

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“Optimización de la extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación
isoeléctrica de proteínas contenidas en la torta desgrasada de nuez de
Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL:

AUTORES:

Bach. GARCIA GUERRERO, Lucia

Bach. VARGAS RIVERA, Stiven

ASESOR:

M.Sc. HUAMÁN CRUZ, Raúl

Puerto Maldonado, Julio del 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“Optimización de la extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación
isoeléctrica de proteínas contenidas en la torta desgrasada de nuez de
Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL:

AUTORES:

Bach. GARCIA GUERRERO, Lucia

Bach. VARGAS RIVERA, Stiven

ASESOR:

M.Sc. HUAMÁN CRUZ, Raúl

Puerto Maldonado, Julio del 2026

RST-RI_Optimización de la extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoelectrica de proteínas contenidas en la torta desgrasada de nuez de Castaña (Bertholletia excelsa H. B. K)

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Carlos Alberto Martins Cordeiro, Evaldo Martins da Silva, Norma Suely Evangelista-Barreto. "Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas - Volume 2", Editora Cientifica Digital, 2021	1%
	Publicación	
2	repositorio.unap.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
3	repositorio.unamad.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
5	Samuel S. M. Sun, Filomena W. Leung, Jody C. Tomic. "Brazil nut (Bertholletia excelsa HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987	1%
	Publicación	

Excluir citas
Excluir bibliografía

Activo
Activo

Excluir coincidencias

< 1%

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia necesarias para culminar esta importante etapa de mi formación profesional. Gracias por acompañarme en cada desafío, iluminar mi camino y permitirme alcanzar una de las metas más significativas de mi vida.

A mis padres y a mi familia, por su amor, apoyo incondicional, comprensión y constante motivación a lo largo de este camino. Gracias por creer en mí, por alentarme a seguir adelante en los momentos difíciles y por compartir conmigo cada esfuerzo y logro alcanzado. Asimismo, dedico este trabajo a todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron a mi crecimiento personal y profesional. Con profundo cariño y gratitud, les dedico este trabajo.

Lucia Garcia Guerrero

A Dios, por bendecirme con salud, fortaleza y determinación para superar cada obstáculo y permitirme culminar satisfactoriamente esta importante etapa académica. Su guía y protección fueron fundamentales para mantenerme firme en la búsqueda de mis metas y sueños.

A mis seres queridos, especialmente a mi familia, por su apoyo incondicional, paciencia y confianza durante todo este proceso. Gracias por acompañarme en cada paso, brindarme ánimo en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada avance alcanzado. También dedico este trabajo a todas las personas que aportaron con sus enseñanzas, consejos y motivación para hacer posible este logro. Con afecto y sincero agradecimiento, les dedico este esfuerzo.

Stiven Vargas Rivera

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento a Dios por brindarnos la fortaleza, la salud y la perseverancia necesarias para culminar satisfactoriamente esta investigación.

Asimismo, expresamos nuestra profunda gratitud al profesor Jesús Manuel Arizaca Flores, por su orientación y valioso apoyo durante el desarrollo de este trabajo. De igual manera, agradecemos a nuestro asesor de tesis por compartir generosamente sus conocimientos, experiencia y dedicación, así como por su constante acompañamiento y compromiso en cada etapa de la investigación.

Agradecemos también a los docentes de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, quienes a lo largo de nuestra formación académica contribuyeron significativamente a nuestro crecimiento profesional mediante sus enseñanzas, consejos y experiencias compartidas, las cuales fueron fundamentales para la realización de esta tesis.

De igual forma, expresamos nuestro reconocimiento a los miembros del jurado calificador por el tiempo dedicado a la revisión y evaluación de la presente investigación, así como por sus valiosas observaciones y recomendaciones, que permitieron fortalecer y mejorar la calidad de este trabajo.

Finalmente, agradecemos a nuestras familias, compañeros y a todas aquellas personas que, de una u otra manera, nos brindaron su apoyo, confianza y motivación durante este proceso, haciendo posible la culminación de esta importante etapa académica y profesional.

PRESENTACIÓN

La presente investigación, se realizó con torta de nuez de castaña desgrasada (TDC) mediante prensado hidráulico en la planta piloto de frutas y hortalizas de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, la torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) desgrasada es utilizada en la actualidad para la alimentación animal. Además, se sabe que la “torta” es rica en componentes bioactivos, especialmente compuestos fenólicos, tocoferoles, minerales y proteínas. Sin embargo, se tiene poca información científica respecto al aprovechamiento de la torta desgrasada de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), para la producción de concentrados o aislados de proteína (APC), insumo nutracéutico de importancia en diversidad de alimentos funcionales.

Es así, que se vio la necesidad de plantear la siguiente investigación, “Optimización de la extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoelectrica de proteínas contenidas en la torta desgrasada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)”, se obtuvieron datos importantes y relevantes, como, la evaluación de las condiciones operativas óptimas para la extracción alcalina asistida por ultrasonido(EAAU) (Solución de pH, Relación masa muestra : masa solución, tiempo de sonicación, temperatura de extracción) y la posterior precipitación isoelectrica, para garantizar el rendimiento y las propiedades funcionales del aislado proteico de la torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (APC).

El trabajo de investigación consta de cuatro capítulos, estructurados de la siguiente manera: Capítulo I: problema de investigación, se consigna la descripción de los problemas, los objetivos, las variables, las hipótesis y justificación. Capítulo II: marco teórico, donde se consignan todos los antecedentes de la investigación y la revisión bibliográfica de los conceptos más relevantes del estudio. Capítulo III: materiales y métodos, donde se muestra las generalidades de la investigación, materiales y equipos utilizados, así mismo, se describen las metodologías utilizadas para llevar a cabo la investigación. Capítulo IV: resultados del trabajo de investigación, donde se muestra los resultados obtenidos y su comparación con otros estudios

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de proteína de alta calidad ha incentivado la búsqueda de fuentes alternativas en los subproductos agroindustriales y el interés en la optimización de métodos amigables con el medio ambiente en la extracción y purificación de proteínas de origen vegetal. En este contexto, la torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC), subproducto de la extracción de aceite de esta nuez, se posiciona como una fuente potencialmente valiosa de proteínas. Sin embargo, es fundamental desarrollar técnicas eficientes que maximicen simultáneamente el rendimiento y las propiedades funcionales de las proteínas extraídas.

La extracción alcalina asistida por ultrasonido (EAAU) ha demostrado ser una metodología prometedora para mejorar la eficiencia de la extracción de proteínas, ya que combina las ventajas solubilización de proteínas en medio alcalino con los efectos mecánicos de cavitación ultrasónica, facilitando la ruptura celular en la matriz de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)” y la extracción sólida – líquido de las proteínas. Además, la precipitación isoelectrica es un método efectivo para purificar las proteínas solubilizadas en medio acuoso al modificar el pH del medio, que permite la separación de proteínas en función de su punto isoelectrico, que mejora las propiedades funcionales del producto final.

El problema central de este proyecto de tesis es determinar cuál es la condición operativa óptima para la extracción alcalina asistida por ultrasonido (EAAU) y la posterior precipitación isoelectrica que maximice simultáneamente las propiedades funcionales y rendimiento de la proteína extraída de la torta desgrasada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC)”. A pesar del potencial prometedor, la optimización de estos procesos aún presenta desafíos significativos debido a la complejidad de los factores involucrados, como el pH de la solución, el tiempo de sonicación, la temperatura de extracción y la proporción entre la masa de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) desgrasada y el volumen del solvente.

Para abordar estos desafíos, este proyecto de tesis se propone optimizar las condiciones operativas para la extracción alcalina asistida por ultrasonido y la precipitación isoelectrica (EAAU-PI) de proteínas contenidas en la torta desgrasada de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC). Los objetivos específicos incluyen establecer la relación cuantitativa entre las condiciones de operación y el rendimiento y concentración de proteínas, determinar el punto de precipitación isoelectrica de las proteínas de la harina, analizar el impacto de diversos factores de extracción sobre el rendimiento y propiedades funcionales de las proteínas y, finalmente, identificar las condiciones operativas óptimas para maximizar estos parámetros.

El éxito en la optimización de estos procesos no solo ayudo a mejorar las propiedades funcionales y el rendimiento de las proteínas extraídas, sino que también contribuye al desarrollo de aplicaciones industriales y alimentarias que valoren los subproductos de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), promoviendo una utilización más eficiente y sostenible de los recursos agroindustriales.

ÍNDICE GENERAL

Pag.

DEDICATORIA.....	
AGRADECIMIENTOS.....	
PRESENTACIÓN.....	
INTRODUCCIÓN.....	
CAPÍTULO 1: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivos específicos.....	4
1.4 Variables.....	4
1.5 Operacionalización de variables.....	5
1.6 Hipótesis.....	5
1.7 Justificación.....	5
1.8 Consideraciones éticas.....	8
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes de estudio.....	9
2.2 Marco teórico.....	15
2.2.1 Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).....	15
2.2.2 Las proteínas.....	19
2.2.3 Extracción alcalina y precipitación isoelectrica.....	24
2.2.4 Extracción de proteína asistido por ultrasonido.....	28
2.2.5 Optimización de procesos mediante Metodología de Superficie de Respuesta.....	32
2.3 Definición de términos.....	33

CAPÍTULO III: METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN.....	36
3.1 Tipo de estudio.....	36
3.2 Diseño del estudio.....	36
3.3 Población y muestra.....	37
3.3.1 Población.....	37
3.3.2 Muestras.....	37
3.4 Métodos y técnicas.....	38
3.4.1 Materiales y equipos.....	38
3.4.2 Reactivos.....	39
3.4.3 Desarrollo experimental.....	40
3.4.4 Métodos o procedimientos para utilizar.....	42
3.5 Tratamiento de los datos.....	47
CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN....	55
4.1 Aspectos generales.....	55
4.1.1 Procedencia de la muestra.....	55
4.1.2 Pre-tratamiento de la nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>) previo al desgrasado.....	55
4.1.3 Desgrasado mediante presado hidráulico en frío de la nuez de Castaña.....	56
4.1.4 Desgrasado de la harina por el método soxhlet.....	56
4.2 Caracterización proximal de la harina desgrasada de la nuez de castaña.....	57
4.3 Curva de calibración para análisis de proteína por método Lowry...	58
4.4 Determinación del punto de precipitación isoelectrica de las proteínas de la harina de torta desgrasada de la nuez de castaña.....	60

4.5	Extracción alcalina de proteína de la torta desgrasada de castaña por ultrasonido y precipitación isoelectrica.....	62
4.5.1	Rendimiento y eficiencia de extracción.....	67
4.5.2	Capacidad y estabilidad emulsificante de la proteína obtenida.....	72
4.5.3	Capacidad de absorción de agua y aceite por la proteína.....	81
4.6	Optimización	94
4.7	Análisis fisicoquímico de la proteína aislada de torta de nuez de castaña (Bertholletia excelsa H. B. K.).....	101
	CONCLUSIONES	103
	SUGERENCIAS	105
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXOS	119
Anexo 1.	Matriz de operacionalización de las variables.....	
Anexo 2.	Matriz de consistencia.....	
Anexo 4.	Molienda y extracción del aceite por prensado hidráulico.....	
Anexo 5.	Extracción de aceite por método Soxhlet.....	
Anexo 6.	Extracción alcalina asistido por ultrasonido.....	
Anexo 7.	Separación de fases por centrifugado.....	
Anexo 8.	Precipitación isoelectrica y obtención del APC.....	
Anexo 9.	Determinación de concentración de proteína.....	
Anexo 10.	Determinación del punto isoelectrico de la torta desgrasada de Castaña (Bertholletia excelsa).....	
Anexo 11.	capacidad de absorción de agua y aceite.....	
Anexo 12.	Propiedades de emulsificante.....	

