuez húmeda (g)	675,00	67,50
Peso de la almendra	407,7	60,4
Peso de la cáscara	267,3	39,6
Humedad de la almendra	31,52	7,73
Humedad de la cáscara	38,52	14,41
Peso de la nuez seca (g)	604,97	
Peso de almendra en nuez seca.	376,18	
Peso de cáscara en nuez seca.	228,78	
Humedad de la nuez	70,03	10,38
Humedad de la fruta.	133,60	13,36
Aceite extraído de nuez húmeda.	79,98	11,85
Aceite extraído de almendra húmeda.	79,98	19,62
Harina obtenida de almendra	327,71	
Aceite en harina de almendra	121,71	37,14
Total aceite en almendra húmeda	201,69	49,47
Sólidos y humedad en harina de almendra.	206,00	50,53
Total aceite en nuez húmeda	201,69	29,88
Sólidos y humedad en harina de nuez.		
Aceite total en fruta	201,69	20,17

Fuente: Corporación Dinant, 2007.

2.5.2.1 Componentes químicos de las semillas y aceite de piñón blanco.

Según **Makkar et. al.(1998)**, reportaron que el análisis químico de la semilla de piñón blanco presenta los siguientes componentes, que se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3: Análisis químico de la semilla de piñón blanco

Componente	Contenido
Humedad	5.8
Proteína bruta	27.2
Materia grasa	58.5
Fibra	3.8
Cenizas	4.3
Carbohidratos	0.4

Fuente: Makkaret. al.(1998)

2.6. Proteína

Kerstetter(2005), asegura que la palabra proteína proviene de una palabra griega que significa "el primero", "de primera importancia". Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo (-COOH) y el grupo amino (-NH₂) de residuos de aminoácido adyacentes.

Así mismo **Alberts (2004)**, reportó que la secuencia de aminoácidos en una proteína está codificada en su gen (una porción de ADN) mediante el código genético. Los aminoácidos son fundamentales para el buen funcionamiento del organismo. Para una persona adulta son ocho los aminoácidos esenciales, mientras que durante el crecimiento se precisan dos más.

- **Aminoácidos esenciales:** fenilalanina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Durante la infancia y adolescencia: arginina e histidina.
- **Aminoácidos no esenciales:** alanina, cisteína, cistina, glicina, hidroxiprolina, prolina, serina, tirosina, ácido aspártico, y glutámico.

2.6.1. Fuentes de proteínas

Según **Berg (2008)**, las fuentes dietéticas de proteínas incluyen carne, huevos, soya, granos, leguminosas y productos lácteos tales como queso o yogurt. Las fuentes animales de proteínas poseen los 20 aminoácidos. Las fuentes vegetales son deficientes en aminoácidos y se dice que sus

proteínas son incompletas. Por ejemplo, la mayoría de las leguminosas típicamente carecen de cuatro aminoácidos incluyendo el aminoácido esencial metionina, mientras los granos carecen de dos, tres o cuatro aminoácidos incluyendo el aminoácido esencial lisina.

2.6.2. **Análisis de proteínas en alimentos**

Alberts (2004), comenta que el clásico ensayo para medir concentración de proteínas en alimentos es el método de Kjeldahl. Este ensayo determina el nitrógeno total en una muestra.

El único componente de la mayoría de los alimentos que contiene nitrógeno son las proteínas (las grasas, los carbohidratos y la fibra dietética no contienen nitrógeno). Si la cantidad de nitrógeno es multiplicada por un factor dependiente del tipo de proteína esperada en el alimento, la cantidad total de proteínas puede ser determinada. En las etiquetas de los alimentos, la proteína es expresada como el nitrógeno multiplicado por 6,25; porque el contenido de nitrógeno promedio de las proteínas es de aproximadamente 16%. El método de Kjeldahl es usado porque es el método que la **Association of Official Analytical Chemists 1995** ha adoptado y por lo tanto es usado por varias agencias alimentarias alrededor del mundo.

2.6.3. **Características de las proteínas**

Lodish et al. (2005), reportaron que los prótidos o proteínas son biopolímeros, es decir, están formadas por gran número de unidades estructurales simples repetitivas (monómeros). Debido a su gran tamaño, cuando estas moléculas se dispersan en un disolvente adecuado, forman siempre dispersiones coloidales, con características que las diferencian de las disoluciones de moléculas más pequeñas.

Por hidrólisis, las moléculas de proteína se dividen en numerosos compuestos relativamente simples, de masa molecular pequeña, que son las unidades fundamentales constituyentes de la macromolécula. Estas unidades son los aminoácidos, de los cuales existen veinte especies

diferentes y que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. Cientos y miles de estos aminoácidos pueden participar en la formación de la gran molécula polimérica de una proteína.

Todas las proteínas tienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y casi todas poseen también azufre.

La síntesis proteica es un proceso complejo cumplido por las células según las directrices de la información suministrada por los genes.

2.6.4. Funciones de las proteínas

Berg (2008), asegura que las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan:

- Estructural. Ésta es la función más importante de una proteína
- Inmunológica (anticuerpos),
- Enzimática (sacarasa y peptidasa),
- Contráctil (actina y miosina).
- Homeostática: colaboran en el mantenimiento del pH,
- Transducción de señales (rodopsina)
- Protectora o defensiva (trombina y fibrinógeno).

2.6.5. Propiedades de las proteínas

Gutiérrez (2000), menciona como propiedades de las proteínas a:

- Solubilidad: Se mantiene siempre y cuando los enlaces fuertes y débiles estén presentes. Si se aumenta la temperatura y el pH, se pierde la solubilidad.
- Capacidad electrolítica: Se determina a través de la electroforesis, técnica analítica en la cual si las proteínas se trasladan al polo positivo es porque su molécula tiene carga negativa y viceversa.

- **Especificidad:** Cada proteína tiene una función específica que está determinada por su estructura primaria.
- **Amortiguador de pH (conocido como efecto tampón):** Actúan como amortiguadores de pH debido a su carácter anfótero, es decir, pueden comportarse como ácidos (donando electrones) o como bases (aceptando electrones).

2.6.6. Clasificación de las proteínas

2.6.6.1. Según su forma: Gutiérrez (2000) indica:

- A. Fibrosas:** presentan cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria atípica. Son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Algunos ejemplos de éstas son queratina, colágeno y fibrina.
- B. Globulares:** se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua. La mayoría de las enzimas, anticuerpos, algunas hormonas y proteínas de transporte, son ejemplos de proteínas globulares.
- C. Mixtas:** posee una parte fibrilar (comúnmente en el centro de la proteína) y otra parte globular (en los extremos).

2.6.6.2. Según su composición química: Gutiérrez (2000) reporta,

- A. Simples:** su hidrólisis sólo produce aminoácidos. Ejemplos de estas son la insulina y el colágeno (globulares y fibrosas).
- B. Conjugadas o heteroproteínas:** su hidrólisis produce aminoácidos y otras sustancias no proteicas con un grupo prostético.

2.6.7. Estructura de las proteínas

Cheftel (1999), asegura que es la manera como se organiza una proteína para adquirir cierta forma. Presentan una disposición característica en condiciones fisiológicas, pero si se cambian estas condiciones como temperatura, pH, etc. pierde la conformación y su función, proceso

denominado desnaturalización. La función depende de la conformación y ésta viene determinada por la secuencia de aminoácidos.

Para el estudio de la estructura es frecuente considerar una división en cuatro niveles de organización, aunque el cuarto no siempre está presente.

A. Conformaciones o niveles estructurales de la disposición tridimensional:

- Estructura primaria.
 - Estructura secundaria.
 - Nivel de dominio.
 - Estructura terciaria.
 - Estructura cuaternaria.
- ✓ A partir del nivel de dominio sólo las hay globulares

2.6.7.1. Niveles de estructuración

2.6.7.1.1. Estructura primaria

Yúfera (1997), afirma que la estructura primaria de las proteínas se refiere a la secuencia de aminoácidos, es decir, la combinación lineal de los aminoácidos mediante un tipo de enlace covalente, el enlace peptídico. Los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos siendo una de sus características más importante la coplanaridad de los radicales constituyentes del enlace.

La estructura lineal del péptido definirá en gran medida las propiedades de niveles de organización superiores de la proteína. Este orden es consecuencia de la información del material genético: Cuando se produce la traducción del ARN se obtiene el orden de aminoácidos que van a dar lugar a la proteína. Se puede decir, por tanto, que la estructura primaria de las proteínas no es más que el orden de aminoácidos que la conforman.

2.6.7.1.2. Estructura secundaria

Yúfera (1997), comenta también que la estructura secundaria de las proteínas es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico, es decir, un tipo de enlace no covalente.

Las formas más comunes son la hélice alfa y la lámina beta.

A. Hélice alfa

Los aminoácidos en una hélice α están dispuestos en una estructura helicoidal dextrógira, con unos 3.6 aminoácidos por vuelta. Cada aminoácido supone un giro de unos 100° en la hélice, y los carbonos α de dos aminoácidos contiguos están separados por 1.5\AA . La hélice está estrechamente empaquetada, de forma que no hay casi espacio libre dentro de la hélice. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior de la hélice.

El grupo amino del aminoácido (n) puede establecer un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del aminoácido (n+4). De esta forma, cada aminoácido (n) de la hélice forma dos puentes de hidrógeno con su enlace peptídico y el enlace peptídico del aminoácido en (n+4) y en (n-4). En total son 7 enlaces de hidrógeno por vuelta. Esto estabiliza enormemente la hélice. Está dentro de los niveles de organización de la proteína.

B. Lámina beta

La lámina beta se forma por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos amino de una de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilo de la opuesta. Es una estructura muy estable que puede llegar a resultar de una ruptura de los enlaces de hidrógeno durante la formación de la hélice alfa.

Las cadenas laterales de esta estructura están posicionadas sobre y bajo el plano de las láminas, **Yúfera (1997)**.

Dichos sustituyentes no deben ser muy grandes, ni crear un impedimento estérico, ya que se vería afectada la estructura de la lámina.

2.6.7.1.3. Estructura terciaria

Yúfera (1997) asevera también que, es el modo en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio, es decir, cómo se enrolla una determinada proteína, ya sea globular o fibrosa. Es la disposición de los dominios en el espacio.

La estructura terciaria se realiza de manera que los aminoácidos apolares se sitúan hacia el interior y los polares hacia el exterior en medios acuosos. Esto provoca una estabilización por interacciones hidrofóbicas, de fuerzas de Van der Waals y de puentes disulfuro (covalentes, entre aminoácidos de cisteína convenientemente orientados) y mediante enlaces iónicos.

2.6.7.1.4. Estructura cuaternaria

Yúfera (1997), también reportó que la estructura cuaternaria deriva de la conjunción de varias cadenas peptídicas que, asociadas, conforman un ente, un multímero, que posee propiedades distintas a la de sus monómeros componentes. Dichas subunidades se asocian entre sí mediante interacciones no covalentes, como pueden ser puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o puentes salinos. Para el caso de una proteína constituida por dos monómeros, un dímero, éste puede ser un homodímero, si los monómeros constituyentes son iguales, o un heterodímero, si no lo son

En la figura 8 a continuación se muestra la estructura de las proteínas.

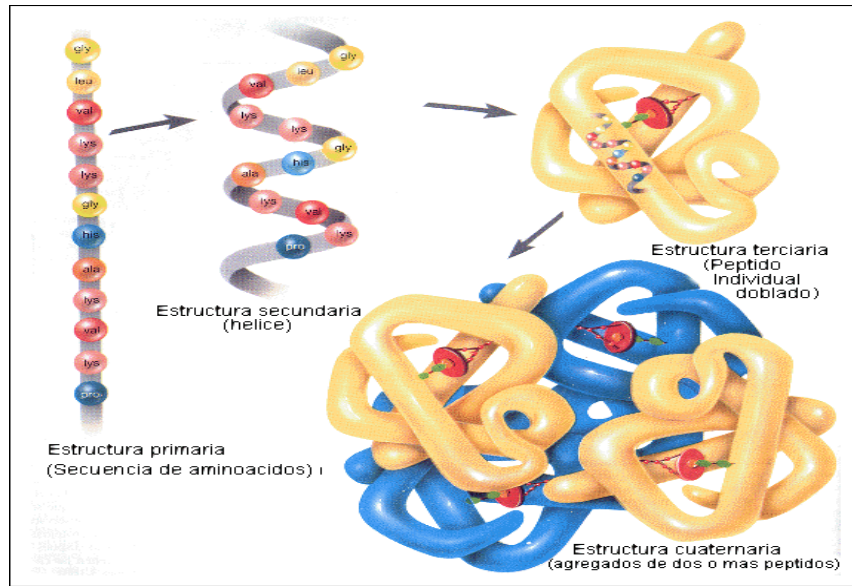


Figura 8: Estructura de las proteínas.
Fuente: Yúfera (1997).