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

TABLA 1:	VARIABLES DE ESTUDIO	4
TABLA 2:	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	5
TABLA 3:	COMPOSICIÓN APROXIMADA DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>) POR DIFERENTES AUTORES	17
TABLA 4:	PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LOS ACEITES CRUDOS DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>), SEGÚN DIFERENTES AUTORES	18
TABLA 5:	COMPOSICIÓN MINERAL DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i> H. B. K.), (EN BASE SECA Y DESGRASADA)	18
TABLA 6:	COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS PROTEÍNAS DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i> H. B. K.) (G AA/100 G PROTEÍNA).....	23
TABLA 7:	METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS PROXIMAL.....	43
TABLA 8:	VARIABLES INDEPENDIENTES Y NIVELES	50
TABLA 9:	MATRIZ DE RESPUESTAS	50
TABLA 10:	MATRIZ DE DISEÑO PARA LA EXTRACCIÓN ALCALINA ASISTIDO POR ULTRASONIDO	51
TABLA 11:	PLAN EXPERIMENTAL PARA LA PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA.....	52
TABLA 12:	ANÁLISIS ANOVA.....	53
TABLA 13:	DATOS DEL DESGRASADO DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).	56
TABLA 14:	DESGRASADO DE LA HARINA DE NUEZ DE CASTAÑA POR MÉTODO SOXHLET	57
TABLA 15:	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA TORTA DESGRASADA DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i> H. B. K.).....	57
TABLA 16:	CURVA DE CALIBRACIÓN	58

TABLA 17: VALORES ESTADÍSTICOS PARA LA CURVA PATRÓN DE DE PROTEÍNA DE ALBÚMINA BOVINA (MG/ML) Y LA ABSORBANCIA (%) A 500 NM.	59
TABLA 18: DATOS EXPERIMENTALES DE PI AJUSTADO A DIFERENTES MODELOS ESTADÍSTICOS.	61
TABLA 19: RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES	64
TABLA 20: DATOS ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE LOS RESULTADOS.....	65
TABLA 21: PRUEBA DE NORMALIDAD DE LAS VARIABLES RESPUESTA (TEST DE SHAPIRO-WILK)	66
TABLA 22: ANOVA PARA EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	68
TABLA 23: VALORES ESTADÍSTICOS DEL RENDIMIENTO Y EFICIENCIA.	69
TABLA 24: ANOVA PARA LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (CE, %).....	73
TABLA 25: MÉTRICAS DE BONDAD DEL AJUSTE DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS	75
TABLA 26: ANOVA PARA LA ESTABILIDAD EMULSIFICANTE DE LA PROTEÍNA OBTENIDA DE LA TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).....	77
TABLA 27: ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES PARA LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).	80
TABLA 28: TABLA ANÁLISIS DE NORMALIDAD.....	80
TABLA 29: ANOVA PARA LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA POR LA PROTEÍNA OBTENIDA DE LA TORTA DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>). 84	
TABLA 30: DATOS ESTADÍSTICOS DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA	85
TABLA 31: ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES.....	86
TABLA 32: ANÁLISIS DE NORMALIDAD DEL RESIDUAL DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA	87
TABLA 33: ANOVA PARA LA CAAC POR LA PROTEÍNA OBTENIDA DE LA TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).....	88
TABLA 34: DATOS ESTADÍSTICOS DE ABSORCIÓN DE ACEITE.	90

TABLA 35:	ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES PARA LA CAAC	91
TABLA 36:	ANÁLISIS DE NORMALIDAD DE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE	91
TABLA 37:	RESTRICCIONES CONSIDERADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN	96
TABLA 38:	RESULTADO DE LA OPTIMIZACIÓN	98
TABLA 39:	VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES OPERATIVAS ÓPTIMAS	99
TABLA 40:	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA PROTEÍNA AISLADA OBTENIDA	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

FIGURA 1. ÁRBOL, FLORES, FRUTO ABIERTO Y PLANTA DE CASTAÑA AMAZÓNICA (BERTHOLLETIA EXCELSA)	16
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 2S, 7S Y 11S	21
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL CRISTAL ALERGENO BER E2 Y 2S ALBUMINA BER E1 EN LA NUEZ DE CASTAÑA DE <i>B. EXCELSA</i>	22
FIGURA 4. VARIACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PROTEÍNAS CON EL PH SOLUCIÓN (UTILIZANDO SOFTWARE CAMSOLPH).....	27
FIGURA 5. DIAGRAMA QUE EJEMPLIFICA EL PRINCIPIO DE PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA DE PROTEÍNAS.....	28
FIGURA 6. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UN SISTEMA DE BAÑO ULTRASÓNICO ...	29
FIGURA 7. ULTRASONIDO. BAJAS FRECUENCIAS (20-100 KHZ) Y ALTAS FRECUENCIAS (>100 KHZ)	29
FIGURA 8. COMPARACIÓN DE MICROESTRUCTURA DE TORTA EXTRAÍDA POR PROCESO CONVENCIONAL Y ASISTIDO POR ULTRASONIDO EN EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.	30
FIGURA 9. PRINCIPALES EFECTOS DE ULTRASONICACIÓN EN LAS PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS VEGETALES	31
FIGURA 10. DIAGRAMA DE BLOQUES DEL DISEÑO DE ESTUDIO.....	36
FIGURA 11. VISTA FOTOGRÁFICA UBICACIÓN MANUTATA, (12°33'31.1"S 69°09'40.2"W GOOGLE EARTH, 2025).....	37
FIGURA 12. DIAGRAMA DE BLOQUES DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE LA TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i> H. B. K.) POR ULTRASONIDO	40
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE EXTRACCIÓN ALCALINA ASISTIDO POR ULTRASONIDO SEGUIDO DE PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA DE HARINA DE TORTA DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>) DESGRASADA.....	46
FIGURA 14. DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA METODOLOGÍA DE ESTUDIOS CON DCC	49

FIGURA 15. CURVA PATRÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE ALBÚMINA BOVINA (MG/ML) Y LA ABSORBANCIA (%) A 500 NM.	59
FIGURA 16. CURVA DE PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA DE LA PROTEÍNA DE TORTA DE B. EXCELSA.....	62
FIGURA 17. VARIACIÓN DE Z1, Z3 Y Z4 CON EL RENDIMIENTO GLOBAL DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍAN DE LA TORTA DE B. EXCELSA	65
FIGURA 18. A) NORMAL VS RESIDUAL Y B) PREDICHO VS ACTUAL	70
FIGURA 19. REPRESENTACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL RENDIMIENTO COMO FUNCIÓN DE Z1, Z2, Z3 Y Z4	71
FIGURA 20. A) Y B) VARIACIÓN DE Z1, Z2 Y Z3 CON LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (CE, %); C) Y D) VARIACIÓN DE Z1, Z2 Y Z3 CON LA ESTABILIDAD EMULSIFICANTE (EE, %) DE LA PROTEINA OBTENIDA DE LA TORTA DE B. EXCELSA.	72
FIGURA 21. COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (CE, %) FUNCIÓN DE Z1, Z2, Z3 Y Z4	76
FIGURA 22. COMPORTAMIENTO DE LA EE DE LA PROTEÍNA DE LA TORTA DESGRASADA DE B. EXCELSA COMO FUNCIÓN DE Z1, Z2, Z3 Y Z4	78
FIGURA 23. A) NORMAL VS RESIDUAL Y B) PREDICHO VS ACTUAL PARA LA EE DE LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA DESGRASADA	79
FIGURA 24. A) NORMAL VS RESIDUAL Y B) PREDICHO VS ACTUAL, PARA LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA.....	79
FIGURA 25. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE LOS RESIDUALES PARA A) CAPACIDAD EMULSIFICANTE Y B) ESTABILIDAD EMULSIFICANTE DE LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).....	81
FIGURA 26. A) Y B) VARIACIÓN DE Z1, Z2 Y Z3 CON LA CAAG (G AGUA/G APC); C) Y D) VARIACIÓN DE Z1, Z2 Y Z4 CON LA CAAC (G ACEITE/G APC)	82
FIGURA 27. A) NORMAL VS RESIDUAL Y B) PREDICHO VS ACTUAL PARA LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA POR LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>) DESGRASADA.	86
FIGURA 28. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE LOS RESIDUALES DE LA CAAG.....	86
FIGURA 29. COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA (G AGUA/G PROTEÍNA AISLADA DE CASTAÑA) COMO FUNCIONES DE Z1, Z2, Z3 Y Z4. ..	87

FIGURA 30. A) NORMAL VS RESIDUAL Y B) PREDICHO VS ACTUAL PARA LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE POR LA PROTEÍNA DE TORTA DE NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>) DESGRASADA.	91
FIGURA 31. DISTRIBUCIÓN DE LA NORMALIDAD DEL RESIDUAL DE LA CAAA.	92
FIGURA 32. COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE (G ACEITE/G PROTEÍNA AISLADA DE LA NUEZ DE CASTAÑA (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>)) COMO FUNCIONES DE Z1, Z2, Z3 Y Z4.	92
FIGURA 33. IDENTIFICACIÓN GRÁFICA DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.....	97

CAPÍTULO 1: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción del problema

El árbol de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), comúnmente conocida como árbol de nuez de Brasil, especie nativa que se encuentra en concentraciones significativas en Brasil, Bolivia y Perú, donde crece en rodales naturales (Ibiapina et al. 2022). Del árbol de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), se colectan los cocos de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), que son procesados para producir nueces peladas para exportación, actividad comercial de importancia en Madre de Dios. Durante el proceso productivo, se generan subproductos denominados nueces quebrado (broken), destinados a la agroindustria local, para la producción de aceite de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) mediante prensado hidráulico o por expeller; de esta actividad, se generan residuos sólidos denominados “torta desgrasada de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC)”, utilizada para alimentación animal previo acondicionamiento. Por otro lado, se sabe que la “torta” es rico en componentes bioactivos, especialmente compuestos fenólicos (Gomes y Torres 2016), tocoferoles, minerales (especialmente selenio) y proteínas (Gomes y Torres 2016; Santos et al. 2013). No obstante, se tiene escasa información científica respecto al aprovechamiento de la TDC, para la producción de concentrados o aislados de proteína (APC), insumo nutraceútico de importancia en diversidad de alimentos funcionales.

La extracción alcalina-precipitación isoelectrónica (EA-PI) es uno de los métodos convencionales más utilizados para extraer proteínas de fuentes vegetales (Gençdağ, Görgüç y Yılmaz 2021), sin embargo, debido al tiempo prolongado de extracción, las proteínas son susceptibles a desnaturalización, cambiando

las estabilidad de las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias, así como las posibles reacciones secundarias adversas y potencial toxicidad, que pueden conducir a agregación, solidificación, reducción de la solubilidad y pérdida de propiedades funcionales de las proteínas, como la gelificación y emulsificación (Helikh, Gao y Duan 2020). Por otro lado, los procesos asistidos por ultrasonido utilizan la cavitación acústica para alterar las células y tejidos vegetales y mejorar la transferencia de masa durante el proceso de extracción (Chemat et al. 2020;Gao, Rao y Chen 2024), sumadas a ellas su fácil manejo y seguridad, porque se realiza a presión atmosférica y temperatura ambiente, uso de cantidades adecuadas de solvente y requiere un tiempo de procesamiento relativamente corto. Se reportan que, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) de proteínas aumentan significativamente el rendimiento (Ding et al. 2021;Sun et al. 2020;Preece et al. 2017), sin embargo, una alta potencia y un tiempo prolongado de sonicación pueden reducir la capacidad de emulsificación y formación de espuma (Jahan et al. 2022). Cuestionamientos que se deben de seguir estudiando por la singularidad de la interacción de las propiedades estructurales y funcionales de la matriz vegetal (MV), así como las relaciones termodinámicas, cinéticas y de transferencia de masa con los solventes a diferentes condiciones operativas, considerándose como un proceso complejo (Gao, Rao y Chen 2024; Jia-Tih y Shukao 1990; Wrabl, Larson y Hilser 2002), como es el caso de la nuez de castaña, cuyo estudio aún no fue tratado.

La nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), está principalmente conformado por tres clases de proteínas: 11S, 7S y 2S (Ariane et al. 2015; Jayasinghe y Caruso 2011; AMPE et al. 1986), teniendo altas concentraciones de glutamina/ácido glutámico y arginina, particularmente la proteína 2S que contiene cantidades excepcionalmente grandes de aminoácidos azufrados, 17,9% Met y 8,7% Cys Por otro lado, la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) es rica en selenio y contiene alrededor de 126 ppm de Se, las cuales están unidos mediante enlace covalente a dos aminoácidos para formar selenometionina y selenocistina (Chunhieng et al. 2004). Se reporta que, los principales alérgenos en las nueces de Brasil son las proteínas albúmina 2S y globulina 12S, que pueden desencadenar respuestas alérgicas graves en

personas sensibilizadas (Van Bilsen et al. 2013; Ariane y Vildes 2015). Los procesos de extracción asistido por microondas y ultrasonido han mostrado la disminución de alergenicidad en aislado de proteína de soja debido a la alteración de la estructura secundaria de las proteínas (Sengar et al. 2022), observación que abre oportunidades para el aprovechamiento de las bondades de la Nuez Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) utilizando procesos emergentes.

Las propiedades físico-químicas, tecno-funcionales y bio-funcionales de las proteínas extraídas por ultrasonido (PE-AUS) y EA-PI están estrechamente relacionadas con las condiciones operativas, especialmente el pH de la solución, tiempo y potencia de sonicación, temperatura de extracción y tamaño de partícula de la MV, así un pH y una temperatura de solución altos y un tiempo de extracción prolongado dan como resultado un mayor rendimiento de proteína, pero provocan la formación de más enlaces disulfuro intermoleculares, razón de una inadecuada funcionalidad de la PA (Yao et al. 2023). Establecer un equilibrio entre las propiedades funcionales y rendimiento en proteína aislada de la TDC, fijando las condiciones operativas de la EP-AUS mediante optimización multiobjetivo como aporte al conocimiento absolverá cuestionamientos aun no profundizados en la literatura científica, que fueron abordados en la tesis.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es la condición operativa óptima de extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica que maximice las propiedades funcionales y rendimiento de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)?

1.3 Objetivos

Determinar la condición operativa óptima de extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica que maximice las propiedades funcionales y rendimiento de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K).

1.3.1 Objetivos específicos

1. Establecer la relación cuantitativa entre las condiciones de operación de extracción alcalina asistido por ultrasonido con el rendimiento y concentración de proteína extraída;
2. Determinar el punto de precipitación isoeléctrica de las proteínas de la harina de torta desgrasada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC);
3. Analizar cómo los factores de extracción (pH de la solución, tiempo de sonicación, temperatura de extracción y proporción de masa de harina de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) desgrasada respecto al volumen del solvente) afectan el rendimiento, contenido de proteína, solubilidad y actividad emulsificante de la proteína extraída de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*); y
4. Determinar las condiciones operativas óptimas para la extracción asistida por ultrasonido que maximicen el rendimiento, solubilidad y actividad emulsificante de la proteína extraída de la torta desgrasada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*).

1.4 Variables

Tabla 1: Variables de estudio

VARIABLES INDEPENDIENTES:
• Condiciones operativas de extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>)
VARIABLES DEPENDIENTES:
• Rendimiento y propiedades funcionales de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>)

1.5 Operacionalización de variables

Tabla 2: Operacionalización de variables

TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	INDICES
VARIABLES INDEPENDIENTES	Proporción masa muestra: volumen solución (1: ; g: mL)	10; 20; 30; 40; 50
	pH solución	9; 10; 11; 12; 13
	Temperatura del proceso (°C)	45; 50; 55; 60; 65
	Tiempo (min)	30; 60; 90; 120; 150
VARIABLES DEPENDIENTES	Concentración de proteína	%
	Capacidad de absorción de agua y aceite	g/g
	Capacidad y estabilidad emulsificante	%
	Rendimiento global en proteína aislada de <i>B. excelsa</i>	%

1.6 Hipótesis

La extracción alcalina asistida por ultrasonido (EAAU) en condiciones óptimas de proporción de masa, pH, temperatura y tiempo, seguida de precipitación isoeléctrica, maximiza el rendimiento y mejora las propiedades funcionales (solubilidad y actividad emulsificante) de las proteínas extraídas de la torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), haciéndolas aptas para aplicaciones alimentarias.

1.7 Justificación

La actividad comercial de la región de Madre de Dios está relacionada con la minería formal e informal (Caballero Espejo et al. 2018; Swenson et al. 2011), así mismo, se considera que la segunda actividad económica de importancia es la cosecha y agroindustria de la Nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seguida de la producción de madera (MINCETUR 2023; Willem, Ingram y Guariguata 2019). De esta manera, la oferta exportable de MDD está

integrada por: oro (76% del total), castañas (18%) y productos maderables (6%: perfilados y aserrados); cabe resaltar que, la agroexportación de la región en el primer semestre de 2023 cayó 21% como resultado de la menor venta de nueces de castañas (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (-20%), afectado por un menor precio (-33%). Este producto se destina a Corea del Sur (30%), Unión Europea (27%), EEUU (20%) y otros. Los volúmenes de exportación de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) pelada según MINCETUR 2023, en los años 2020, 2021 y 2022 fueron de 4976, 4122 y 4295 toneladas respectivamente. Considerando que en el proceso de pelado de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) se producen un 5 % de cáscara y 10 % de subproductos como nueces de recorte y rotos (broken) entonces, para la exportación de los volúmenes indicados fueron necesarios 6220, 5152 y 5369 toneladas de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) con cáscara, y se produjeron 933, 773 y 805 toneladas de nuez tipo broken (4, 5, 6, y 7, con tamaños de 0,1 a 2,4 cm). Esta cantidad de subproducto está destinado en gran parte a la producción de aceite de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) y uso en la confitería y pastelería local y nacional. Considerando que el contenido de grasa es de 60 a 65 g/100 g, se generan de 269 a 373 toneladas de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)(TDC) con 1 a 5 % de grasa, según los métodos de extracción de aceite. Esta cantidad de torta está destinada principalmente como insumo para alimentación de animales (alimento balanceado) o simplemente como desecho. Por tanto, podemos observar que se tiene una gran oportunidad de aprovechamiento agroindustrial a través de procesos de recuperación de la proteína contenida en la torta de castaña, objetivo del trabajo de tesis propuesto.

La nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) es considerada como superalimento (Moreda-Piñeiro et al. 2020), por ser una fuente rica en grasa, proteína, vitamina y minerales, exhibe una combinación de propiedades nutricionales, funcionales y bioactivas, con diversidad de aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y nutraceútica (Ariane et al. 2015a); Bisht, Singh y Kaldate 2021). Las proteínas de fuentes vegetales se clasifican en diferentes familias según sus propiedades bioquímicas y estructurales, así en la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), se ha identificado

principalmente la albúmina 2S destacada por su riqueza en glutamina, ácido glutámico, arginina y los aminoácidos azufrados cisteína y metionina (AMPE et al. 1986), así mismo, se presentan 7S y 11S como proteínas de almacenamiento de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (Sharma et al. 2010). El contenido de proteína en la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) varía de 13 a 15 % y selenio en promedio 290,5 µg/g, constituyendo una fuente rica en selenoproteína (Jayasinghe y Caruso 2011; Lima et al. 2019). Se considera al selenio como un oligoelemento esencial para la salud, que, al ser absorbido por el hígado, realiza diversas funciones fisiológicas con actividad redox y antiinflamatorias, así como la estimulación de la activación de las células del sistema inmunológico y el mantenimiento de la función cerebral y enfermedades cardiovasculares (Zhang, Li y Wei 2023). A la fecha se tiene limitada información sobre aislamiento de proteínas por procesos de extracción alcalina y precipitación isoeléctrica (EA-PI), considerándose oportuno abordar estudios para la comprensión del proceso de aislamiento y escalamiento para el aprovechamiento de la torta proveniente de la extracción de aceite de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K).

Según la base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas SCOPUS, con los términos “protein extraction *bertholletia excelsa* nuts” se tiene 11 documentos relacionados, con publicaciones iniciados en el año 1998 a la fecha, apreciándose que no se tiene un trabajo de aislamiento de proteína de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), por extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, sino publicaciones referentes a la identificación de los micronutrientes y componentes bioactivos en la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) así como el manejo agroforestal y su relación con el medio ambiente (SCOPUS 2024). Los países que más publicaron en este tema fueron Brasil con 17 publicaciones, Estados Unidos, Japón, México y Reyno Unido. Según esta referencia, nuestro país aún no tiene publicación alguna referido al tema propuesto, por lo que es propicio abordarlo y llegar a publicar como contribución al acervo del conocimiento mundial, objetivo del trabajo de tesis planteado.

1.8 Consideraciones éticas

La realización de esta investigación se adhirió a los más altos estándares éticos, asegurando la responsabilidad y el respeto en todas sus fases. Dado que el estudio se enfoca en el aprovechamiento de un subproducto agroindustrial (torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K)) y no involucra directamente a seres humanos o animales para pruebas de consumo o experimentación invasiva, las consideraciones éticas primordiales giraron en torno a la integridad científica, la transparencia y el impacto ambiental.

En primer lugar, se garantizó la integridad de los datos y la rigurosidad metodológica en la recolección, análisis e interpretación de los resultados. Toda la información presentada, incluyendo las fuentes bibliográficas, fue citada de manera precisa y veraz, evitando cualquier forma de plagio o manipulación de datos. Los procedimientos experimentales fueron diseñados para ser replicables y sus resultados verificables, contribuyendo así a la credibilidad del conocimiento generado.

En segundo lugar, la investigación consideró el impacto socioeconómico y ambiental de las actividades relacionadas con la cadena de valor de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) en Madre de Dios. Al proponer la valorización de un subproducto que de otra manera sería desecho, el estudio se alinea con principios de sostenibilidad y bioeconomía circular. La búsqueda de métodos eficientes para la extracción de proteína busca no solo un beneficio económico, sino también una reducción del desperdicio y una optimización de los recursos naturales.

Finalmente, se actuó con transparencia en la difusión de los hallazgos. Los resultados de esta tesis se buscarán publicar para que contribuyan al conocimiento público, especialmente en un área donde la producción científica peruana es limitada. Esto permitirá que la información sea accesible para la comunidad académica, la industria local y otros actores interesados en el desarrollo sostenible de la región.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

Se tiene muy escasa información científica de la extracción alcalina por ultrasonidos y la precipitación isoelectrica (EAAU-PI) para extraer proteína de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa H.B.K*), por consiguiente, se hizo referencia a la caracterización de las proteínas de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa H. B. K*) y los procesos de aislamiento de proteínas contenidas en fuentes vegetales, siendo éstas:

Sun et al. (2023), en el libro de “Green Protein Processing Technologies from Plants” plantea como objetivo presentar y analizar métodos novedosos para la extracción y purificación de proteínas de plantas, con el fin de impulsar el desarrollo de productos basados en proteínas vegetales. los autores consideran como variables a las proteínas vegetales (su extracción y purificación), tecnologías de procesamiento (tecnologías innovadoras para la extracción, purificación, concentración y fraccionamiento de proteínas vegetales) y al desarrollo de productos (aplicaciones de las proteínas vegetales en la creación de productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y otros) el libro como resultado menciona que el ultrasonido es una técnica prometedora respecto a los métodos tradicionales, conduciendo a mejorar el rendimiento de extracción y las propiedades funcionales de las proteínas de origen vegetal, pero los impactos específicos dependen de la fuente de proteína y las condiciones de procesamiento, por tanto, se requiere una optimización cuidadosa de las condiciones operativas para lograr los efectos deseados en las propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales de la proteína aislada. Esto debido a los efectos de cavitación del ultrasonido que alteran las paredes celulares y mejoran la transferencia de masa. El libro

concluye que las tecnologías de procesamiento de proteínas vegetales están avanzando rápidamente, lo que abre nuevas posibilidades para el desarrollo de productos sostenibles y de alta calidad. Se destaca la importancia de la investigación y la innovación para optimizar los procesos de extracción y purificación, así como para explorar nuevas aplicaciones de las proteínas vegetales;

Sengar et al. (2022), en el artículo "Aplicación de ultrasonidos de potencia para la extracción, modificación y reducción de alérgenos de proteínas vegetales: una revisión" analizaron la reducción de alérgenos en proteínas vegetales extraídos con ultrasonido, con el objetivo de evaluar cómo los ultrasonidos de potencia mejoran la eficiencia de extracción y las propiedades funcionales de las proteínas vegetales. Con variables independientes: los parámetros del tratamiento con ultrasonido de potencia; y variables dependientes: las propiedades funcionales de las proteínas vegetales. En el artículo se destaca que los procesos EAU, pueden modificar la estructura secundaria de las proteínas, lo que mejora las propiedades tecnofuncionales como la solubilidad, la emulsificación y la estabilidad térmica, así como una reducción de alérgenos de las proteínas vegetales en comparación con los métodos convencionales, para el cual debe requerirse la optimización de los parámetros de ultrasonido como la amplitud, la relación soluto-disolvente y el pH con el fin de disminuir la capacidad de unión a Inmunoglobulina E (IgE) de ciertos alérgenos de proteínas vegetales, haciéndolos potencialmente menos alergénicos. Como resultado este indica que la EAU mejoran significativamente el rendimiento de la extracción y modifican las propiedades funcionales de las proteínas vegetales así mismo el tratamiento con ultrasonidos mejora la solubilidad, la emulsificación y la estabilidad térmica de las proteínas. En conclusión, la extracción asistida por ultrasonido es una tecnología prometedora para mejorar la extracción y modificación de las proteínas vegetales, haciéndolas más adecuadas para diversas aplicaciones alimentarias.

Wang et al. (2020), en su investigación "Un método eficaz de extracción de proteína de guisante asistido por ultrasonidos y su efecto sobre las

propiedades funcionales de la proteína y las actividades biológicas”. Elaborado con el objetivo de desarrollar un método de extracción alcalina asistida por ultrasonidos para lograr altos niveles de extracción de aislado de proteína de guisante (PPI), Optimizar los parámetros de extracción utilizando la metodología de superficie de respuesta. Y evaluar los efectos del tratamiento con ultrasonidos sobre las propiedades funcionales y las actividades biológicas de la proteína de guisante extraída. Las variables tomadas para este estudio fueron cuatro: relación solida/ liquido, pH, amplitud ultrasónica y el tiempo ultrasónico. El estudio muestra que la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método eficiente y respetuoso con el medio ambiente para obtener proteína de guisante de alta calidad con propiedades funcionales mejoradas en comparación con las técnicas de extracción convencionales, optimizando parámetros de los EAU como la amplitud (25-75%), la relación soluto-disolvente (1:10-1:30) y el pH (9-13) para maximizar el rendimiento de proteínas. Las condiciones óptimas determinadas fueron 75% de amplitud, proporción 1:20 y pH 11, lo que produjo un 39,12% de extracción de proteínas. El proceso EAU dio como resultado un rendimiento de extracción de proteínas aproximadamente un 150 % mayor en comparación con los métodos de extracción convencionales. Por otro lado, las propiedades funcionales de la proteína extraída mostraron una alta solubilidad, una buena capacidad de retención de agua y aceite y propiedades emulsionantes mejoradas en comparación con la proteína extraída convencionalmente. El estudio concluyo que la extracción alcalina asistida por ultrasonidos es un método eficiente para extraer proteína de guisante con mayores rendimientos y propiedades funcionales mejoradas en comparación con los métodos tradicionales;

Aguilar-Acosta et al. (2020), en el artículo científico de “Efecto de la aplicación de ultrasonidos en el rendimiento proteico y el destino de los alcaloides durante el proceso de extracción alcalina del lupino” se tuvo como objetivo la evaluación del efecto de la aplicación de ultrasonido sobre el rendimiento de proteínas de lupino y la reducción de alcaloides de quinolizidina (QA) durante el proceso de extracción. Las variables tomadas fueron: las especies de Lupino (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. mutabilis*) como variable independiente y

como variables dependientes se tomó: el rendimiento proteico, composición nutricional, concentración total de alcaloides y las propiedades funcionales. Los resultados sugieren que la extracción alcalina asistida por ultrasonidos puede ser un método beneficioso para obtener proteína de lupino de alta calidad con un contenido reducido de alcaloides y propiedades funcionales mejoradas. Este proceso podría resultar útil en el diseño de futuros procesos de extracción de proteínas para satisfacer la creciente demanda de alimentos ricos en proteínas. En conclusión, el tratamiento con ultrasonido puede mejorar la eficiencia de la extracción de proteínas y el perfil nutricional de las proteínas contenidas en las diferentes variedades de Lupino, así mismo se demostró que las diferentes especies de lupino presentan características distintivas que pueden influir en su idoneidad para diversas aplicaciones alimentarias;

Gomes y Torres (2016), en su investigación “Extracción optimizada de compuestos antioxidantes polifenólicos de torta de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y evaluación del perfil de polifenoles por HPLC” optimizaron las condiciones de extracción de antioxidantes polifenólicos de la torta y la cáscara de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), utilizando extracción líquida presurizada (ELP) y extracción asistida por ultrasonido (EAU) utilizando como disolventes agua/alcohol (etanol y metanol) con 0-50 % V/V a temperaturas de 50-200 °C en PLE y 50 °C en EAU. Con ELP a 200°C y 50% v/v de agua/Etanol (EtOH). Las variables tomadas para el estudio incluyeron: las condiciones de extracción (temperatura, tiempo de homogenización y la composición del solvente), rendimiento de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante. Al fin del estudio como resultados se obtuvieron mayores rendimientos 33,8-38,4%, 4673-5435 mg GAE/100g y una capacidad antioxidante de 397-502 $\mu\text{mol TE/g}$. Y en conclusión se demostró que la torta de nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*) es una fuente valiosa de compuestos fenólicos con un potencial antioxidante significativo;

Chunhieng et al. (2004), en su estudio “Estudio de la distribución del selenio en las fracciones proteicas de la nuez de Brasil, (*Bertholletia excelsa*)” se realizó con el objetivo de analizar la composición mineral de las nueces de

Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K), concentrándose específicamente en el contenido de selenio, investigar las fracciones proteicas extraídas de las nueces de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) y su composición de aminoácidos. Se considero como variable independiente al método de extracción, niveles de pH durante la extracción y las condiciones ambientales que afectan a las nueces; y como variables dependientes se tomó el contenido de selenio, humedad, contenido de cenizas y composición de aminoácidos de las fracciones proteicas. Como resultados se obtuvo que la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) es una fuente excepcionalmente rica de selenio, con 126 ppm de Selenio, así mismo, proporcionan información de la distribución del selenio en la fracción proteica extraída con agua, siendo el 17,7 % de la proteína total, donde el selenio está unido covalentemente a dos aminoácidos, formando selenometionina y selenocistina con implicaciones para la biodisponibilidad y el valor nutricional del selenio de las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*). En conclusión, Las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*) son una fuente rica de selenio, lo que las convierte en un componente dietético valioso para la ingesta de selenio también se demostró el potencial de las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*) como materia prima para la formulación de alimentos saludables ricos en selenio;

Jayasinghe y Caruso (2011), en su investigación “Investigación de proteínas que contienen selenio en las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*) o nueces de Brasil mediante métodos ICPMS, MALDI-MS y LC-ESI MS” utilizaron una combinación de técnicas ICPMS, MALDI-MS y LC-ESI-MS con el objetivo de investigar las proteínas que contienen selenio presente en las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*). Las variables independientes tomadas fueron: los diferentes tipos de extracción, técnicas cromatográficas, y como variables dependientes: la concentración y distribución de proteínas que contiene el selenio, pureza de las proteínas e identificación de las proteínas. En los resultados llego a observarse que la selenometionina representó poco menos del 1% del contenido total de metionina en las proteínas, esto indica que una porción significativa del selenio en las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*) está presente en forma de selenoproteínas unidas orgánicamente, en lugar de compuestos de selenio inorgánicos, así

mismo proporcionó información detallada sobre la especiación y distribución del selenio dentro de los componentes proteicos de las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*), lo que tiene implicaciones para la biodisponibilidad y el valor nutricional del selenio de esta fuente alimenticia. La investigación concluyo en que sugieren que las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa*) son una fuente importante de proteínas que contienen selenio, lo que puede contribuir a sus beneficios para la salud y también el estudio enfatiza la importancia de utilizar métodos apropiados para la extracción y el análisis de proteínas para preservar la integridad y la funcionalidad de las proteínas;

Sun, Leung y Tomic (1987), en su investigación "Proteínas de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.): Fraccionamiento, composición e identificación de una proteína rica en azufre" con el objetivo de: Fraccionar las proteínas totales de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) en subunidades para su análisis individual, determinar la composición de aminoácidos de las diferentes fracciones proteicas e identificar y caracterizar una proteína rica en azufre de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*). Tomaron como variable independiente al método de extracción y las técnicas de fraccionamiento, y como variables dependientes al rendimiento de proteína en cada fracción, composición de aminoácidos de cada fracción, peso molecular de las proteínas, propiedades fisicoquímicas de las proteínas. caracterizaron las diferentes fracciones proteicas presentes en las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) mediante extracción secuencial con agua, Cloruro de sodio (NaCl) 0,5 M, etanol al 70 % e hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M en los resultados identificaron fracciones solubles en agua como particularmente rica en proteínas que contienen selenio como la selenometionina y la selenocistina. La fracción hidrosoluble representó el 17,7% de la proteína total y fue la más rica en selenio, conteniendo 153 ppm, por otro lado, la fracción soluble en cloruro de sodio (NaCl) 0,5 M contenía una proteína rica en azufre que fue identificada como el principal alérgeno de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). La fracción soluble en etanol (EtOH) contenía proteínas de almacenamiento como albúminas 2S, mientras que la fracción soluble en álcali contenía globulinas. El estudio proporcionó información detallada sobre la composición proteica y el fraccionamiento de

las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), incluida la identificación de la principal proteína alergénica (Sun, Leung y Tomic 1987); Jayasinghe & Caruso (2011), utilizaron técnicas analíticas avanzadas para caracterizar las proteínas que contienen selenio en las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), demostrando que una cantidad sustancial de selenio está ligada orgánicamente, principalmente como selenometionina y contiene alrededor de 153 ppm de selenio. Al final concluyeron que la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) contiene una mezcla compleja de proteínas con diferentes propiedades fisicoquímicas también que la fracción 2S contiene una proteína rica en azufre que representa una proporción significativa de las proteínas totales (Jayasinghe y Caruso 2011).

2.2 Marco teórico

2.2.1 Castaña (*Bertholletia excelsa*)

La Castaña (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.), árbol forestal de la familia de las Lecythidaceae, originaria de la selva amazónica y concentrada a lo largo de la cuenca del Amazonas, comercializada principalmente por los países de Bolivia, Brasil y Perú (Vasquez-Rojas et al. 2021). El árbol de *B. excelsa*, mide hasta 40 m de altura; hojas alternas, de peciolo cortos, coriáceas, oblongas, con margen ondulado, de 30 a 50 cm de largo, de 7,5 a 15 cm de ancho (Figura 1); flores en grandes racimos erectos en forma de espiga, de color blanco a crema, sépalos unidos pero finalmente separándose en dos sépalos caducifolios (Duke 2017), mientras que el fruto es grande, marrón, leñoso, globoso, de 10 a 15 cm de diámetro, con un peso de hasta 2 kg, con una abertura en un extremo que se cierra con un tapón leñoso y que debe romperse para extraer las “nueces” del interior; los frutos pueden permanecer en los árboles varios meses después de la maduración; semillas de 12 a 24 por fruto, triangulares, con testa marrón (P. Petrechen et al. 2019).

Figura 1. Árbol, flores, fruto abierto y planta de castaña amazónica (*Bertholletia excelsa*)



Fuente: (Larrea-Alcázar et al. 2018)

La primera actividad agroindustrial de la región de Madre de Dios está relacionada a la transformación de la nuez de Castaña, considerando la cadena productiva desde la colecta (del bosque amazónico) hasta la exportación de nuez (*Bertholletia excelsa*) pelada, cuya importancia para la economía de la Amazonia ha justificado estudios extensos sobre la ecología y la socioeconomía de la cosecha de castaña (Escobal y Aldana 2003).

Nutricionalmente, las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) son una buena fuente de nutrientes, que incluyen proteínas, fibra, selenio (Se), magnesio, fósforo y tiamina. También contienen niacina, vitamina E, vitamina B6, calcio, hierro, potasio, zinc y cobre (Cardoso et al. 2017). Las nueces tienen un alto valor alimenticio nutritivo y contienen entre un 60% y un 70% de aceite y un 17% de proteínas (Ariane et al. 2015; Vasquez-Rojas et al. 2021). En la Tabla 3, podemos observar algunas propiedades proximales de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).