2.7. Desnaturalización de las proteínas

Así mismo **Potter (1997)**, confirma que es la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico sin ninguna estructura tridimensional fija, tal y como se muestra en la figura 9.

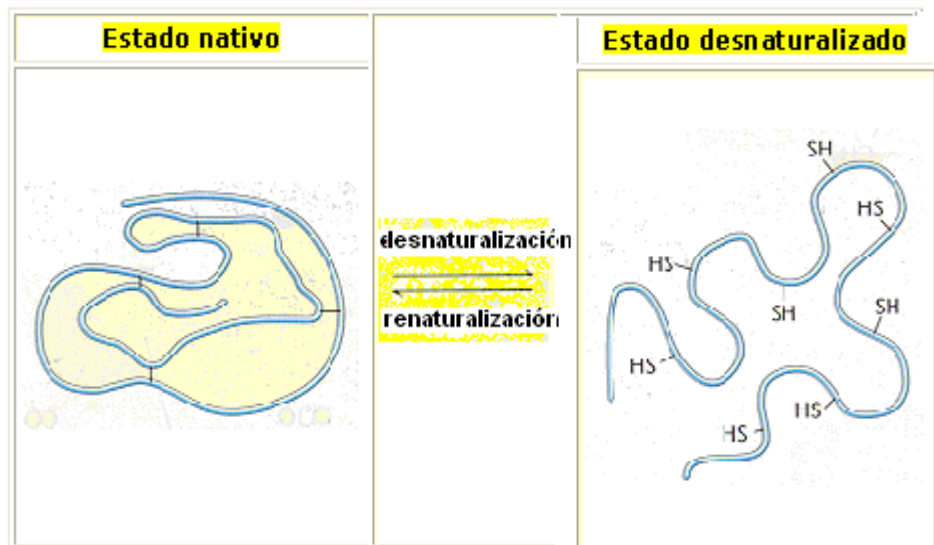


Figura 9: Desnaturalización de la proteína.
Fuente: Potter(1997).

Por otro lado **Fennema (2000)**, reporta que cuando la proteína no ha sufrido ningún cambio en su interacción con el disolvente, se dice que presenta una estructura nativa. Cualquier alteración de la estructura nativa que modifique su interacción con el disolvente y que provoque su precipitación dará lugar a una estructura desnaturalizada. En una proteína cualquiera, la estructura nativa y la desnaturalizada tan sólo tienen en común la estructura primaria, es decir, la secuencia de AA que la componen. Los demás niveles de organización estructural desaparecen en la estructura desnaturalizada.

Una proteína desnaturalizada cuenta únicamente con su estructura primaria. Por este motivo, en muchos casos, la desnaturalización es no reversible. El proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización. Estructura primaria la que contiene la información necesaria y suficiente para adoptar niveles superiores de estructuración. Esta propiedad es de gran utilidad durante los procesos de aislamiento y purificación de proteínas, ya que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentra disuelta.

En algunos casos, la desnaturalización conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína precipita.

La formación de agregados fuertemente hidrofóbicos impide su renaturalización, y hacen que el proceso sea irreversible.

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica).

2.7.1. Pérdida de función

Fennema (2000), también afirma que la mayoría de las proteínas pierden su función biológica cuando están desnaturalizadas, por ejemplo, las enzimas pierden su actividad catalítica, porque los sustratos no pueden unirse más al centro activo, y porque los residuos del aminoácido

implicados en la estabilización de los sustratos no están posicionados para hacerlo.

2.7.2. Factores desnaturalizantes

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica).

Como en algunos casos el fenómeno de la desnaturalización es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva mediante cambios en:

1. La polaridad del disolvente.
2. La fuerza iónica.
3. El pH.
4. La temperatura

2.7.2.1. Efecto de la polaridad del disolvente sobre la estructura de las proteínas

Fennema (2000), asevera también que la polaridad 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 hidrófobo 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.

2.7.2.2. Efecto del pH sobre la estructura de las proteínas

Ahern (2003), indica que los iones H^+ y OH^- 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

cadena lateral de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo 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.

2.7.2.3. Efecto de la temperatura sobre la estructura de las proteínas

Así mismo **Ahern (2003)**, asegura que 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 hidrófobo interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada.

2.7.2.4. Determinación de la estabilidad proteica

Ahern (2003), también indica que la estabilidad de una proteína es una medida de la energía que diferencia al estado nativo de otros estados "no nativos" o desnaturalizados. Hablaremos de estabilidad termodinámica cuando podamos hacer la diferencia de energía entre el estado nativo y el desnaturalizado, para lo cual se requiere reversibilidad en el proceso de desnaturalización. Y hablaremos de estabilidad cinética cuando, dado que la proteína desnaturaliza irreversiblemente, sólo podemos diferenciar energéticamente la proteína nativa del estado de transición (el estado limitante en el proceso de desnaturalización) que da lugar al estado final.

En el caso de las proteínas reversibles, también se puede hablar de estabilidad cinética, puesto que el proceso de desnaturalización también presenta un estado limitante. Actualmente se ha demostrado que algunas proteínas reversibles pueden carecer de dicho estado limitante, si bien es

un tema aún controvertido en la bibliografía científica .La determinación de la estabilidad proteica puede realizarse con diversas técnicas.

La única de ellas que mide directamente los parámetros energéticos es la calorimetría (normalmente en la modalidad de calorimetría diferencial de barrido).

En esta se mide la cantidad de calor que absorbe una disolución de proteína cuando es calentada, de modo que al aumentar la temperatura se produce una transición entre el estado nativo y el estado desnaturalizado que lleva asociada la absorción de una gran cantidad de calor.

El resto de técnicas miden propiedades de las proteínas que son distintas en el estado nativo y en el estado desplegado. Entre ellas se podrían citar la fluorescencia de triptófanos y tirosinas, el dicroísmo circular, radio hidrodinámico, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, etc.

Ahern (2003), también comenta que una vez hayamos elegido la propiedad que vamos a medir para seguir la desnaturalización de la proteína, podemos distinguir dos modalidades: Aquellas que usan como agente desnaturalizante el incremento de temperatura y aquellas que hacen uso de agentes químicos (como urea, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, alcoholes, etc.). Estas últimas relacionan la concentración del agente utilizado con la energía necesaria para la desnaturalización. Una de las últimas técnicas que han emergido en el estudio de las proteínas es la microscopía de fuerza atómica. Esta técnica es cualitativamente distinta de la demás, puesto que no trabaja con sistemas macroscópicos sino con moléculas individuales.

Mide la estabilidad de la proteína a través del trabajo necesario para desnaturalizarla cuando se aplica una fuerza por un extremo mientras se mantiene el otro extremo fijo a una superficie.

Ahern (2003), asevera que en cuanto a la importancia en las aplicaciones biotecnológicas radica en que pese a su extrema eficacia catalítica su baja estabilidad dificulta su uso (muchas proteínas de potencial interés apenas mantienen su configuración nativa y funcional por unas horas).

2.8. Aislados proteicos

Un aislado proteico es aquel producto que es una forma altamente refinada de proteína, con un contenido proteico mínimo del 70% sobre una base libre de humedad. Se elabora a partir de harina desengrasada, a la que se elimina la mayor parte de sus componentes no – proteicos, grasas y carbohidratos, se usan principalmente para mejorar la textura de los productos cárnicos, pero también para incrementar el contenido proteico y mejorar el sabor.

Aremuet. al., en el año 2007 investigaron la composición proximal de ácidos grasos y de aminoácidos de un concentrado proteico de marañón (*Anacardium occidentale*). Los tres ácidos grasos más abundantes fueron C18: 1 * 9 > C16: 0 > C18: 3 * 3. Los ácidos grasos insaturados predominaron en la muestra con adecuadas cantidades de ácidos grasos esenciales. El análisis proximal del concentrado proteico presentó un elevado porcentaje de proteína cruda de 69.6/100g de proteína. Las cenizas y la fibra cruda fueron bajas. El concentrado proteico tuvo un balanceado contenido de alguno de los aminoácidos esenciales, con respecto al patrón provisional de la FAO/WHO sin embargo consideran que debe requerir suplemento de Valina y Treonina. El punto isoeléctrico que calcularon fue 4.2, mientras que el aminoácido límite fue Valina.

Por otro lado en México, **Makkaret. al.**, en el 2007 obtuvieron un concentrado proteico altamente enriquecido que fue preparado sólo de la torta desengrasada del piñón por extracción alcalina, precipitación isoeléctrica, y diálisis. El contenido verdadero de proteínas fue determinado por el método dot-blot (**Hoffmannet. al.(2002)**). Los aminoácidos fueron determinados de acuerdo a la directiva de EC

98/64/EC. La recuperación de proteína después de la extracción secuencial, la diálisis y la liofilización fue de 89.3%.

El rendimiento para el concentrado proteico de la variedad tóxica mexicana fue de 26.5% del peso inicial de torta desengrasada. La digestibilidad de la proteína del concentrado proteico fue de 90%.

En otro estudio **Makkaret. al.**, en el 2008 dieron a conocer que la recuperación del concentrado proteico fue muy alta cuando las proteínas de la torta de piñón fueron solubilizadas a pH 11 por 1h a 60°C y la precipitación de estas proteínas fue realizada disminuyendo el pH a 4. Bajo estas condiciones, se logró recuperar más del 53% del total de proteínas de la torta en el concentrado proteico. El contenido de proteínas en el concentrado proteico obtenido de la torta y en la torta desengrasada fue 760 y 820g/Kg respectivamente. Las cantidades de ésteres de forbol presentadas en los concentrados proteicos fueron 0.86 y 1.48mg/g. Los contenidos de aminoácidos se presentan en el cuadro 4.

El cuadro 4 muestra los niveles de aminoácidos esenciales (excepto la Lisina) en el concentrado proteico que fue más alto que los de la proteína de referencia de la FAO/WHO.

Cuadro 4: Composición de aminoácidos del concentrado proteico obtenido de la torta de piñón.

Aminoácido	Cantidad (g/16 g N)
Aminoácidos esenciales	
Cistina	1.34
Metionina	1.66
Valina	5.18
Isoleucina	4.47
Leucina	7.08
Tirosina	3.2
Fenilalanina	5.42
Histidina	3.51
Lisina	3
Treonina	3.56
Triptófano	1.23
Aminoácidos no esenciales	
Acido aspártico	12.5
Prolina	5.45
Serina	5.23
Glicina	5.1
Alanina	5.47
Arginina	14.16

Fuente: Makkaret. al.(2008).

Mientras que el cuadro 5 muestra algunos componentes químicos de la torta de piñón.

Cuadro 5: Composición química de la torta de piñón (g/Kg de materia seca)

Componente	Torta (g/Kg)	Torta desengrasada (g/Kg)
Proteína cruda (N x 6.25)	244	259
Aceite	60	ND
Cenizas	167	178

Fuente: Makkaret. al.(2008).

De otro modo **Rustomet. al.**, en 1991 optimizaron la extracción de proteínas de maní con agua, maximizándola extracción de proteína, y la concentración de la proteína en el extracto .Usaron un diseño compuesto central implicando relación agua – sólidos (X_1), pH (X_2), temperatura (X_3) y tiempo (X_4), fueron empleados modelos de segundo orden en Y_1 y Y_2 para generar superficies de respuesta. Las condiciones óptimas para la obtención de $Y_1 \geq 85\%$ y $Y_2 \geq 2.5\%$ fueron $X_1 = 1:8$; $X_2 = 8.0$; $X_3 = 50^\circ\text{C}$; $X_4 = 30$ min. Las estimaciones de Y_1 y Y_2 fueron 85.29% y 2.7% , respectivamente. La verificación experimental dio valores de $Y_1 = 84.39\%$ (\pm) 0.78 y $Y_2 = 2.8\%$ (\pm) 0.02 .

En la figura 10 se observa que la región sombreada es donde se obtiene mayor extracción de proteína, esta región comprende desde una relación de extracción de proteínas de 1:8 a 1:10 y de 42.5 a 50°C .

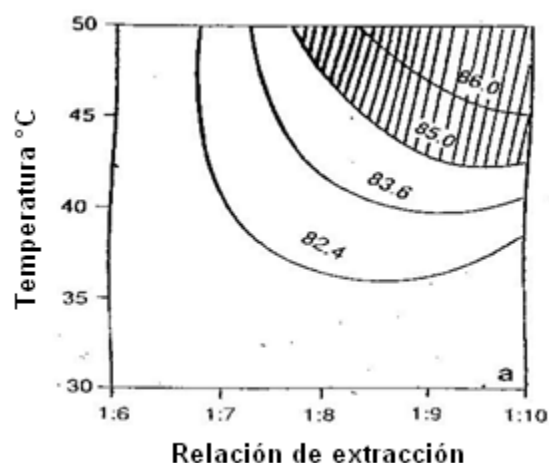
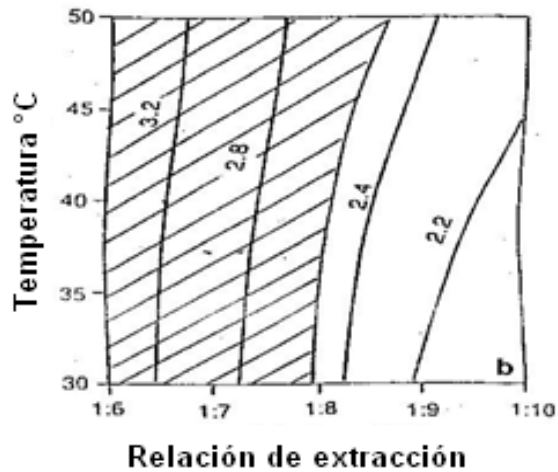


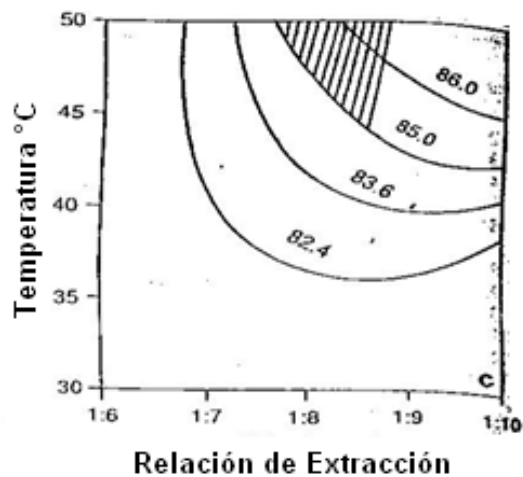
Figura 10: Delineación de la superficie de respuesta del porcentaje de proteína extraída Y_1 .
Fuente: Rustomet. al.(1991).

De igual modo en la figura 11 se observa que la mayor concentración de proteína extraída en el maní se obtiene desde una relación de extracción de proteína de 1:6 a 1:8 y de 30 a 50°C .



**Figura 11: Delineación de la superficie de respuesta de la concentración de proteína extraída en el maní Y₂.
Fuente: Rustomet. al.(1991).**

En la figura 12, obtenida superponiendo las figuras 10 y 11, se puede determinar con mayor exactitud las condiciones para una mayor extracción y concentración de proteínas, esta región está dada por los valores de relación de extracción de proteínas de 1:8 y 50°C de temperatura.



**Figura 12: Área superpuesta de las delineaciones de Y₂ sobre Y₁.
Fuente: Rustomet. al.(1991).**

Finalmente **Saetaet. al.**, en el 2010 obtuvieron exitosamente un aislado proteico de torta del piñón criollo (*Jatropha curcas* L.), por extracción alcalina y seguida por precipitación isoeléctrica.

El aislado proteico tuvo pequeñas cantidades de ésteres de forbol, ácido fítico y saponinas, sin lectinas.

La solubilidad mínima y máxima del aislado estuvo entre pH 4 y 12 respectivamente. Su capacidad de ligar agua y aceite fue de 3.22g de agua/g de proteína y 1.86ml de aceite/g de proteína respectivamente. La capacidad espumante y la actividad de emulsión mostraron valores elevados en un rango de pH básicos. Los valores de estabilidad de espuma y de emulsión disminuyeron al aumentar el tiempo y mostró niveles altos sobre condiciones básicas del pH. El aislado del piñón obtenido presentó adecuadas propiedades funcionales en capacidad de ligar agua, actividad emulsificante y estabilidad de emulsión, mostrando que puede tener un papel importante en los sistemas alimenticios.

En la figura 13, se observa como el rendimiento de extracción de proteínas se ve afectado por el pH, el aumento de éste último hace que el rendimiento de extracción de proteínas se incremente pudiendo trabajarse de esta manera con elevados valores de pH.

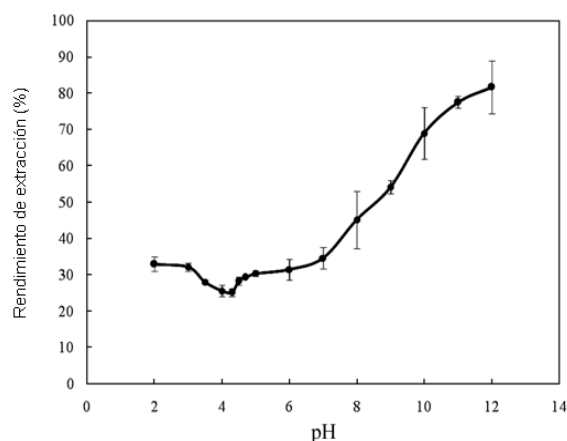


Figura 13. Efecto del pH en la extracción de la proteína de la torta de piñón.

Fuente: Saetaet. al. (2010).

Así mismo, en la figura 14 se observa que el rendimiento de extracción de proteínas no se ve afectado por la temperatura, pues a temperaturas de entre 30 y 80°C el rendimiento no varía en más de 5%.

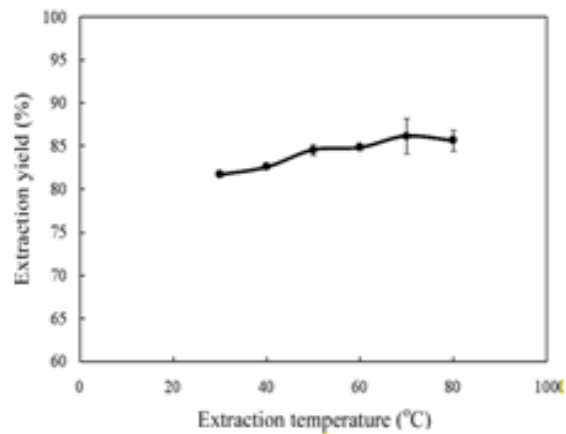


Figura 14. Efecto de la temperatura en la extracción de la proteína en la torta de piñón.

Fuente: Saetaet. al. (2010).

En el cuadro 6 observamos que el nivel de aminoácidos esenciales de la torta es mucho menor que los valores considerados por la FAO/WHO, excepto en la concentración de metionina y cistina.

Cuadro 6: Aminoácidos en la torta de piñón.

Aminoácido	Torta de piñón (g de aminoácido/ 100 g de torta)	Aislado proteico de piñón (g de aminoácido/ 100 de aislado proteico)	Valor referencial ¹⁾ FAO/WHO (g/100 g)
Esenciales			
Metionina	2.37 ²⁾	5.16	2.5 ³⁾
Cistina	1.1	2.16	
Tirosina	0.31	1.59	6.3 ⁴⁾
Fenilalanina	0.77	2.93	
Isoleucina	0.73	2.64	2.8
Leucina	1.3	4.68	6.6
Valina	0.9	3.27	3.5
Histidina	0.45	1.62	1.9
Treonina	0.73	2.57	3.4
Lisina	0.86	2.63	5.8
Total de aminoácidos esenciales	9.52	29.25	32.8
No esenciales			
Acido aspártico	1.82	6.83	
Serina	0.93	3.24	
Acido glutámico	3.2	11.39	
Glicina	0.83	2.86	
Argenina	2.31	9.12	
Alanina	6.25	10.99	
Prolina	2.69	4.19	

Fuente: Saetaet. al.(2010).

En cuadro 7 se observa que la torta tuvo valor elevado de lípidos (14.8%) y contenido de proteína (23.5%).El contenido de proteína en el aislado proteico del piñón fue mucho más alto que en la torta.

Cuadro 7: Composición química de la torta de piñón y su aislado proteico (base seca).

Composición (% w/w)	Torta de piñón	Aislado proteico de piñón
Grasa bruta	14.8 ± 0.5	8.6 ± 0.2
Fibra bruta	11.0 ± 1.7	0.27 ± 0.06
Ceniza bruta	7.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1
Proteína bruta	23.5 ± 1.5	90.1 ± 0.8

Media ± SD de determinaciones triplicadas

Fuente: Saetaet. al.(2010).

2.9. Usos y aplicaciones de los aislados proteicos.

Chau (1997), comenta que actualmente los aislados proteicos más extendidos son los de soja, ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor (**Wagner et. al.(1990)**, **Nagano et. al.(1996)**, **Hennet. al.(1998)**).

Hoy día existen una gran variedad de aislados de soja disponibles comercialmente, diseñados específicamente para proporcionar las características deseadas según el alimento de que se trate. La mayoría de las aplicaciones tienen lugar en alimentos tradicionales que ya tienen establecidos una serie de parámetros de utilización y calidad. Para tener éxito en estos productos, los aislados deben mantener esta calidad. Esto quiere decir igual o similar color, sabor, aroma, textura y composición química y nutricional.

Estos requerimientos, exigidos por el consumidor, determinan el grado de sustitución proteica.

En los últimos años también se han producido aislados proteicos de otros cultivos como colza, trigo, maíz, garbanzo, girasol e incluso de cultivos menores como amaranto (**Martínez et. al. (1996)**). Por último, las proteínas de los aislados pueden ser modificadas químicamente, como por ejemplo mediante acilación para mejorar determinadas propiedades como la solubilidad o mediante desamidación ácida para mejorar otras propiedades funcionales(**Wanasundaraet. al. (1997)**). La mejora de la nutrición es la razón primordial para el uso de los aislados en carnes magras, fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos proteicos.

Así, en productos de carne magra proporcionan beneficios a personas con un alto nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, ya que, además de disminuir el contenido en grasas del producto, las proteínas vegetales tienen efectos beneficiosos en la reducción de los niveles de colesterol (**Sautieret. al.(1986)**). Las fórmulas infantiles basadas en los aislados se

elaboran para proporcionar una nutrición completa y las calorías especificadas a los niños alérgicos o que no pueden tomar leche de vaca, así como al resto de los niños. Las principales ventajas en las bebidas nutritivas para adultos son la flexibilidad de formulación y los efectos hipolipidémicos.

Pero, en cualquier caso, igual que con los alimentos tradicionales, los beneficios nutritivos tienen que ir acompañados con una calidad funcional adecuada para que sean aceptados por el consumidor. Así, en un gran número de aplicaciones, los aislados proteicos vegetales se usan también por sus propiedades funcionales. Así, se emplean para aclarar el color, mejorar la textura de carnes de aves y para unir piezas intactas de músculos (**Kolaret. al. (1985)**). También proporcionan textura a las salchichas, mejoran la funcionalidad de patés y mejoran la textura de los productos de panadería y pastas (**Seyamet. al. (1983)**). Por último, también se han usado en la producción de quesos.

En conclusión, la disponibilidad en grandes cantidades de fuentes proteicas vegetales como la harina desengrasada de oleaginosas, junto con la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales, hace que en los últimos años se esté produciendo un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de estas proteínas vegetales para su uso en alimentación humana. En este sentido, en los próximos años se va a producir un incremento en la disponibilidad de nuevas fuentes proteicas vegetales y en la transformación de estas para su aplicación con fines alimenticios muy concretos conforme a las demandas del mercado en alimentación especializada (infantil o clínica).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Pos cosecha y Agroindustrias de la Estación Experimental Agraria "El Porvenir", Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) ubicado en el distrito de Juan Guerra, y otras evaluaciones se complementaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Martín, durante los meses de Febrero del 2010 a Febrero del 2011.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1 Equipos

- ✓ Balanza analítica marca Mettler, modelo AE 50
- ✓ Estufa marca Binder, modelo FD 53
- ✓ Extractor Soxhlet marca Thermoscientific, modelo 5000-1
- ✓ MuflamarcaKerper Boulevard, modelo XD-1700M
- ✓ pHmetro marca Oacton, modelo Tester 30
- ✓ Digestor microKjeldahl marca Selecta, modelo DMK - 650
- ✓ Espectrofotómetro marca Spectronic, modelo 21 D

3.2.2. Materiales de laboratorio

- ✓ Matraces
- ✓ Probetas
- ✓ Buretas
- ✓ Pipetas
- ✓ Fiolas
- ✓ Placas de vidrio
- ✓ Papel filtro
- ✓ Pinza
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Vaguetas

- ✓ Vaso precipitado
- ✓ Balones
- ✓ Crisoles
- ✓ Campana desecadora
- ✓ Soporte universal
- ✓ Hilo pabilo
- ✓ Cocina
- ✓ Agitador magnético

3.2.3. Reactivos

- ✓ Agua destilada
- ✓ Reactivo de Biuret
- ✓ Éter de petróleo
- ✓ Hidróxido de sodio
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Albúmina de suero bovino

3.3. Desarrollo experimental

3.3.1. Metodología experimental

Para el cumplimiento de los objetivos trazados, el trabajo de investigación se realizó de acuerdo a los pasos indicados en la figura 15.