Las nueces son buenas fuentes de ácidos grasos insaturados, incluidos los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) contienen aproximadamente el 15% de ácidos grasos saturados (AGS), el 25% de AGMI y el 21% de AGPI (Funasaki et al. 2013; Santos et al. 2012). Excepto

los cocos, el contenido de grasas saturadas de las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) se encuentra entre los más altos de todos los frutos secos. Así mismo, son importantes por contener ácidos grasos omega-3 (ácido α -linolénico) cerca de casi el 7% del total de grasas. Del resto de grasas, más de la mitad son grasas monoinsaturadas (principalmente oleicas), seguidas por un 25% de grasas poliinsaturadas (linoleicas, omega-6) y alrededor de un 19% de grasas saturadas (palmíticas y esteáricas) (Yang 2009).

Tabla 3: Composición aproximada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) por diferentes autores

Composición proximal	Almeida (1963)	Andrade et al. (1999)	Souza and Menezes (2004)	Moodley et al., (2007)	USDA (2008)	Felberg et al., (2009)
Calorías (Kcal)	666,0	–	676,5	–	–	–
Lípidos (% b.s)	65,9	66,8	67,3	66,8	69,0	70,62
Proteína (% b.s)	14,40	13,6	14,29	13,6	18,0	14,35
Carbohidratos (% b.s)	11,00	10,3	3,42	13,0	13,0	11,61
Fibra (% b.s)	2,10	–	8,02			–

Los frutos secos también son ricos en oligoelementos que son esenciales en la dieta. Estos elementos, incluidos Cromo, Cobre, Hierro, etc., actúan como cofactores para muchas funciones fisiológicas y metabólicas (Markiewicz-Żukowska et al. 2022). Normalmente, el orden de los niveles de elementos en las nueces, incluidas las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) sigue el patrón Magnesio > Calcio > Hierro > Cobre > Cromo > Arsénico > Selenio (Lima et al. 2019). El selenio (Se) está reconocido como un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos y es una parte importante de la dieta. Este mineral tiene un papel vital en la salud humana y media la señalización redox, lo que afecta el estrés oxidativo, la inflamación y el metabolismo de los lípidos, además, la deficiencia de selenio puede contribuir a la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) y varios tipos de cáncer. La nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*), es rica en selenio, aunque la cantidad de selenio varía mucho según factores

ambientales, así en la Tabla 5, se muestra el contenido de minerales en la nuez de Castaña.

Tabla 4: Principales ácidos grasos presentes en los aceites crudos de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*), según diferentes autores

Componentes Ácidos grasos	Gonçalves et al. (2002)	Ryan et al. (2006)	Freitas et al. (2007)	Silva et al. (2010)	Santos et al. (2012)
Palmítico (C16)	13,15	13,50	13,80	13,33	14,24
Esteárico (C18)	10,36	11,77	10,36	10,78	11,19
Oleico (C18:1)	37,42	29,09	31,40	36,21	36,26
Linoleico (C18:2)	37,75	42,80		38,28	37,53
Linolénico (C18:3)	–	0,20	42,50		0,076

Tabla 5: Composición mineral de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), (en base seca y desgrasada)

Mineral	<i>J. regia</i> (µg/g)	<i>B. excelsa</i> (µg/g)	<i>I. malayana</i> (µg/g)
Nitrógeno	27200	97470	23700
Fósforo	5000	23800	2700
Potasio	5000	19690	5600
Calcio	900	6060	1700
Magnesio	1280	13380	2200
Sodio	25	20	123
Hierro	45	80	108
Manganeso	nd	50	300
Zinc	nd	115	35
Selenio	nd	126	1,9

Fuente: Chunhieng et al. (2004b)

Taxonomía: fue descrita por: el naturalista, médico y botánico francés Aimé Bonpland y la polímata, geógrafo, astrónomo, humanista, naturalista y explorador Alexander Von Humboldt. Y publicado en *Plantae Aequinoctiales* en el tomo 1 (1807), la clasificación taxonómica de la castaña se detalla de esta manera:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Ericales

Familia: Lecythidaceae

Subfamilia: Lecythidoideae

Género: Bertholletia

Especie: Bertholletia excelsa

2.2.2 Las proteínas

Las proteínas son un grupo de biopolímeros que exhiben una amplia diversidad de atributos moleculares, fisicoquímicos, funcionales y nutricionales. La base de datos de proteínas UniProt enumera actualmente más de 230 millones de proteínas diferentes, y es probable que este número crezca sustancialmente en el futuro (UNIPROT 2024). La diversa gama de propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales que exhiben las diferentes proteínas es el resultado de diferencias en el número, tipo y secuencia de los aminoácidos que contienen. Así en la nuez de B. Excelsa, la selenometionina (SeMet), la selenocisteína (SeCys), la Se metil selenocisteína (SeMeSeC) y otros aminoácidos de Se son las principales unidades monoméricas que constituyen las selenoproteínas, el Se, se complementa principalmente como selenometionina (SeMet), ya que es la especie predominante de selenio que se encuentra naturalmente en los alimentos (Schrauzer 2000) particularmente en la nuez de B. excelsa

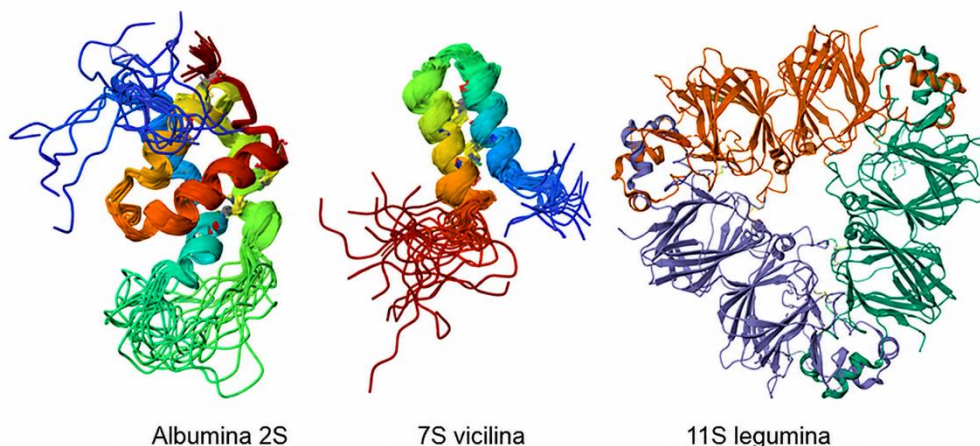
(Alcântara et al. 2022), cuyas propiedades biológicas de este mineral, necesario para la función tiroidea e inmune adecuada. El Se también puede proteger contra el cáncer de próstata, hígado y pulmón. Debido a sus altos niveles de fitonutrientes, las nueces de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) se han asociado con muchos beneficios para la salud, entre los que se incluyen principalmente efectos reductores del colesterol, actividad antioxidante y efectos anti proliferativos (da Silva et al. 2022).

Las semillas de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), contienen entre un 15 y un 17% de proteína en peso fresco y alrededor del 50% de proteína en peso seco de la harina desgrasada (Bisht, Singh y Kaldate 2021; Ariane et al. 2015b). Estas nueces son probablemente una de las fuentes alimenticias más ricas en aminoácidos que contienen azufre (Sharma et al. 2010); Se informa que la proteína total de la semilla contiene aproximadamente un 8,3% de metionina y cisteína en peso (AMPE et al. 1986). La proteína total, se puede fraccionar en tres clases de proteínas 11 S, 7S y 2s (Chunhieng et al. 2004a). La fracción 2 S, que es soluble en agua y, por tanto, clasificada como albúmina, comprende aproximadamente el 30% de la proteína total y es excepcionalmente rica en aminoácidos azufrados (AMPE et al. 1986); alrededor del 30% de metionina y cisteína (Takeuchi y Egea 2019). A partir de esta fracción se ha purificado una proteína rica en azufre, que contiene un 18% de metionina y un 8% de cisteína. Por otro lado, se ha establecido que esta proteína está compuesta por dos componentes polipeptídicos con masas moleculares de aproximadamente 9 kDa y 3 kDa. Así mismo se ha informado que la proteína rica en azufre se sintetiza y comienza a acumularse en las semillas de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) aproximadamente entre 8 y 9 meses después de la floración (Sharma et al. 2010).

Con excepción de la albúmina 2S, la información respecto a las proteínas de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), son escasas. Sobre la base del análisis ultracentrífugo, (Sun, Leung y Tomic 1987), ha informado que las proteínas de almacenamiento de las semillas están compuestas por 60% de legumina 11S (también conocida como excelsina), 30% de albúmina 2S

y 10% de proteínas vicilina 7S, las mismas que se muestran en la Figura 2, sistematizado con la ayuda del banco de datos de proteínas RCSB PDB.

Figura 2. Representación de las proteínas 2S, 7S y 11S

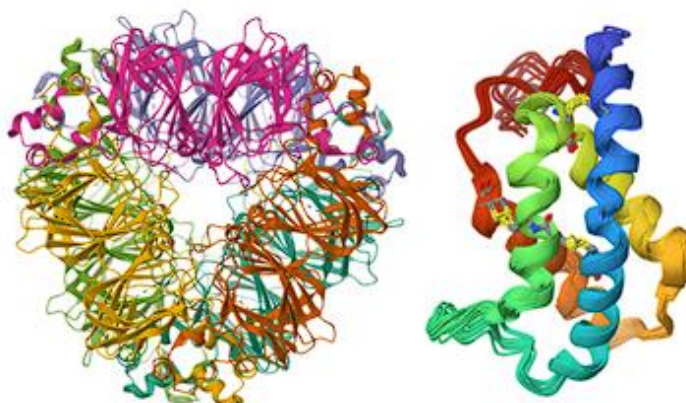


Fuente: U.S. National Science Foundation (2026)

Por otro lado, se han identificado los cristales de 11S considerando la forma molecular como un polígono de doble capa compuesto por tres subunidades, cada una con un agujero en el centro, que es una característica de las proteínas de la superfamilia cupina. Se ha informado que el coeficiente de sedimentación de excelsina se utiliza para el aislamiento de BN 7S; sin embargo, el 7S no se ha caracterizado más (Guo et al. 2007). Tanto el 7S como el 11S pertenecen a la superfamilia de las cupinas y suelen ser de naturaleza oligomérica. La proteína 11S es un hexámero, en el que cada polipéptido monomérico está compuesto por una subunidad ácida de ~32 kDa y una subunidad básica de ~24 kDa unidas por enlaces disulfuro (Ajibola y Aluko 2022). Por otro lado, la proteína 7S de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), es un trímero compuesto por polipéptidos de 35-45 kDa. Se han identificado alérgenos menores en la proteína de *B. excelsa*, 11S y 7S, cuyas características moleculares del 7S, incluidas las propiedades alérgicas, aún no se han dilucidado (Melo et al. 1994). La proteína 2S soluble en agua está compuesto por dos subunidades, de 9 y 3 kDa, unidas mediante enlace(s) disulfuro. Las proteínas de almacenamiento de semillas, 2S, 7S y 11S, se han revisado exhaustivamente en relación con las alergias alimentarias, reportándose que, la proteína de la nuez de

castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) (Figura 3), causa reacciones alérgicas potencialmente mortales mediadas por IgE en personas sensibles (Röder, Filbert y Holzhauser 2010). Entre las proteínas alergénicas potenciales en *B. excelsa*, solo dos han demostrado reaccionar con la IgE sérica del paciente: Ber e 1, una albúmina 2S y Ber e 2, una legumina 11S.

Figura 3. Estructura del cristal alergeno Ber e2 y 2S albumina Ber e1 en la nuez de castaña de *B. excelsa*.



Fuente: U.S. National Science Foundation (2026) .