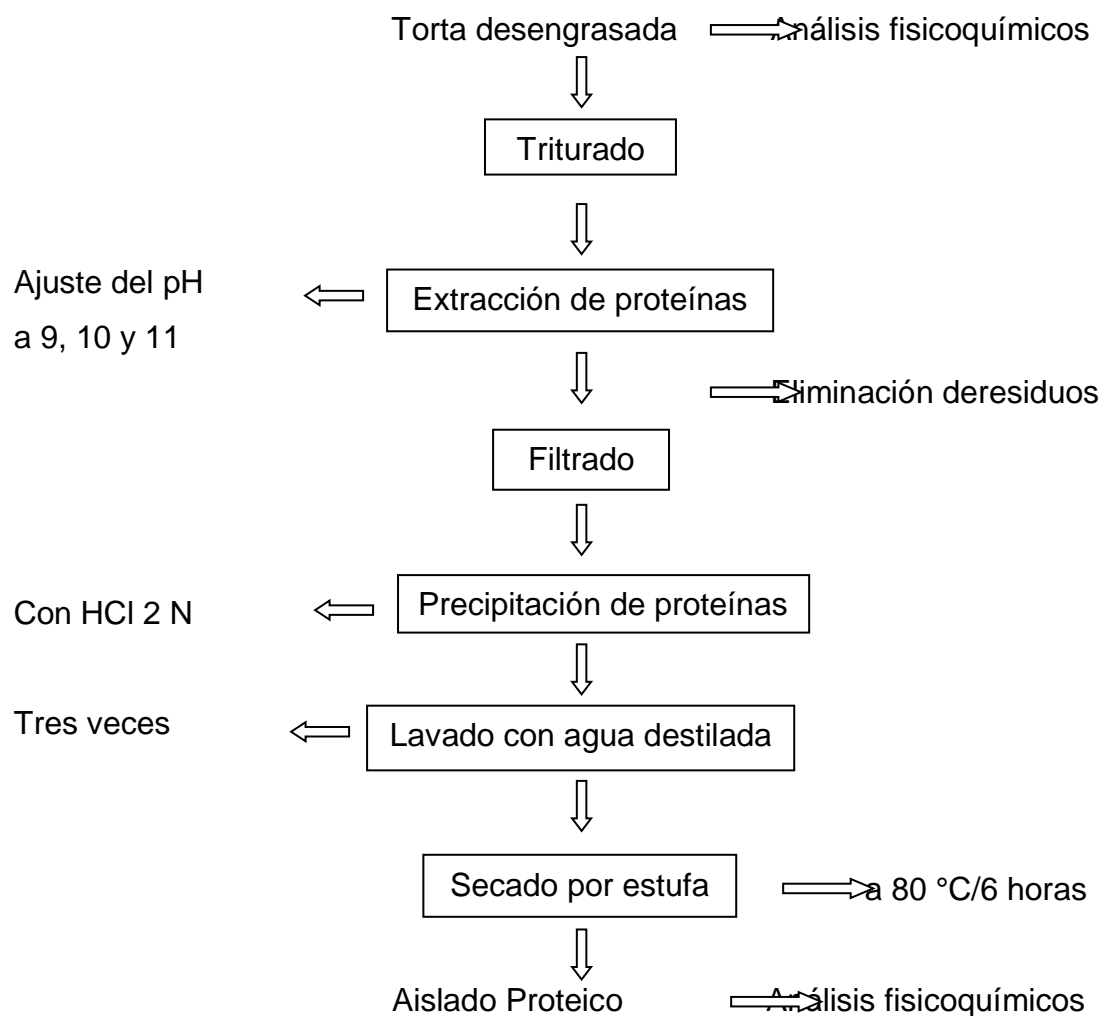


Figura 15: Obtención de Aislado Proteico.

3.3.2. Descripción del proceso:

1. **Materia prima:** La materia prima utilizada fue la torta desengrasada de piñón blanco obtenida de la extracción del aceite; el piñón utilizado pertenece al eco tipo Totorillaico, el cual presenta mejores condiciones de adaptabilidad, contenido y rendimiento de aceite. La torta desengrasada es mostrada en la figura 16.



Figura 16: Torta desengrasada de piñón blanco

2. **Triturado:** Se realizó con un mortero hasta la eliminación de las partículas groseras para mejorar la extracción.
3. **Extracción de proteínas:** Se realizó suspendiendo 10 g de torta desengrasada en distintos volúmenes de agua (50, 100 y 150 ml) y ajustando el pH a valores 9, 10 y 11 con solución de NaOH 0.1N, bajo agitación. Los tiempos de extracción empleados fueron 30, 60 y 90 minutos por un tiempo de 30, 60 y 90 min (**Saetaet. al. (2011)**) por ser los tratamientos planteados.
4. **Filtrado:** Transcurrido el tiempo de extracción, los residuos insolubles fueron separados mediante filtración con tela de seda; para eliminar el residuo sólido insoluble, y el líquido se decepcionó en un vaso de precipitación para su precipitación.
5. **Precipitación:** Para la precipitación de las proteínas se adicionó, gota a gota y bajo agitación suave, ácido clorhídrico 2N al filtrado colectado en el paso anterior, hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas, caracterizado por la aparición de un color lechoso, y dejando en reposo por 5 minutos, tal como se muestra en la figura 17.

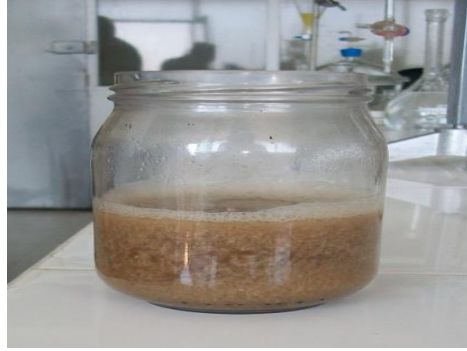


Figura 17: Precipitación de la proteína.

Luego de la sedimentación de las proteínas de piñón, se eliminó el sobrenadante,

6. **Lavado:** El lavado de las proteínas precipitadas se realizó con 100 ml de agua destilada por tres veces; después de cada precipitación (sedimentación), con la finalidad de neutralizar el aislado proteico obtenido.

7. **Secado:** Finalmente, el aislado de proteínas fue puesto en placas Petri y secado en estufa, a temperatura de 80°C, por 6 h, determinándose el peso final y obteniendo el aislado proteico (**Saetaeet. al.(2011)**).

El aislado proteico fue recuperado de las placas Petri, cuantificándose el porcentaje de proteína, que es mostrado en la figura 18. La materia seca recuperada se calculó dividiendo el peso de aislado proteico obtenido entre el peso de torta desengrasada inicial, mientras que la proteína recuperada fue calculada dividiendo los gramos de proteína en el aislado obtenido entre gramos de proteína en 10 g de torta.



Figura 18: Proteína precipitada y deshidratada.

3.3.3. Cinética de extracción de la proteína

Preparación de la muestra. El principio de precipitación isoeléctrica fue usado para la obtención del aislado proteico. La suspensión de torta de piñón fue preparada disolviéndola en agua destilada. La relación sólido/agua fue de 1/5, 1/10 y 1/15 (w/v). El pH de la suspensión fue ajustado a 9, 10 y 11 con solución de NaOH 0.1N.

Curva patrón. La solución de proteína patrón se preparó disolviendo 0.2g de seroalbúmina bovina (Himidia - Laboratories) en 9.8 ml de agua destilada, teniendo una concentración de 0.02mg de proteína por mililitro de solución.

Enseguida, la muestra inicial se diluyó en concentraciones conocidas y se llevó a lectura en el espectrofotómetro (Spectronic 21 D Milton Roy) a 545 nm. con la ayuda del reactivo de Biuret.

Método de Biuret. Es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante el uso de un espectrofotómetro ultravioleta-visible, en una determinada longitud de onda. El reactivo, de color azul, cambia a violeta en presencia de proteínas.

Con los datos de las concentraciones, se construyó la curva patrón, la cual tiene por ecuación la de una línea recta.

$$Y = a + bx \quad \text{Ec. (01)}$$

Donde:

Y: Absorbancia de la proteína patrón.

a y b: Constantes de la ecuación.

x: Concentración proteica de la solución patrón.

Cinética de extracción. Una vez alcanzado el pH de trabajo se controló el tiempo, retirando cada 10 min, hasta los 60 min, 1 ml de la suspensión y diluyéndola en un tubo de ensayo con una cantidad conocida de agua destilada, para estar en el rango de concentración de la proteína patrón, de esta dilución se retira 2 ml y se adiciona 2 ml del reactivo de Biuret, para luego hacer la lectura de concentración de proteína de la muestra en el espectrofotómetro a 545 nm.

De igual modo y a partir de los 60 min, se muestreó cada 15 min hasta los 90 min. Para determinar la concentración de proteína en las muestras, las lecturas de absorbancia fueron reemplazadas en la ecuación de la curva patrón, expresándose como mg/ml.

Finalmente con los datos de tiempo y concentración de la proteína se graficó la curva de cinética de extracción de proteínas.

Análisis de los datos. Se utilizó el modelo matemático hiperbólico (Ec. 02) para ajustar los datos experimentales de cinética de extracción (tiempo y concentración), para esto se empleó regresión no lineal y el programa estadístico (MICROCAL ORIGIN 5.0).

$$Y = \frac{P_1 X}{P_2 + X} \quad \text{Ec. (02)}$$

Donde:

Y: Concentración de proteínas en la suspensión (mg prot./ml. sol.).

P₁ y P₂: Constantes de la ecuación.

X: Tiempo (min.).

3.3.4. Diseño Experimental y Análisis de datos

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas para extraer la mayor cantidad de proteínas de piñón, fue utilizado un diseño factorial completo, el cual consta de dos o más factores, cada uno de los cuales con distintos valores o niveles, cuyas unidades experimentales cubren todas las posibles combinaciones de esos niveles en todo los factores. Este tipo de experimentos permiten el estudio del efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable. Se midió a variable respuesta (concentración de proteína en la solución de extracción), mediante el método de Biuret. Cada una de las variables independientes analizadas fueron consideradas en 3 niveles: -1, 0 y 1 como se muestra en el cuadro 8, en el cual se incluyen también los valores reales de estas variables. El análisis de los datos obtenidos (concentración de proteína en la solución de extracción) en función de las variables independientes (relación de extracción, pH de extracción y tiempo de proceso) fue realizado aplicando Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) con el programa STATÍSTICA 6.0.

Cuadro 8: Valores reales y codificados para la realización del análisis estadístico.

N° Experimento	Relación materia/solución		pH de Extracción		Tiempo de Extracción		Concentración proteica en la solución extractora
1	1 / 5	-1	9	-1	30	-1	3.09
2	1 / 5	-1	9	-1	60	0	3.30
3	1 / 5	-1	9	-1	90	1	3.03
4	1 / 10	0	10	0	30	-1	2.33
5	1 / 10	0	10	0	60	0	2.43
6	1 / 10	0	10	0	90	1	2.35
7	1 / 15	1	11	1	30	-1	1.19
8	1 / 15	1	11	1	60	0	1.20
9	1 / 15	1	11	1	90	1	1.29

3.3.5. Análisis físico químico

- ✓ **Humedad y materias volátiles**, por el método de secado en estufa a 105°C (AOAC, 1995).
- ✓ **Cenizas totales**, método horno mufla a 550 °C por 24 horas (AOAC, 1995).
- ✓ **Proteína total**, por método de Kjeldahl(AOAC, 1990)
- ✓ **Grasa total**, por el método de Soxhlet (AOAC, 1990).
- ✓ **Fibra total**, por hidrólisis ácida y alcalina (AOAC, 1990).
- ✓ **Carbohidratos totales**, se obtuvo por diferencia, restándose de 100 la sumatoria de porcentajes de humedad, proteína, grasa, ceniza y fibra.
- ✓ **Acidez titulable**, por el método AOAC (1990).

3.3.6. Cálculo para la determinación del contenido de aminoácidos

Cómputo o score de aminoácidos: La relación de aminoácidos (mg de un aminoácido esencial en 1 g de proteína de referencia/mg del mismo aminoácido en 1 g del patrón de referencia) de cada uno de los nueve aminoácidos esenciales más tirosina y cistina fue calculada de acuerdo al estándar de la FAO/OMS/UNU (1985). Este patrón de referencia se expresa en mg de aminoácidos/g de proteína. La relación más baja de aminoácidos en términos del puntaje es denominado cómputo o score de aminoácidos.

El cálculo para determinar el contenido de aminoácidos del aislado proteico se determinó elaborando un análisis teórico mediante el método del score de aminoácidos que consiste en multiplicar la relación de aminoácido más baja por la digestibilidad verdadera de la proteína.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis físico químico

Los resultados de los análisis físico – químicos, de torta y aislado, se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9: Composición físico - química promedio (%) de la torta de semilla de piñón y su aislado proteico.

Contenido	Torta desengrasada de piñón	Aislado proteico de piñón
Aceite	0.80	0.45
Fibra	36.18	1.48
Cenizas	5.67	3.80
Proteína	22.90	79.34
Humedad	7.93	8.18
Carbohidratos	26.52	6.75

En el cuadro 9 puede verse que la torta desengrasada tuvo contenido de aceite de 0.8% y contenido de proteína de 22.9%, valores similares a los reportados por **Saetaet. al. (2011)** así como por **Makkaret. al. (1998)**. La diferencia entre los resultados obtenidos y los reportados por los autores citados, puede deberse a menudo por las distintas variedades de piñón, condiciones de crecimiento, clima, suelo, parte de la semilla y métodos de extracción de aceite.

En cuanto al aislado proteico, se puede notar que con respecto al aceite, se obtuvo menor porcentaje que el reportado por **Saetaet. al. (2011)**, lo cual puede significar que la presencia de los ésteres de forboles inferior en el aislado obtenido ya que su presencia está relacionada de manera directa con el contenido de aceite; sin embargo, fue un tanto más alto que el reportado por **Makkaret. al. (2008)**. En tanto que para fibra el valor obtenido fue más alto que el de otros reportes; en cambio, el contenido de cenizas fue menor, debido a las distintas condiciones a las que fueron sometidas las materias primas para la obtención de los aislados.

El contenido de proteína en el aislado obtenido fue 79.34%, y se encuentra cercano al valor reportado para piñón por **Makkaret. al. (2008)** de 82.0% y es mayor que el determinado por **Aremuet. al. (2007)** para marañón de 69.6%, por **Saetaet. al. (2011)** para piñón de 19.9% y por **Rustomet. al. (1991)** para maní de 2.8% en distintas publicaciones.

4.2. Curva Patrón de proteína

El coeficiente de determinación (R^2) indica la proporción de la varianza de la variable “y” que es explicada por su relación lineal con la variable “x”, y será 1 cuando la relación entre las dos variables sea perfecta ($r = +1$) y cero cuando no exista ninguna asociación lineal entre las variables ($r = 0$), **Gómez (2007)**. En la figura 19 se tiene la curva patrón de concentración de proteína que muestra un coeficiente de determinación cercano a la unidad ($R^2 = 0.978$). Los datos experimentales para la elaboración de la curva patrón de concentración de proteína son mostrados en el cuadro 10.

Cuadro 10: Datos experimentales para la elaboración de la curva patrón.

Concentración	Absorbancia
0.000000	0.007
0.000625	0.068
0.001250	0.132
0.002500	0.232
0.005000	0.364

De acuerdo al R^2 obtenido, entendemos que la curva patrón elaborada tiene un buen grado de ajuste.

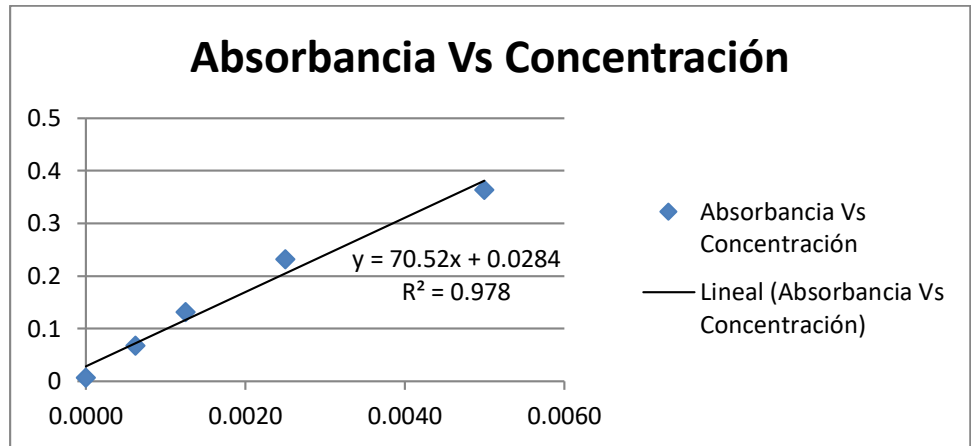


Figura 19: Curva patrón de concentración de proteína.

Esta curva patrón permitió calcular la concentración de proteína en la solución que se muestra en el cuadro 11.

4.3. Cinética de extracción

En el cuadro 11 a continuación, se presentan los datos de concentración de proteína promedio en la solución con la cual se realizó la cinética de extracción de proteínas.

Cuadro 11: Datos experimentales de concentración de proteína.

	<i>Relación 1/5</i>			<i>Relación 1/10</i>			<i>Relación 1/15</i>		
	<i>pH 9</i>	<i>pH 10</i>	<i>pH 11</i>	<i>pH 9</i>	<i>pH 10</i>	<i>pH 11</i>	<i>pH 9</i>	<i>pH 10</i>	<i>pH 11</i>
30	3.09	3.60	3.93	1.03	2.33	2.21	1.15	1.61	1.19
60	3.30	2.91	3.74	1.27	2.43	2.43	1.09	1.76	1.20
90	3.03	3.53	3.80	1.36	2.35	2.34	1.23	1.67	1.29

En la figura 20 se observa el efecto de la relación de extracción de proteínas para pH 9. Se observa que la concentración de proteínas extraída se incrementa rápidamente al poco tiempo de empezada la misma, la concentración de proteínas extraída son cada vez menores, presentando tendencia a hacerse constantes con el pasar del tiempo. A pH 9 la relación de extracción que da mayor concentración corresponde a la relación de extracción de 1/5, siendo más bajas las concentraciones

correspondientes a las relaciones de extracción de 1/10 y 1/15, Rustomet. al. (1991).

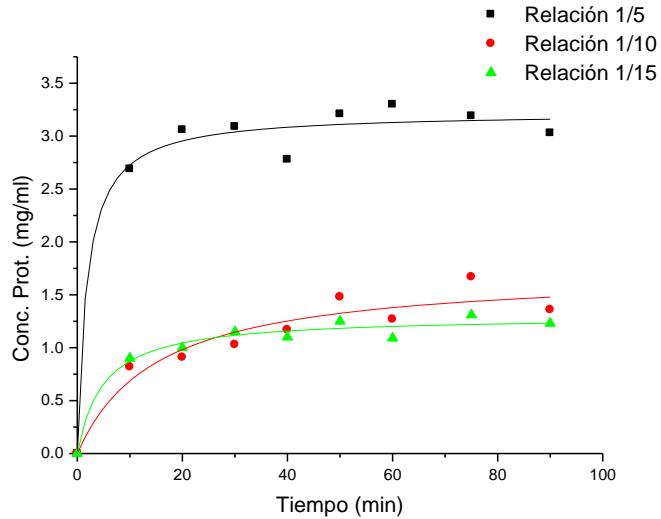


Figura 20: Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 9.

En la figura 21, se observa un comportamiento similar mostrado en la figura anterior. Podemos afirmar entonces que manteniendo el pH de extracción 9 constante se obtiene mayor concentración de proteínas extrayendo con relación de extracción de 1/5, Rustomet. al. (1991).

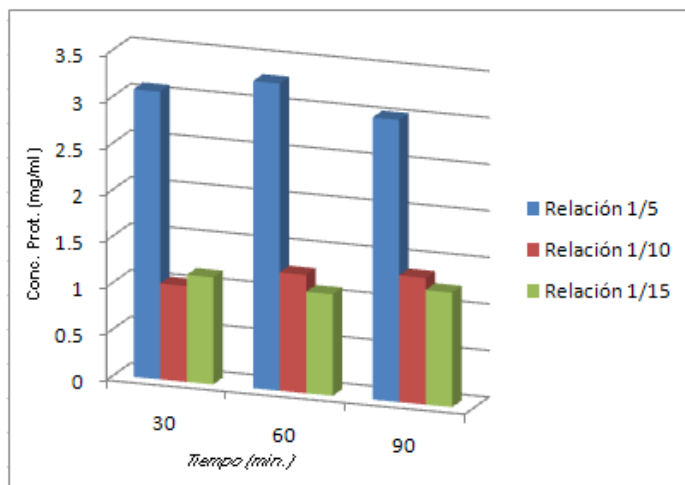


Figura 21: Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 9.

De la misma manera, se observa en la figura 22 que la concentración de proteínas se incrementa al poco tiempo de haber iniciado la extracción de proteínas. La concentración varía según la relación de extracción y el pH a la que es sometida, verificándose esta vez que a pH 10 la mayor concentración se obtiene con relación de extracción de 1/5. Las otras relaciones de extracción, a pH 10, presentaron menor concentración de proteína extraída, **Rustomet. al. (1991)**.

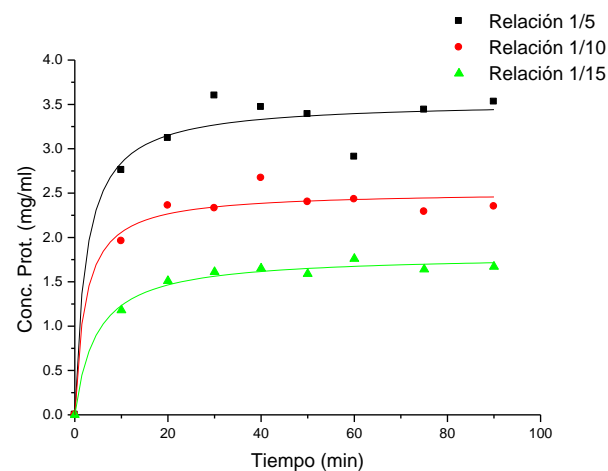


Figura 22: Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 10.

En la figura 23 se puede observar también que, a pH 10, la mayor concentración de proteínas se puede obtener extrayendo con relación de 1/5. Sin embargo, la concentración de proteínas es un tanto mayor que a pH 9. Esto debido a que en concentraciones de solución salina baja se espera que la solubilidad de una proteína a pH elevado sea máxima, **Yúfera (1997)**.

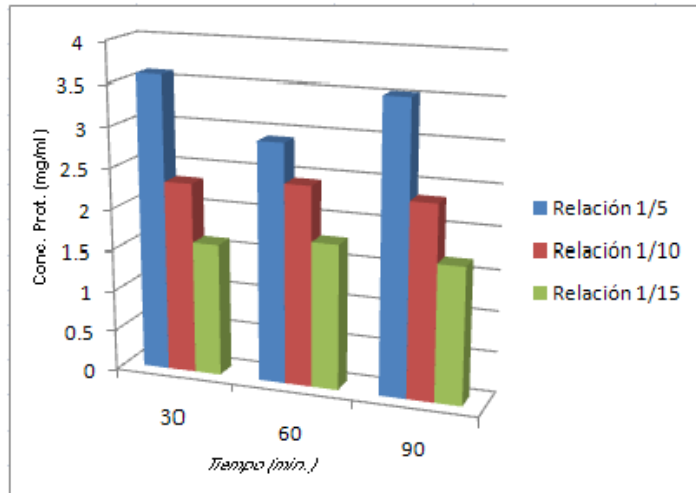


Figura 23: Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 10.

En la figura 24 se observa el incremento de la concentración de proteínas al poco tiempo (30 minutos) de haber empezado la extracción y que a partir de ahí se mantiene casi constante. La relación de extracción que permite obtener mayor concentración de proteínas en el proceso fue 1/5, **De Songet. al. (2010).**

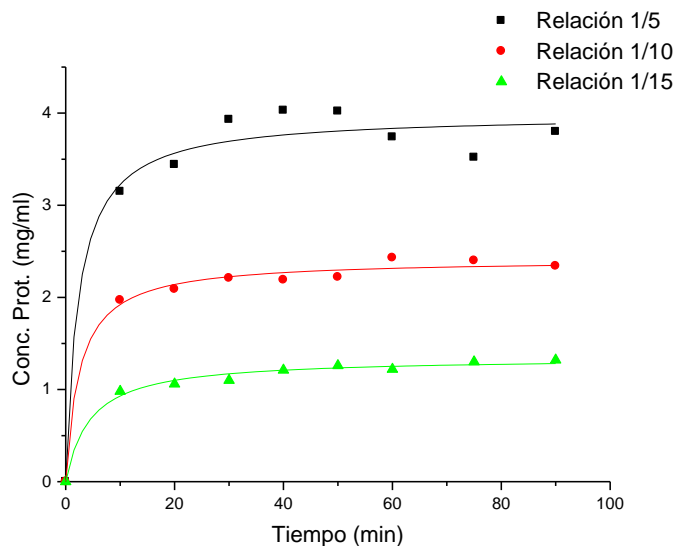


Figura 24: Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón a pH 11.