Las fracciones de proteínas (11S, 7S y 2s) de nuez de castaña *B. excelsa* contienen altas concentraciones de glutamina/ácido glutámico y arginina, una característica de las proteínas de las semillas (de almacenamiento), tal como se puede apreciar en la Tabla 6. Además, el nivel de metionina en todas las fracciones proteicas es generalmente más alto que el de muchas otras proteínas de almacenamiento de semillas de plantas, excepto por unos pocos aminoácidos (Ser, Phe, Lys, His), la fracción proteica 7s es muy similar a la fracción proteica 11s en la composición de aminoácidos. Sin embargo, el perfil de aminoácidos de la proteína 2S es claramente diferente del de las otras fracciones; particularmente distintivos son el contenido mucho mayor de aminoácidos azufrados y las menores cantidades de Phe, ne, Val y Thr. Los niveles de Met (17,9%) y Cys (8,7%) en la proteína 2s son inusualmente altos. Dado que la proteína 2s constituye alrededor del 30% de la proteína total de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*), la concentración relativamente alta de aminoácidos azufrados en la proteína

de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) (9,1%) se debe en gran medida a esta proteína 2s rica en azufre (Sun, Leung y Tomic 1987).

Tabla 6: Composición de aminoácidos en las proteínas de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) (g AA/100 g proteína)

Aminoácido	2S	7S	11S	Total
Asx	4,31	9,53	9,58	7,67
Thr	0,47	2,00	2,81	2,36
Ser	4,36	1,72	4,28	4,62
Glx	25,32	22,93	21,04	22,17
Pro	5,60	4,83	5,00	5,11
Gly	4,17	5,78	5,84	5,50
Ala	1,21	3,53	3,96	3,24
Val	0,73	5,52	4,78	4,02
Cys	8,73	1,02	1,66	2,65
Met	17,92	3,71	3,52	6,53
Ile	0,71	3,53	3,61	2,80
Leu	5,55	7,07	7,25	6,75
Tyr	1,56	3,36	2,75	2,85
Phe	0,51	5,95	4,90	3,74
Lys	1,74	4,31	3,16	2,94
His	2,15	3,10	2,07	2,20
Arg	15,70	13,02	13,81	14,89

Fuente: Sun S.S. et al. (1987)

Es importante considerar los componentes bioactivos en la nuez de castaña de *B. excelsa*, siendo una excelente fuente dietética de fitoquímicos, incluidos fenólicos, flavonoides, tocoferol y fitoesteroles (Takeuchi y Egea 2019). Los compuestos fenólicos abarcan la clase más concentrada de compuestos bioactivos, encontrándose en forma libre, esterificada o unida. John y Shahidi (2010) evaluaron los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de la nuez entera, la semilla y cáscara marrón de *B. excelsa*. Los principales compuestos identificados como fenólicos libres y unidos fueron el ácido gálico, el ácido elágico, el ácido vainílico, el ácido protocatequico y la catequina. La cáscara marrón contenía una mayor concentración de estos fenólicos en comparación con la nuez entera y el

grano (John y Shahidi 2010). La actividad antioxidante de *B. excelsa* se evaluó en extractos fenólicos solubles y ligados, y se observó mayor actividad antioxidante en la fracción soluble de nuez y cáscara marrón (Vasquez-Rojas et al. 2023).

Se informó que los compuestos fenólicos totales de la fracción fenólica soluble y unida de la piel de nuez de castaña *B. excelsa*, eran 12,36 y 3,52 mg GAE/g, respectivamente (Selvin et al. 2020). La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los compuestos fenólicos unidos de los extractos de cáscara marrón se encontró 31,8 y 8,6 veces mayor que la del grano y la nuez entera, respectivamente. De manera similar, el TEAC de los compuestos fenólicos solubles de los extractos de cáscara marrón se encontró 18,9 y 5,2 veces mayor que el del grano y el de la nuez entera, respectivamente.

2.2.3 Extracción alcalina y precipitación isoeléctrica

La demanda comercial de las proteínas está aumentando sostenidamente, conllevando a la búsqueda de fuentes vegetales y métodos de purificación que sean eficientes, económicos, factibles y amigables con el ecosistema. En esta dirección se tiene el proceso de extracción alcalina-precipitación isoeléctrica convencional, un método tradicional y útil para la purificación de proteínas, basado en solubilización de las proteínas en un medio alcalino y posterior precipitación al ajustar el pH al punto isoeléctrico (Cruz-Solis et al. 2023). Este proceso, está principalmente influenciado por las propiedades de la proteína (tamaño, forma, carga, hidrofobicidad, afinidad), la naturaleza de la fuente de proteína, así como el tipo de álcali, concentración, duración y temperatura del tratamiento, considerándose también factores intrínsecos y extrínsecos de la materia prima, que influyen en el rendimiento de la extracción. Según la concentración obtenida en el proceso de purificación, los productos obtenidos se clasifican en aislados proteicos (>90%), concentrados proteicos (65-90%) y harinas ricas en proteína (<65%) (Shrestha et al. 2021).

La extracción alcalina-precipitación isoeléctrica de proteínas contenidas en células vegetales, se fundamenta en la solubilización de las proteínas en

medio alcalino, relevancia a considerar: la solubilidad y clasificación de diferentes tipos de proteínas. Así mismo, la precipitación de las proteínas solubilizadas por el cambio del pH, estableciéndose el punto isoeléctrico (carga neutra) donde ocurre la separación de las proteínas del medio solubilizado (Yao et al. 2023). Para comprender mejor este proceso, resulta relevante considerar la solubilidad y clasificación de diferentes tipos de proteínas, siendo las más comunes en matrices vegetales:

- **Albúminas:** estas proteínas son fácilmente solubles en agua y ricos en lisina y valina. Se pueden precipitar en presencia de grandes cantidades de sales (salación) o coagularse mediante calor (Zheng et al. 2019). En la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), existe un tipo particular de proteínas de almacenamiento llamadas albúminas 2S. Varias albúminas 2S tienen actividades enzimáticas inhibitoras como α -amilasas, serina proteasas, así como actividades antifúngicas, antimicrobianas e insecticidas. Además, la alergenicidad de varias semillas como maní, cebada, pistachos, sésamo, entre otras, es atribuible a algunas áreas conservadas de las albúminas 2S (Ibiapina et al. 2022).
- **Globulinas:** estas proteínas son insolubles o casi insolubles en agua. Sin embargo, su solubilidad aumenta mediante la adición de sales. Al igual que las albúminas, las globulinas se coagulan cuando se calientan. Las globulinas también son ricas en lisina y valina (Hu et al., 2023). Los coeficientes de sedimentación de estas proteínas oscilan entre 7S y 12S. Las globulinas similares a las leguminosas generalmente reciben nombres según su origen vegetal como glicinina (soja), araquina (maní), heliantinina (girasol), faseolina (frijol común), entre otras. Se ha demostrado que la hidrólisis de globulinas de diferentes fuentes de leguminosas produce péptidos bioactivos con potencial biológico diverso (Li et al. 2023).
- **Prolaminas:** las prolaminas son proteínas insolubles en agua que son solubles en soluciones acuosas de alcoholes (70–80% v/v). Contienen altas cantidades de prolina y nitrógeno amida, pero son deficientes en

lisina (Sun et al. 2020). Estas proteínas son ricas en metionina y cisteína. A las prolaminas comunes se les asignan nombres según su origen vegetal, como hordeína (cebada), gliadina (trigo), secalina (centeno), zeína (maíz) o avenina (avena).

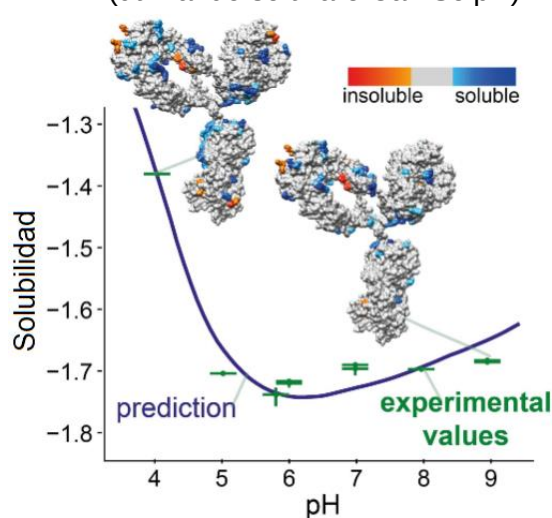
- Glutelinas: estas proteínas son insolubles en agua y alcohol (ya sea diluido o absoluto), pero son solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas. Como parte de su composición, las glutelinas son ricas en leucina, treonina e histidina (Harel y Jbara 2023). Estas proteínas son una mezcla heterogénea de diversos polímeros unidos por polipéptidos con enlaces disulfuro. En términos de funcionalidad tecnológica, aportan cuerpo y textura a diversos productos horneados.

La característica principal de la solubilización de proteínas basada en el proceso de cambio de pH, donde las macromoléculas pueden sufrir cambios en su formación estructural según los entornos del sistema, así a valores de pH extremos, fuertes cargas positivas y negativas, respectivamente, separan las proteínas por repulsión. Por otro lado, la conformación de una proteína también depende de la secuencia de sus aminoácidos en las cadenas de aminoácidos que se pliegan para minimizar la energía libre. A medida que las proteínas obtienen una carga neta negativa general (medio alcalino), desarrollan gradualmente interacciones electrostáticas con las moléculas de agua, aumentando así su solubilidad (Oeller et al. 2023). Una característica importante de las proteínas sometidas a valores de pH alcalinos es que en parte se despliegan y mantienen su estructura primaria y en parte su estructura secundaria (Figura 4).

Se ha extraído una gran cantidad de proteínas vegetales mediante solubilización alcalina, como proteínas de legumbres, semillas oleaginosas y cereales (Gao et al. 2020). Los valores de pH comunes de la solubilización de proteínas oscilan entre 8 y 11. Con respecto a otras macromoléculas presentes en las materias primas, la mayoría de los carbohidratos complejos insolubles tienden a precipitar en solución acuosa y pueden eliminarse mediante centrifugación adicional. Los carbohidratos simples se solubilizarán junto con las proteínas a un pH alcalino y permanecerán

solubles en el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. Si la muestra contiene una cantidad significativa de lípidos, se recomienda un paso de desgrasado ya que las moléculas de lípidos pueden sufrir saponificación a pH alcalino, interfiriendo con la extracción de proteínas (Ogunwolu et al. 2010).

Figura 4. Variación de la solubilidad de las proteínas con el pH solución (utilizando software CamSolpH)



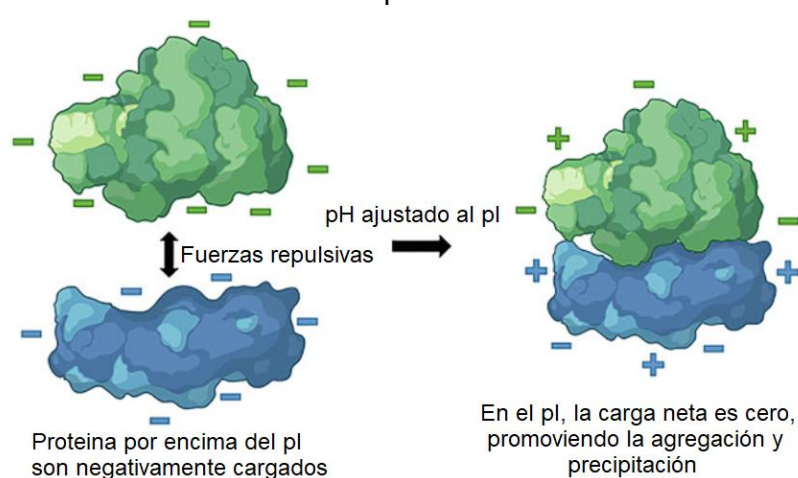
Fuente: Oeller et al. (2023)

Tras la solubilización de proteínas mediante extracción alcalina, se necesita un método de precipitación para recuperar las proteínas disueltas. En ese sentido, el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas es un principio fisicoquímico que puede utilizarse para precipitar proteínas disueltas en soluciones alcalinas. El pI representa el pH en una solución en el que la carga neta de una proteína se vuelve neutra (cero) (Lautenbach, Hosseinpour y Peukert 2021). A valores de pH superiores al pI, la superficie de las proteínas está predominantemente cargada negativamente y, por lo tanto, las moléculas cargadas negativamente promoverán fuerzas repulsivas. De manera similar, a valores de pH por debajo del pI, la superficie de la proteína está predominantemente cargada de manera positiva, y en una solución alcalina ocurre la repulsión entre proteínas (Macovescu et al. 2018; Sillero y Ribeiro 1989). Al ajustar el pH al valor pI, las cargas negativas y positivas se equilibran, reduciendo las fuerzas repulsivas (principalmente electrostáticas), y predominan las fuerzas de atracción entre proteínas,

provocando la formación de complejos, agregación y precipitación (Figura 5). Al final de la extracción alcalina se obtiene una compleja mezcla proteica de proteínas (Cruz-Solis et al. 2023).