En la figura 25 se observa que la mayor concentración de proteínas se obtiene al extraer las proteínas con relación de extracción 1/5 y a pH 11. Nuevamente la concentración de proteínas es mayor con respecto a los valores de pH 9 y 10, **Callisaya y Alvarado (2009)**.

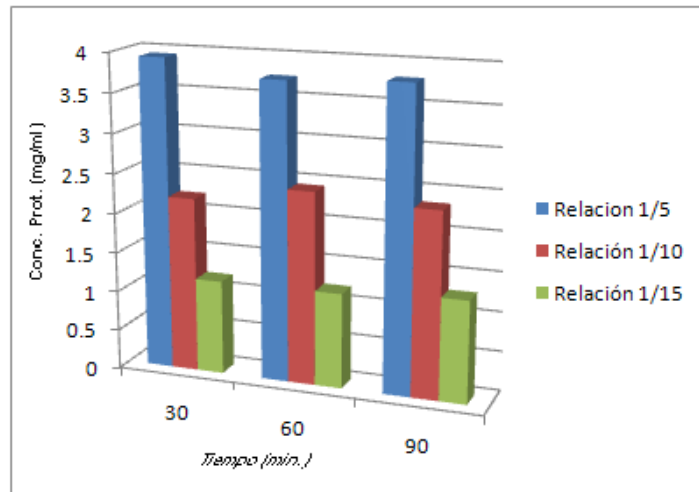


Figura 25: Comportamiento de las relaciones de extracción de las proteínas a pH 11.

En las figuras anteriores se verificó que manteniendo constante los valores de pH y variando las relaciones de extracción de proteínas para cada valor de pH se obtiene mayor concentración de proteínas elevando el pH y disminuyendo la relación de extracción de proteínas, **Rustomet. al. (1991)**.

En este caso manteniendo constante las relaciones de extracción y variando los valores de pH, se verifica en la figura 26 que la concentración también se incrementa en poco tiempo y se mantiene constante. La mayor concentración de proteínas obtenida con relación de extracción de 1/5 corresponde al valor de pH 11, **Rustomet. al. (1991)**.

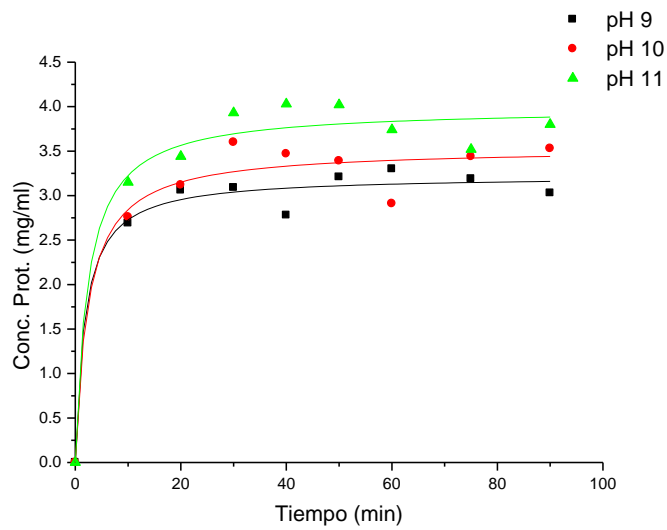


Figura 26: Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/5.

En la figura 27 se observa que con relación de extracción de 1/5 constante, se obtiene mayor concentración de proteínas extrayendo con valores de pH 10 y 11, De Songet. al.(2010) y Callisaya y Alvarado (2009). Nuevamente se verifica este fenómeno cuando a concentraciones de solución salina baja, la solubilidad de una proteína a pH elevado es máxima, Yúfera (1997).

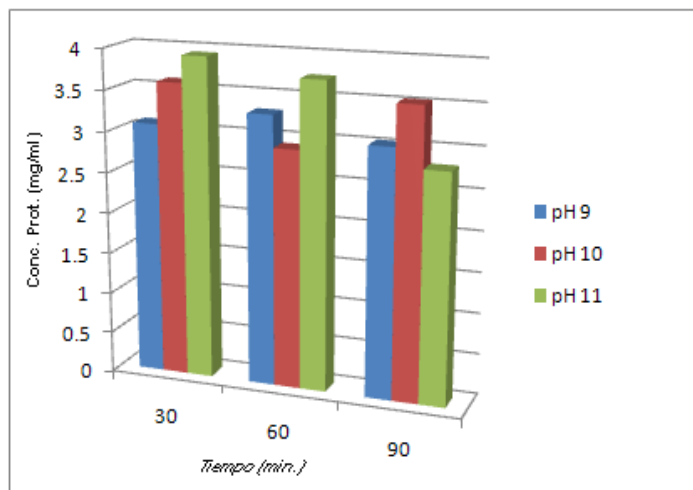


Figura 27: Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/5.

Así mismo a relación de extracción de proteínas de 1/10, la mayor concentración de proteínas se verifica con la primera curva, que esta en torno de 2.3 a 2.7mg/ml, seguida muy de cerca por la segunda, que esta en torno de 2.0 a 2.2mg/ml; estas curvas pertenecen a valores de pH 10 y 11. Véase la figura 28.

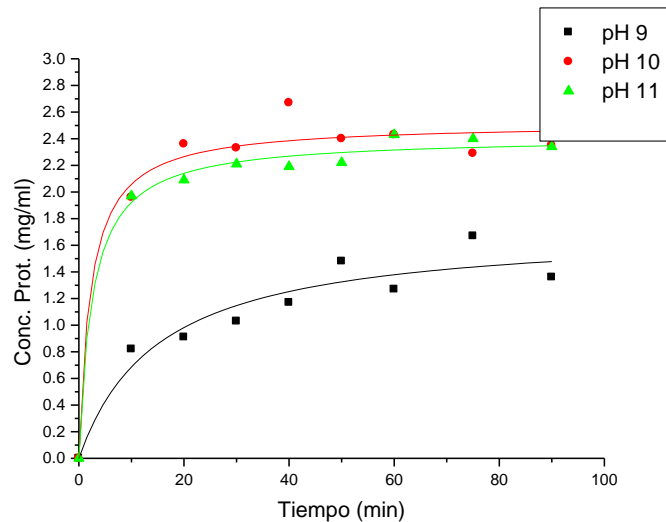


Figura 28: Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/10.

En la figura 29 se observa que manteniendo la relación de extracción de proteínas de 1/10 se obtiene también mayor concentración con valor de pH elevados. Sin embargo la concentración de las proteínas es más baja que las extraídas con la relación de extracción de 1/5, lo que implica que se tendrá mayor concentración de proteínas con la menor relación.

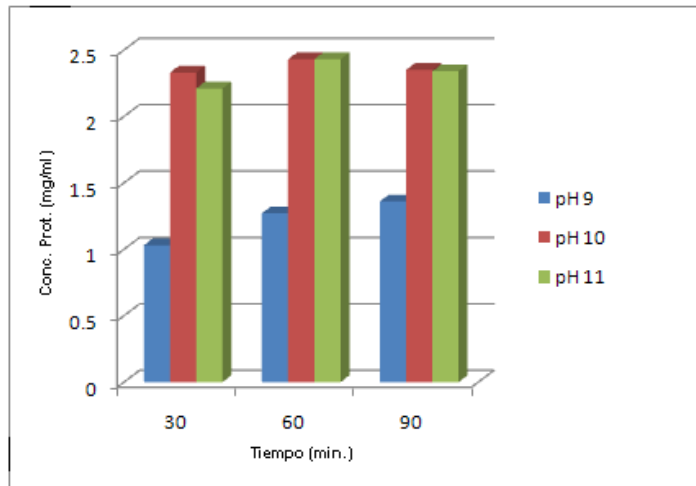


Figura 29: Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/10.

En tanto que a relación de extracción de proteínas de 1/15, la mayor concentración de proteínas esta verificada por la curva el cual corresponde al valor de pH 10, **De Songet. al.(2010)**. Véase la figura 30.

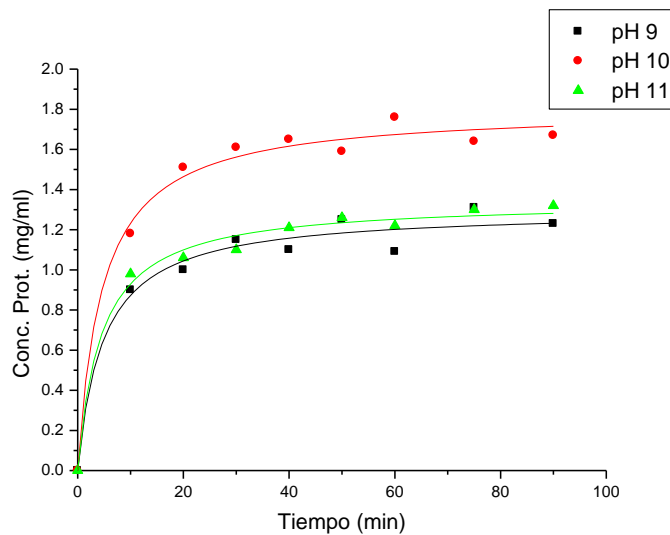


Figura 30: Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón a relación de extracción de proteínas de 1/15.

En la figura 31 se observa que la mayor concentración de proteína; manteniendo la relación de extracción de 1/15, se obtiene con valor de pH

10, no obstante el contenido de proteínas es muy bajo en comparación a las extraídas con relación de extracción de 1/10 y 1/5.

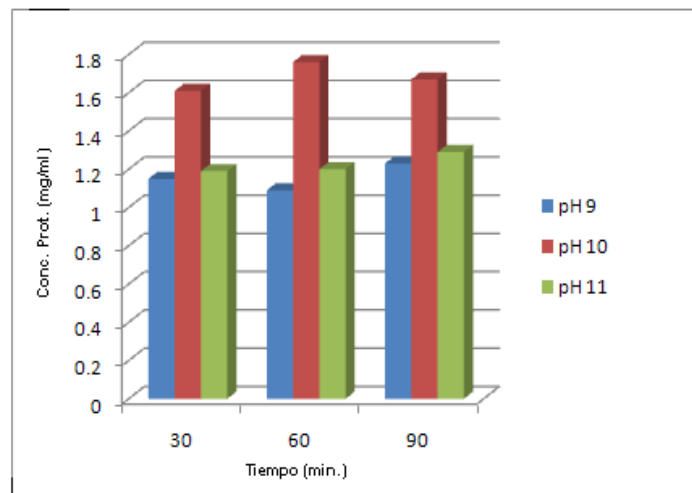


Figura 31: Comportamiento de los distintos pH a relación de extracción de 1/15.

De esta manera con la cinética de extracción de proteínas se pudo definir que para un mayor contenido de proteínas en una extracción se debe extraer con relación de extracción de 1/5 y con valores elevados de pH, **Rustomet. al.(1991)**.

4.4. Superficie de Respuesta

Los datos experimentales de la concentración de proteínas en la solución se muestran en el cuadro 11, el análisis de varianza muestra que el pH y la relación de extracción tienen influencia en la extracción mientras que el efecto del tiempo no tiene influencia en la extracción (anexo 1), sin embargo otros trabajos encuentran influencia en el tiempo de extracción así como en la relación de extracción y el pH, **Rustomet. al. (1991)**; además se muestra que la estimación de los efectos y los coeficientes de regresión demuestran influencia significativa entre relación de extracción y el pH(fig.32 y 33).

Figura 32: Estimación de los efectos en la extracción.

Estimacion de los efectos; Var.:Conc. Prot, $R^2 = 0.93385$; Adj: 0.89883

3 factores, 1 Bloque, 27 corridas; MS Residual= 0.0992509

DV: Conc. Prot.

					-95.%	+95.%		Std.Err.	-95.%	+95.%
factor	Effect	Std.Err.	t(17)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.	Coeff.	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	2.24703704	0.1604111	14.0079896	9.1228E-11	1.9085992	2.58547488	2.24703704	0.1604111	1.9085992	2.58547488
1 Relación (L)	-2.09555556	0.14851182	-14.1103619	8.1358E-11	-2.40888811	-1.782223	-1.04777778	0.07425591	-1.20444406	-0.8911115
Relacion (Q)	0.85111111	0.25723002	3.30875497	0.00415089	0.3084032	1.39381902	0.42555556	0.12861501	0.1542016	0.69690951
2 pH (L)	0.64666667	0.14851182	4.35431104	0.00043151	0.33333411	0.95999922	0.32333333	0.07425591	0.16666706	0.47999961
pH (Q)	-0.58888889	0.25723002	-2.28934743	0.03512555	-1.1315968	-0.04618098	-0.29444444	0.12861501	-0.5657984	-0.02309049
3 Tiempo (L)	0.03111111	0.14851182	0.20948575	0.83655891	-0.28222144	0.34444367	0.01555556	0.07425591	-0.14111072	0.17222183
Tiempo (Q)	-0.23555556	0.25723002	-0.91573897	0.37261159	-0.77826346	0.30715235	-0.11777778	0.12861501	-0.38913173	0.15357618
1L x 2L	-0.36	0.18188909	-1.97922808	0.06422082	-0.74375244	0.02375244	-0.18	0.09094455	-0.37187622	0.01187622
1L x 3L	0.15333333	0.18188909	0.84300455	0.41093049	-0.23041911	0.53708577	0.07666667	0.09094455	-0.11520955	0.26854289
2L x 3L	-0.08833333	0.18188909	-0.48564393	0.63341965	-0.47208577	0.29541911	-0.04416667	0.09094455	-0.23604289	0.14770955

Los datos de color rojo muestran influencia entre ellos.

Figura 33: Coeficientes de Regresión

Regresion de coeficientes; Var.:Conc. Prot.; $R^2=.93385$; Adj.:.89883
 3 factores, 1 Bloque, 27 corridas; MS Residual=.0992509
 DV: Conc. Prot.

	Regressn				-95.%	+95.%
	Coeff.	Std.Err.	t(17)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	2.24703704	0.1604111	14.0079896	9.1228E-11	1.9085992	2.58547488
1 Relación(L)	-1.04777778	0.07425591	-14.1103619	8.1358E-11	-1.20444406	-0.89111115
Relación (Q)	0.42555556	0.12861501	3.30875497	0.00415089	0.1542016	0.69690951
2 pH (L)	0.32333333	0.07425591	4.35431104	0.00043151	0.16666706	0.47999961
pH (Q)	-0.29444444	0.12861501	-2.28934743	0.03512555	-0.5657984	-0.02309049
3 Tiempo (L)	0.01555556	0.07425591	0.20948575	0.83655891	-0.14111072	0.17222183
Tiempo (Q)	-0.11777778	0.12861501	-0.91573897	0.37261159	-0.38913173	0.15357618
1L by 2L	-0.18	0.09094455	-1.97922808	0.06422082	-0.37187622	0.01187622
1L by 3L	0.07666667	0.09094455	0.84300455	0.41093049	-0.11520955	0.26854289
2L by 3L	-0.04416667	0.09094455	-0.48564393	0.63341965	-0.23604289	0.14770955

Los datos de color rojo muestran influencia entre ellos.

La prueba de significancia de Tuckey determinó que existe diferencia significativa entre las tres relaciones de extracción de proteínas. Así mismo, se determinó que el pH de extracción de proteínas no muestra diferencia significativa entre 11 y 10, entonces comparando con los resultados de **Tanget. al. (2010)** se podría decir que los resultados obtenidos se asemejan a los reportados ya que el rendimiento de proteína se incrementa con el aumento del pH, mientras que disminuye con el aumento de la relación sólido/líquido. Además hay que tener en cuenta que a partir de pH 10 el contenido de proteínas extraídas disminuye, **Rodríguez et. al.(2010)**.

En la figura 34 se muestra que la mayor concentración de proteína obtenida se alcanza cuando el pH está en torno a los valores codificados 0.0 y 1.0, correspondientes a los valores reales de 10 y 11 respectivamente. Lo que significa que mayor concentración de proteína se obtiene al extraer con valores elevados de pH, debido a que las proteínas tienen mayor solubilización a pH elevados, **Rodríguez et. al. (2010)**.

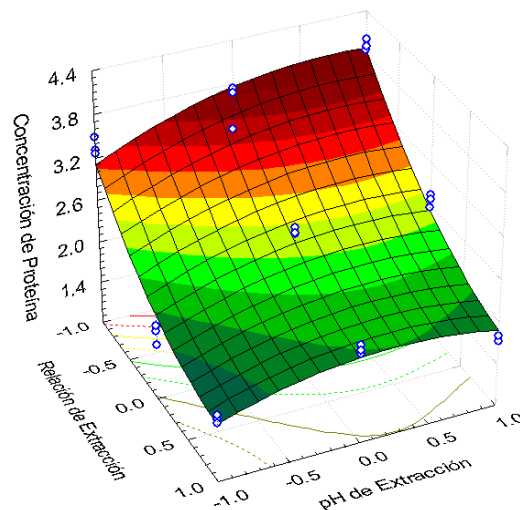


Figura 34: Efecto del pH sobre la concentración de proteínas de piñón.

La figura 35 demuestra el resultado de la prueba de significancia de Tuckey el cual indica que no existe diferencia significativa entre los

valores de pH 10 y 11; **Tanget. al.(2010)**, pero por tener mayor promedio entre estos dos valores, es el pH 10 el que tomamos como óptimo.

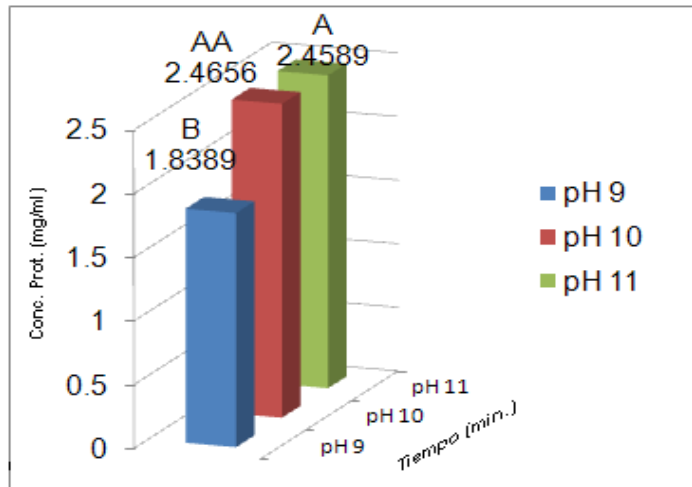


Figura 35: Comportamiento de los distintos valores de pH.

De igual manera, en la figura 36 se observa que la mayor concentración de proteínas extraída se puede conseguir trabajando con relación de extracción correspondiente al valor codificado de -1.0 el cual corresponde al valor real de relación de extracción 1/5. Por lo tanto es conveniente trabajar con bajas relaciones de extracción por que es posible extraer mayor cantidad de proteína ,**Rustomet. al.(1991)**.

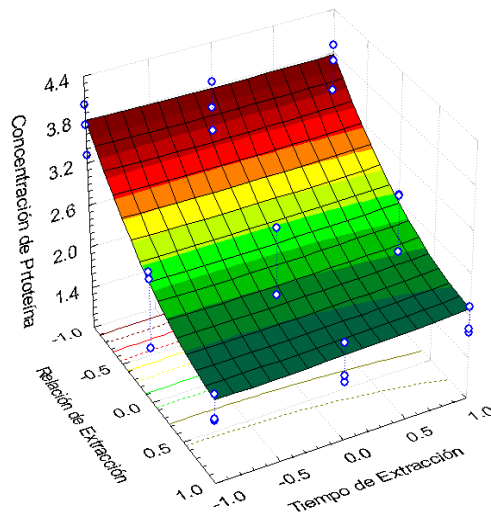


Figura 36: Efecto de la relación de extracción de proteínas sobre la concentración de proteínas de piñón.

En la figura 37 se afirma los resultados de la prueba de significancia de Tuckey el cual demostró que hay diferencia significativa entre los valores de relación de extracción, siendo la relación de extracción de 1/5 la que dio mejor concentración promedio como resultado, **Tanget. al.(2010)**.

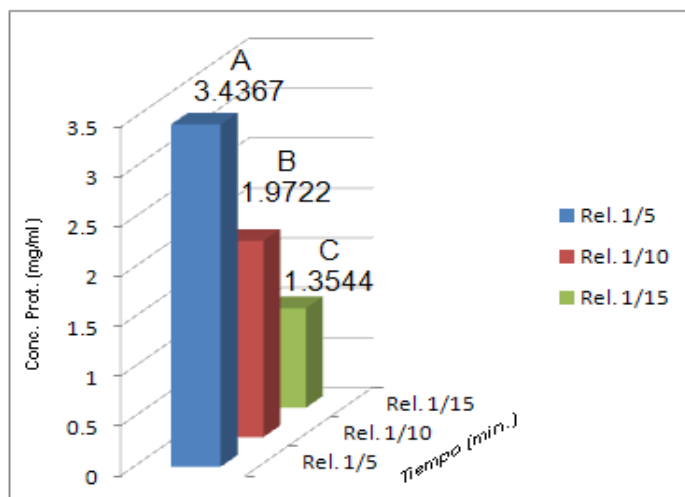


Figura 37: Comportamiento de las distintas relaciones de extracción de proteínas.

Así mismo puede notarse; en la figura 38, que la concentración de proteína extraída es similar para el rango de valores codificados de -1.0 y 1.0, correspondientes a los valores reales de 30 y 90 minutos. Este

resultado indica que no hay diferencias significativas entre los valores de tiempo considerados, y que sería adecuado realizar la extracción durante 30 minutos.

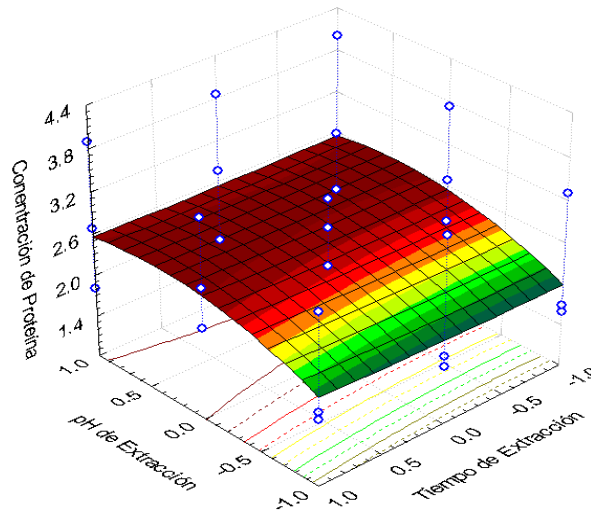


Figura 38: Efecto del tiempo de extracción sobre la concentración de proteínas de piñón.

En la figura 39, se muestra las condiciones óptimas del proceso que es obtenida superponiendo las áreas en 2D de las figuras 34, 36 y 38; dichas condiciones es generada en el área de mayor concentración de proteínas y se encuentra entre los valores de 0 a 1 para el pH y de -1 para la relación de extracción, teniendo en cuenta que para el tiempo no hay diferencia significativa de -1 a 1.

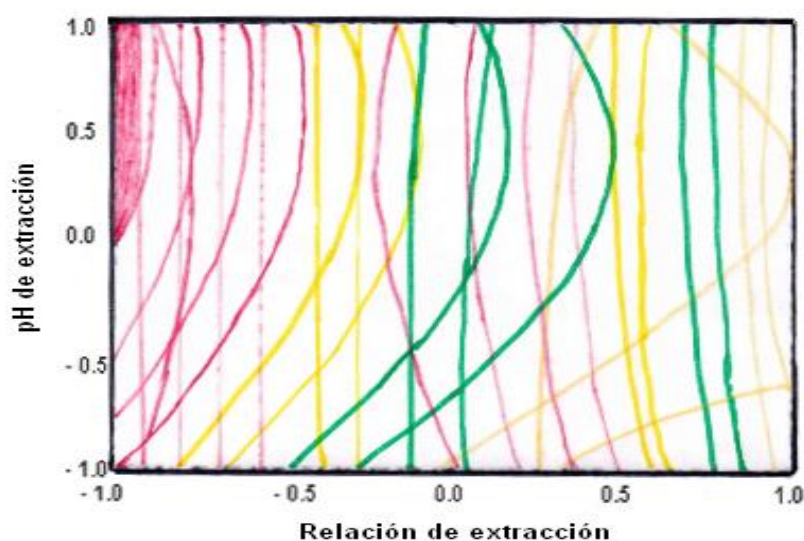


Figura 39: Área óptima de proceso.