Por tanto, considerando que cada proteína presenta un pI específico, no existe un solo pI para la mezcla de proteína. Es necesario determinar el pI de las proteínas de interés antes del paso de separación, también se puede utilizar estimaciones basadas en principios termodinámicos.

Figura 5. Diagrama que ejemplifica el principio de precipitación isoeléctrica de proteínas

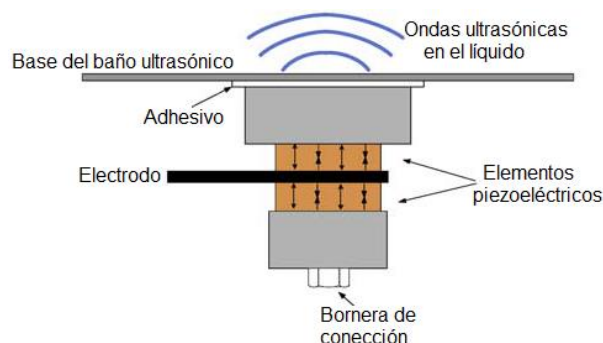


Fuente: Cruz-Solis I et al. (2023)

2.2.4 Extracción de proteína asistido por ultrasonido

En los procesos asistido por ultrasonido, la vibración del sonido suele generarse mediante un transductor piezoeléctrico, que constan de dos elementos cerámicos que cambian su tamaño de forma precisa y reproducible en respuesta a un campo eléctrico. Así, al aplicar un campo eléctrico alterno, los elementos cerámicos se mueven hacia arriba y hacia abajo de manera altamente reproducible (Figura 6). El ultrasonido se ha clasificado ampliamente como ultrasonido de baja intensidad y ultrasonido de alta intensidad, que se caracterizan por ser de alta frecuencia (>100 kHz) y baja potencia (<1 W/cm²), y de baja frecuencia (20-100 kHz) y alta potencia (>1 W/cm²) respectivamente (Figura 7). El ultrasonido de alta intensidad (baja frecuencia) se usa comúnmente en la extracción y procesamiento de alimentos debido principalmente a la cavitación acústica (Bhargava et al. 2021).

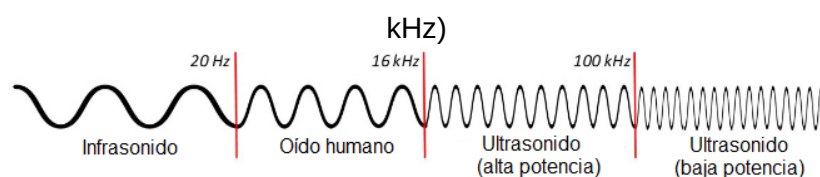
Figura 6. Diagrama esquemático de un sistema de baño ultrasónico



Fuente: Bhargava et al. (2021)

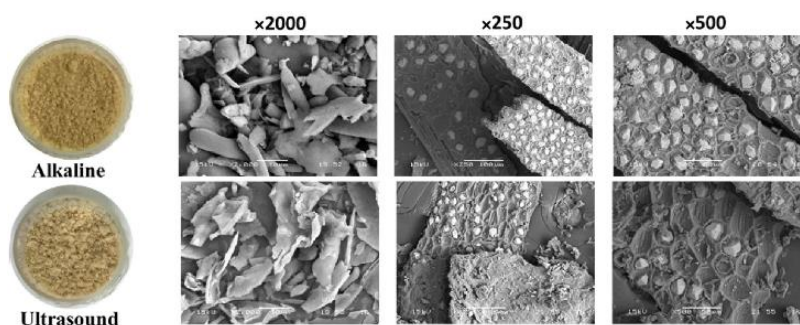
Los cambios de presión localizados que ocurren en tiempos cortos (unos pocos microsegundos) inducen la rápida formación y colapso de burbujas en un medio líquido lo que se conoce como cavitación. En zonas localizadas, la cavitación ultrasónica podría generar intensas fuerzas de corte hidrodinámicas, turbulencia, altas temperaturas y presiones en el rango de 2000 a 5000 K y 300 a 1200 bar, respectivamente (Gallego-Juárez 2017). Estos efectos de mezcla resultantes de la cavitación ultrasónica contribuyen a mejorar la cinética de extracción y el rendimiento de proteínas de los alimentos vegetales (Aguilar-Acosta et al. 2020). En primer lugar, la cavitación provoca la alteración de las células vegetales, la formación de picaduras en las membranas celulares y la reducción del tamaño de las partículas de las células. La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utiliza comúnmente para visualizar tales alteraciones de las paredes celulares, así los cambios morfológicos inducidos por la extracción alcalina – precipitación isoelectrónica (EA-PI) y el método asistido por ultrasonido (EPAU) visualizados mediante imágenes SEM (Figura 8) para la vaina de guisante (x2000) y residuos de extracción (x250, x500) (Karabulut et al. 2023).

Figura 7. Ultrasonido. Bajas frecuencias (20-100 kHz) y altas frecuencias (>100 kHz)



Fuente: Bhargava et al. (2021)

Figura 8. Comparación de microestructura de torta extraída por proceso convencional y asistido por ultrasonido en extracción de proteína.



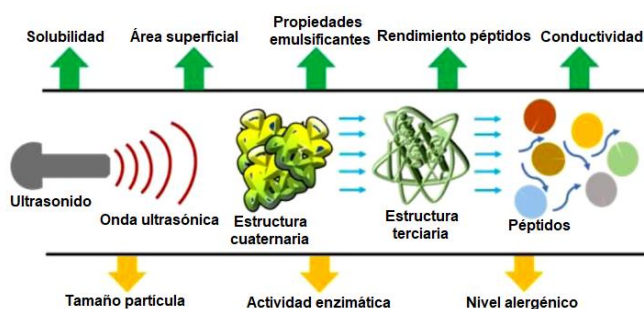
Fuente: Karabulut et al. (2023)

En el caso EPAU, las muestras tenían superficies más lisas con estructuras desordenadas, cambios atribuibles a los efectos de deterioro celular generados por las burbujas de cavitación durante la vibración ultrasónica, los residuos de extracción muestran los efectos de deterioro en EPAU al representar la dislocación de los gránulos incrustados en la matriz celular del residuo de extracción. Por lo tanto, la morfología de los concentrados y aislados de proteínas está muy influenciada por los métodos de extracción debido a la eficiencia de extracción de las proteínas y la probable interacción de las proteínas con otros constituyentes extraídos.

Al mismo tiempo, los efectos de la cavitación pueden inducir cambios físicos y químicos en las proteínas; por lo tanto, el ultrasonido se considera una técnica eficaz para modificar proteínas para el desarrollo de productos alimenticios (Chémat y Vorobiev 2020). Las modificaciones incluyen principalmente cambios en las interacciones moleculares, estructuras, conformaciones, propiedades fisicoquímicas y funcionalidades de las proteínas. Por ejemplo, la cavitación descompone las moléculas de agua para producir radicales libres altamente reactivos como H^+ y OH^- . Estos radicales libres pueden reaccionar u oxidar proteínas, lo que resulta en la interrupción de las interacciones entre las moléculas de proteínas, como las interacciones hidrófobas, los enlaces de hidrógeno y los enlaces disulfuro, por tanto, el ultrasonido puede inducir el entrecruzamiento, el despliegue y la agregación de proteínas, cambiar las conformaciones y las estructuras espaciales de las proteínas y alterar las propiedades fisicoquímicas y

funcionales de las proteínas. Un caso particular es la aplicación de ultrasonido para la extracción, modificación y reducción de alérgenos de proteínas vegetales (Sengar et al. 2022), como el de la nuez de castaña *B. excelsa*. Esto es, la EPAU y su efecto sobre diferentes propiedades como solubilidad, emulsificación, cambios reológicos, hidrofobicidad superficial y estabilidad térmica, considerando la estructura secundaria de las proteínas que se modifica debido a la cavitación, lo que da como resultado propiedades tecnofuncionales mejoradas de las proteínas, esquematizadas en la Figura 9. Además, la revisión analiza cómo la ultrasonificación puede reducir la alergenicidad y los factores anti nutricionales presentes en las proteínas de origen vegetal (Wang et al. 2020).

Figura 9. Principales efectos de ultrasonificación en las propiedades de las proteínas vegetales



Fuente: Sengar A S et al. (2022).

Los parámetros operativos que influyen en el rendimiento de la extracción de proteínas cuando se aplica proceso asistida por ultrasonido, incluyen la frecuencia de operación, la potencia ultrasónica, la amplitud ultrasónica, el tiempo de procesamiento, la temperatura, el pH y la relación muestra/disolvente (Helikh, Gao y Duan 2020). La extracción cuando la frecuencia ultrasónica está en el nivel de 20 kHz, se han optimizado otros parámetros como la relación disolvente/muestra, temperatura, tiempo de procesamiento, pH, potencia ultrasónica y ciclo de trabajo. Así, la relación disolvente/muestra de 18,4 ml/g, pH 9, temperatura 30,8 °C y tiempo de procesamiento 35,5 min, se logró el rendimiento máximo de proteína del 26,4 % para la extracción de proteínas de la torta de semillas de onagra (Hadidi, Ibarz y Pouramin 2021). Por el contrario, el rendimiento de proteína más bajo

del 14,1 % se obtuvo con una relación disolvente/muestra de 10 ml/g, pH 10, 40 °C y un tiempo de procesamiento de 15 minutos. El rendimiento de extracción de proteína de harina de nuez mostró una tendencia creciente cuando la frecuencia se incrementó de 20 kHz a 40 kHz (20, 28, 35, 40 kHz), aunque no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las eficiencias de extracción a 20 y 40 kHz. 52 kHz (Hu et al. 2023).

Por otro lado, es importante considerar el impacto del ultrasonido en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas obtenidas, considerando las propiedades fisicoquímicas, incluido el peso molecular, el tamaño de las partículas, la potencial zeta, los grupos SH y SS, la hidrofobicidad de la superficie y la fluorescencia intrínseca (Rahman y Lamsal 2021).

2.2.5 Optimización de procesos mediante Metodología de Superficie de Respuesta

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es una herramienta estadística utilizada para modelar y optimizar procesos en los que múltiples variables independientes influyen en una o más respuestas cuantitativas. Su aplicación resulta particularmente útil en la optimización de procesos bioquímicos y de extracción, donde los factores interactúan de manera compleja (H. Myers et al. 2016)

En el contexto de la extracción de proteínas a partir de fuentes vegetales como la castaña, la RSM permite identificar las condiciones experimentales óptimas mediante un enfoque sistemático. Esto incluye la evaluación simultánea del efecto de variables como el pH, la concentración de soluto, la amplitud del ultrasonido, el tiempo de extracción, y la temperatura, sobre el rendimiento y pureza de las proteínas extraídas (Montgomery 2020).

El uso de diseños experimentales como el Diseño Compuesto Central (CCD) o el Diseño Box-Behnken facilita la generación de modelos polinómicos de segundo orden que describen la superficie de respuesta del proceso. Estas herramientas permiten estudiar interacciones entre factores y predecir condiciones que maximizan o minimizan la respuesta deseada (Bezerra et al. 2008).

En procesos combinados como la extracción alcalina asistida por ultrasonido, seguida de precipitación isoelectrica, la RSM contribuye a optimizar la eficiencia de extracción y la recuperación de proteínas funcionales. La aplicación de ultrasonido promueve la ruptura celular y mejora la transferencia de masa mediante cavitación, mientras que el tratamiento alcalino favorece la solubilización de las proteínas. Posteriormente, la precipitación isoelectrica permite su recuperación al ajustar el pH a su punto isoelectrico (Liu et al. 2022).