4.5. Rendimiento de extracción de proteínas

El rendimiento de extracción de proteínas en este estudio fue 8.67% respecto a la masa total de la torta; con rendimiento de contenido de proteína de 34.64%, el cual fue muy bajo al compararlo con 88.2% (Saetaet. al.(2011) para piñón), con 85.29% (Rustomet. al. (1991) para maní) y con 26.5% (Makkaret. al.(2007) para piñón); sin embargo fue mayor que 4.06% (Makkaret. al.(2008) para piñón).

La diferencia en estos resultados puede deberse a las diferentes variedades analizadas, a la diferencia entre cultivos de piñón, condiciones de crecimiento, clima, suelo, parte de la semilla, métodos de extracción de aceite y a las distintas condiciones a las que fueron sometidas las materias primas para la obtención de los aislados.

4.6. Cálculo para la determinación del contenido de aminoácidos

El contenido de aminoácidos del aislado proteico fue calculado según el método de score de proteínas y se muestra en el cuadro 12, asumiendo la digestibilidad para el aislado proteico del 90%, Makkaret. al.(2007).

El contenido de aminoácidos; según el método de score de aminoácidos, reportó contenido de Histidina muy similar al requerido por la FAO; en

tanto que la Lisina resultó muy bajo, pero los contenidos restantes fueron muy similares comparados con los reportados por **Malapantet. al.(2009)**, sin embargo fue mucho más bajo que los demás reportes.

Cuadro 12: Contenido de aminoácidos del aislado proteico según el método teórico de cómputo de aminoácidos.

Aminoácido	Aislado proteico de piñón (g/100 g)	Valor referencial FAO/WHO (g/100 g)
Isoleucina	0.86	1.3
Leucina	0.67	1.9
Lisina	0.35	1.6
Met + Cist	0.82	1.7
Fen + Tir	0.76	1.9
Treonina	0.73	0.9
Valina	0.73	1.3
Histidina	1.17	1.9

Valor de referencia FAO/OMS, tomada de Makkar y col. (1998).

V.- CONCLUSIONES

- Los parámetros más adecuados para la obtención del aislado proteico de piñón blanco fueron relación de extracción 1/5, pH 10 y tiempo de extracción de 30 minutos.
- Se obtuvo un aislado proteico con contenido de proteínas de 79.34% y con rendimiento de extracción de 34.64%.
- Se logró efectuar la caracterización fisicoquímica del aislado proteico obtenido, del cual se tuvo 0.45% de contenido de aceite, 1.48% de fibra, 3.8% de cenizas, 79.34% de contenido de proteínas, 8.18% de humedad y 6.75% de carbohidratos.

VI.-RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios a cerca de este tema con la finalidad de optimizar la extracción de las proteínas del piñón.
- Realizar destoxificación de la torta para seguir aprovechando las proteínas vegetales que ofrece, así como también seguir con las investigaciones ya que no está siendo aprovechado todo el potencial con que cuenta este subproducto.
- Realizar estudios adicionales al aislado proteico tales como el grado de solubilidad, punto isoeléctrico, grado de absorción y de disponibilidad, con el fin de determinar su valor nutricional.
- Antes de usar el producto obtenido, se debe mezclar con otros ricos en lisina debido a que el producto obtenido es limitante en éste, sabiendo que un alimento rico en lisina es el que muestra su verdadero valor para la alimentación del ganado.
- Por último, se podría utilizar la proteína de piñón en la elaboración de películas biodegradables para la agroindustria y agricultura.

VII.- BIBLIOGRAFIA

1. Ahern, K.G., Mathews, C.K., Van Holde, K.E. 2003. Buenos Aires. Biología celular y molecular (5ª Ed.). Editorial Médica Panamericana.
2. Alberts, Guilbault, G.G. (2004). Biología Molecular de la Célula. Edit. Omega. España.
3. Alfonso, J.A. (2008) Proyecto Gota Verde, Propagación de, 7 pp.
4. AOAC, Official Methods of Analysis 15th ed. 1990. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
5. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. (1995). Method 925.40, 935.53, 948.22, 950.48, 950.49. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
6. Aremu, M. O., Olonisakin, A., Ogunlade, I. 2007. Fatty Acid and Amino Acid Composition of Protein Concentrate from Cashew Nut (*Anacardium occidentale*) Grown in Nasarawa State, Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition 6 (5): 419-423.
7. Chau, C.F; Cheung, P.C.K., y Wong, Y.-S. (1997). Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. J. Agric. Food Chem. 45, 2500-2503.
8. Callisaya, A. J. C., Alvarado K. J. A. 2009. Aislados proteicos de granos alto andinos (*chenopodiaceas*); quinua "*Chenopodium quinoa*" – cañahua "*Chenopodium pallidicaule*" por precipitación isoelectrica. Revista Boliviana de Química. Vol.26, N° 1.
9. De Song, T. Y. J., Tian He, Y. Z., Lin L., Hu Song, Q. y Li B. 2010. Optimización de la extracción de proteínas asistida por ultrasonidos de grano gastado de cerveza. Checa J. FoodSci. 1: 9.17.
10. FAO/WHO(1991). Protein quality evaluation. FAO Food and Nutrition Paper, No. 51. A joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, Italy. pp. 4-66
11. Fennema, O. 2000. "Química de los Alimentos". 2ª Ed., Acribia,

12. Gómez Barrantes M. 2007. Elementos de Estadística Descriptiva. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica.
13. Gutiérrez Bello J. 2000. Ciencia Bromatológica- Principios Generales. Pp. 250-251. . Ediciones Días de Santos. Madrid, España.
14. Heller J. 1996. Physic Nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops, 1. Institute of Plant Genetics and Crops Plants Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome
15. Henning, R. 1996. The *Jatropha* Project in Mali. Rothkreuz 11, D-88138 Weissensberg, Germany.
16. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 2008.
17. Jean-Claude Cheftel. 1999. Proteínas alimentarias: Bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones químicas. Edit. Acribia.
18. Jeremy Mark Berg, Lubert Stryer, John Tymoczko, José M. Macarulla. 2008. Bioquímica. Edit. Reverte.
19. Jones, N; MILLER, J. H. 1992. *Jatropha curcas*: A multipurpose Species for Problematic Sites. The World Bank, Washington DC USA.
20. Kiefer, J. 1986. Die Purgiernu, B (*Jatropha curcas* L.) – Ernteprodukt, Verwendungsalternativen, Wirtschaftliche Überlegungen. Diploma thesis University Hohenheim, Stuttgart.
21. Kerstetter, J. E., O'Brien, K. O., Casería, D.M, Wall, D. E. & Insogna, K. L. 2005. "The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women". J Clin Endocrinol Metab. Vol. 90, p26-31.
22. Kolar, Sekul, A. A and Ory, R.L. 1985. Rapid enzymatic method for partial hydrolysis of oilseed proteins for food uses. J. Am. Oil Chem. Soc. 54 (1): 32.
23. Lodish, D. 2005. Biología Celular y Molecular 5ta Edición, Editorial Panamericana.

24. Makkar HPS, Aderibigbe AO, Becker K. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability, and toxic factors. *Food Chem.* 62: 207-215.
25. Makkar HPS, Selje – Assmann, N. Hoffmann E. M, Francis G, and Becker K. 2007. Quantitative and qualitative analyses of seed storage proteins from toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. *J. Sci. Food Agr.* 124, pp 625.
26. Makkar HPS, Francis G, Becker K. 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. *J. Sci. Food Agr.* 88: 1542-1548.
27. Martínez del Pozo, J. 2006. Caracterización Genético, Nutricional y No nutricional de *Jatropha curcas* L. de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
28. Martinez Del Pozo, Bressani, R. 1996 Composition and nutritional properties of amaranth.
29. Malapant T., Waraporn A., Pilanee. V., Phanu. S. 2009. Optimization of Protein Hydrolysate. Production Process from *Jatropha curcas*. Cake. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 53.
30. Mejía. 2006. “Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México”. *Anuales Del Instituto de Biología, UNAM, Ser. Bot.*, 73(2): 155-281.
31. Potter, V.R. 1997. *Bioethics. Bridge to the future.* Prentice-Hall, Inc., New Jersey, XIII+205 pp.
32. Proyecto Piñón – Dirección Regional de Agricultura de San Martín 2011.
33. Rodríguez F. Pablo, Pérez Elevina, Guzmán Romel. 2010. Propiedades Químicas y Nutricionales de Aislado Proteico de hojas de *Amaranthus dubius*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 47097. Los Chaguaramos, Caracas 1041-A, Venezuela.

34. Rustom, .I. Y. S., López-Leiva, M.H., and Nair, B.M. 1991. Optimization of Extraction of Peanut Proteins with Water by Response Surface Methodology. *Journal of Food Science* –Volume 56, N° 6.
35. Saetae D, Kleekayai T., Jayasena V. and Suntornsuk W. 2011. Functional Properties of Protein Isolate Obtained from Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seed Cake. *Food Science and Biotechnology*. Volume 20, Number 1, 29 – 37, DOI: 10.1007/s10068-011-0005-x.
36. Sautier, Li-Chan E, Nakai S, Wood D, F.1986. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying operties. *J. Food Sci.* 49: 345-350.
37. Schmook, B.; Sánchez, S. 2005. Uso y potencial de la *Jatropha curcas* L. en la Península de Yucatán, México.
38. Seyam, Jiamyangyuen, S., Srijesdaruk, V. Y Harper, W, J. 1983. Extracción de concentrado de proteína de salvado de arroz y su aplicación en el pan. *Songklanakarin J. Sci.* 27 (1): 55-64.
39. STATBAS. 1988. Statistical Graphics System, Version 6.0 Users Guide Reference. Statistical Graphics Corp., Inc., USA.
40. Wanasundara, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Del Barrio AS, Martínez J.A. 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Food Hum. Nutr.* 51: 331-342.
41. Yúfera, P. E. 1997. Química de los alimentos. Editorial Síntesis S.A. Madrid.

VIII.- ANEXOS

Anexo 1: Análisis de varianza de los datos experimentales.

ANOVA; Var.: Conc. Prot.; $R^2 = 0.93385$; Adj: 0.89883
 3 factores, 1 Bloque, 27 corridas; MS Residual= 0.0992509
 DV: Conc. Prot.

	SS	df	MS	F	p
1 Relación(L)	19.7610889	1	19.7610889	199.102313	8.1358E-11
Relación(Q)	1.08658519	1	1.08658519	10.9478594	0.00415089
2 pH (L)	1.8818	1	1.8818	18.9600246	0.00043151
pH (Q)	0.52018519	1	0.52018519	5.24111166	0.03512555
3 Tiempo (L)	0.00435556	1	0.00435556	0.04388428	0.83655891
Tiempo (Q)	0.08322963	1	0.08322963	0.83857787	0.37261159
1L x 2L	0.3888	1	0.3888	3.91734381	0.06422082
1L x 3L	0.07053333	1	0.07053333	0.71065668	0.41093049
2L x 3L	0.02340833	1	0.02340833	0.23585002	0.63341965
Error	1.68726574	17	0.09925093		
Total SS	25.5072519	26			

Los datos de color rojo muestran influencia entre ellos.

Anexo 2: Valores de los parámetros de control del ajuste de los datos (Mayor R^2).

	Name[Y]	Value[Y]	Err[Y]	Vary[Y]	LLimit[Y]	ULimit[Y]	Depend[Y]	Conflntv[Y]
1	P1	2.95523	0.04241	Floating	2.8576	3.05723	0.62754	0.10029
2	P2	1.23624	0.37834	Floating	0.40046	2.17871	0.62754	0.89464
3		-						
4	ChiSquare	0.00495						
5	SSR	0.03468						
6	Correlation	0.99761						
7	COD(R^2)	0.99523						

Anexo 3: Valores de los parámetros de control del ajuste de los datos (Menor R²).

	Name[Y]	Value[Y]	Err[Y]	Vary[Y]	LLimit[Y]	ULimit[Y]	Depend[Y]	Conflntv[Y]
1	P1	2.58799	0.48869	Floating	1.76221	5.04303	0.88884	1.15556
2	P2	23.7081	13.12909	Floating	4.55724	99.37526	0.88884	31.04533
3		-						
4	ChiSquare	0.08446						
5	SSR	0.5912						
6	Correlation	0.9227						
7	COD(R ²)	0.85137						

Anexo 4: Prueba de significancia de Tuckey para la relación de extracción.

<i>Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes</i>			
<i>Agrupación Tuckey</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Relación de Extracción</i>
A	3.4367	9	5
B	1.9722	9	10
C	1.6544	9	15

Anexo 5: Prueba de significancia de Tuckey para el pH de extracción.

<i>Las medias con las mismas letras no son significativamente diferentes</i>			
<i>Agrupación Tuckey</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>pH de Extracción</i>
AA	2.4656	9	10
A	2.4589	9	11
B	1.8389	9	9

Anexo 6: Balance de masa del proceso.