2.3 Definición de términos

- **Torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*).** Es un subproducto de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) luego de la extracción de aceite. La torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) es un insumo de alto tenor proteico con un buen equilibrio entre los aminoácidos esenciales y otros nutrientes (Suárez Cubas 2010);
- **Componentes bioactivos.** Son compuestos que están presentes en los alimentos en pequeñas cantidades, estos tienen la capacidad de mejorar o prevenir cualquier condición de salud potencial. Estos compuestos se están convirtiendo en un ingrediente esencial para numerosas industrias alimentarias y empresas emergentes basadas en la industria alimentaria para crear productos que satisfagan la creciente demanda de los consumidores de productos naturales, nutritivos y económicos (Bansal et al. 2023).
- **Proteína vegetal.** Son proteínas derivadas de fuentes vegetales, formadas por aminoácidos b esenciales y no esenciales que provienen de plantas. Las fuentes principales con las legumbres, los cereales, nueces, semillas y algunas verduras, cuya particularidad es que son más bajos en grasas saturadas y colesterol y más ricos en fibra y otros nutrientes (Andreoli et al. 2021);
- **Concentrado proteico.** Es una forma concentrada de proteína derivada de diversas fuentes, generalmente mediante un proceso de extracción y

purificación, cuyo contenido de proteínas normalmente está entre 60 y 80 % de proteína en peso (Rayan, Swailam y Hamed 2023);

- **Aislado proteico.** Es una forma de proteína altamente refinada que ha sido sometida a un procesamiento más extenso que la proteína concentrada y suele contener un 90% o más de proteínas en peso (Rayan, Swailam y Hamed 2023);
- **Extracción de proteína con ultrasonido.** Proceso tecnológico emergente que utiliza ondas de sonido de alta frecuencia para alterar las paredes celulares y liberar proteínas de tejidos vegetales (frecuencia superior a 20 kHz), creando burbujas de cavitación que colapsan generando altas temperaturas y presiones locales, altera las paredes y membranas celulares, liberando proteínas a la solución (Nitiwuttithorn et al. 2024);
- **Compuestos fenólicos.** Son considerados importantes antioxidantes dietéticos, estos se encuentran principalmente en frutas, hortalizas, raíces y cereales (Peñarrieta et al., 2014). los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y la lignina. Dentro de los compuestos fenólicos también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta herbívoro (Martín Gordo 2018);
- **Alimentos funcionales.** Se definen como alimentos que brindan beneficios para la salud que se extienden más allá de su valor nutricional fundamental (Vignesh et al. 2024). Los alimentos funcionales están presentes en frutas, verduras, lácteos, panadería, cereales y productos cárnicos. Los alimentos funcionales no son suplementos alimenticios, medicamentos o antibióticos adicionales, son el componente principal de una dieta humana y animal normal (Ghazanfar et al. 2022);
- **Desgrasado mediante expeller.** Este proceso de desengrasado funciona de manera continua moliendo y presionando la materia prima a medida que se transporta a través de un barril mediante un tornillo helicoidal (ARCE GUZMÁN 2015).

- **Desgrasado mediante prensado hidráulico.** Es el método más utilizado desde tiempos antiguos, para realizar este proceso se aplica presión sobre una masa oleaginosa generalmente con un contenido mayor al 35% de aceite, El rendimiento dependerá de la presión ejercida (Hurtarte 2012).

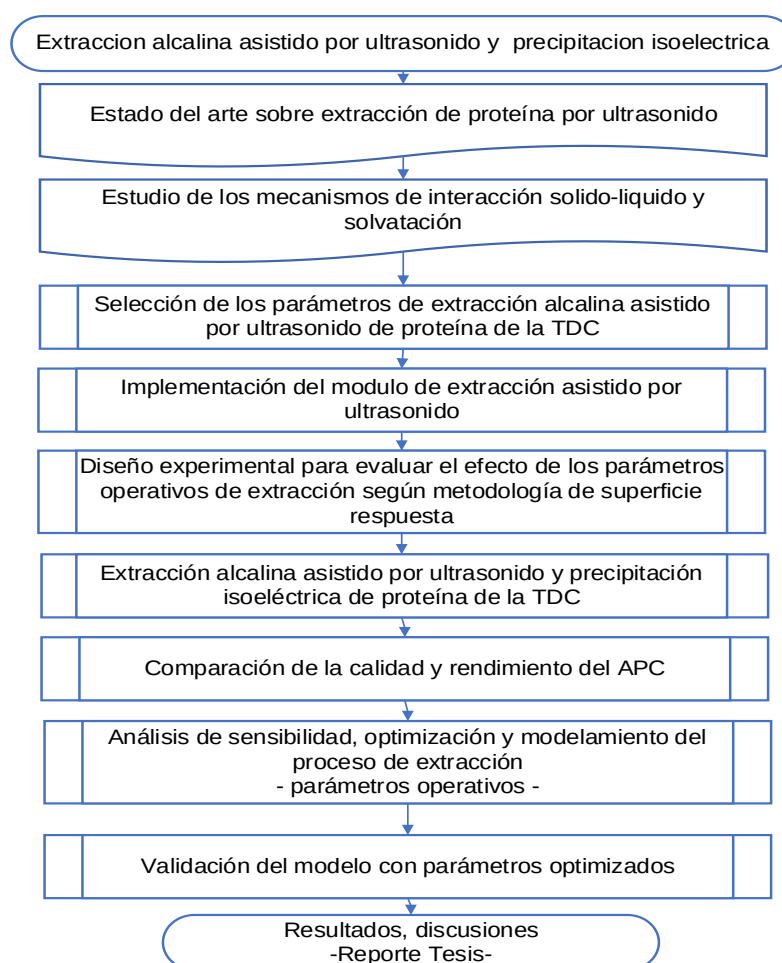
CAPÍTULO III: METODOLOGIA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de estudio

Esta investigación está enmarcada en un estudio experimental predictivo–comparativo.

3.2 Diseño del estudio

Figura 10. Diagrama de bloques del diseño de estudio



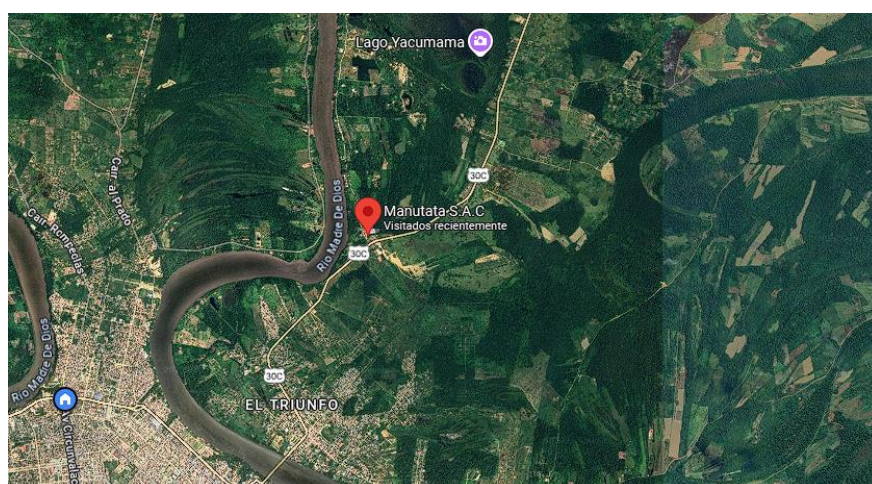
En la Figura 10, se esquematiza la metodología seguida en el estudio, desde la sistematización de la información científica relacionado con el problema, aspectos fundamentales de la extracción asistido por ultrasonido, el diseño experimental y los análisis de los resultados del estudio, finalizando con la redacción y presentación de la tesis.

3.3 Población y muestra

3.3.1 Población

La nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) fue adquirida de la empresa Manutata, ubicado en la Carretera Iberia Km 4, Fundo San Fernando (Margen Izquierdo-Cruce la Cachuela), Puerto Maldonado, Perú (Figura 11).

Figura 11. Vista fotográfica ubicación Manutata, (12°33'31.1"S 69°09'40.2"W Google earth, 2025)



Fuente: Google Maps (2025)

3.3.2 Muestras

Para el trabajo con la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) proveniente de la empresa Manutata, se empleó un muestreo no probabilístico, en el cual los elementos de la población no tienen una probabilidad conocida ni necesariamente igual de ser seleccionados, basándose en el criterio de los investigadores. En este caso, la selección se realizó considerando la calidad del producto final ofrecido por la empresa, con el fin de evitar incidencias durante el desarrollo de la metodología.

La materia prima utilizada correspondió a TDC, obtenida mediante prensado en la planta piloto de frutas y hortalizas de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios.

Para el estudio de superficie de respuesta, cuyo objetivo fue optimizar los valores de los factores y maximizar las respuestas, se empleó un muestreo dirigido, tal como recomiendan Box y Hunter (2005) y Campbell et al. (2020), en el cual los puntos de muestreo se seleccionan estratégicamente para maximizar la información sobre la relación entre las variables.

En consecuencia, se seleccionaron 31 muestras, cada una de 25 g de torta desgrasada y seca de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), además de las muestras se necesitó cantidades adicionales para realizar los estudios de análisis proximal, determinación de punto isoelectrico y ensayos preliminares de acondicionamiento para el proceso, obteniéndose un total de 1750g.

3.4 Métodos y técnicas

3.4.1 Materiales y equipos

- a) Torta desgrasada de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) (TDC) proveniente de la planta piloto de frutas y hortalizas de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, ubicado en la AV. Jorge Chávez N° 1160, Puerto Maldonado, Madre de Dios, Perú.
- b) Equipo de prensado hidráulico A&C Ingenieros modelo PHF 03, con potencia de 2 hp, capacidad de presión máxima de 1400 psi.
- c) Módulo de extracción asistido por Ultrasonido Getidy, que consta de Baño ultrasónico de 3L. Con potencia de 300W, Frecuencia de vibración ultrasónica 40Hz y con temperatura asistida.
- d) Agitador magnético con calefacción IKA C-MAG HS 10, Rango de velocidad 100-1500 rpm, potencia de calefacción 1500W, capacidad máxima a agitar H₂O 15L, carga máxima de la plancha 20Kg.
- e) Balanza De Precisión Bq003 Henkel 0,001, capacidad 300g., precisión $\pm 0,001g$, AC 220V, Frecuencia 50 hasta 60Hz;

- f) Espectrofotómetro UV-Vis. Fuente de luz: Lámpara de xenón, λ : 200–1000 nm, Ancho de banda: <2,5 nm; Linealidad a 450 nm: 0–2,5 Abs, 2%; Precisión a 450 nm: 1,0% + 0,003 Abs (0–2,0 Abs), 2,0% (2,0–2,5 Abs); Precisión a 450 nm: SD <0,003 Abs o CV <1,0%; Velocidad de escaneo espectral: 10 segundos de 200 a 1000 nm con pasos de 1 nm. Entrada principal: 100–240V (50/60 Hz), 110W.
- g) pH metro de mesa OHAUS STARTER 3100, Intervalo de medición -5 °C – 110 °C; -2,00 – 16,00 pH; -1999 – 1999 mV, Precisión $\pm 0,5$ °C; ± 1 mV; $\pm 0,01$ pH, Resolución de la medición 0,1 °C; 0,01 pH; 1 mV, Pantalla LCD con retroiluminación, Electrodo ST310
- h) Molino de carne de acero inoxidable TK-22 con N° de Serie ML032319, potencia de 2HP, capacidad de 250 Kg/H, alimentación 220V / 60HZ.
- i) Centrifuga digital Greatlab modelo Spin plus 8, Máxima Velocidad: 400 - 5000 rpm en paso de 100 rpm, Máximo RCF: 3074 x g., Capacidad de los tubos: 8 x 15 mL., Rango de tiempo: 15 seg. ~ 99 min., Potencia de consumo: 40W., Alimentación: 220V / 60 Hz;
- j) Agitador Vortex Analogico VWR. Velocidad de rotación 300 rpm - Máx.: 2500 rpm, potencia 12W, Alimentación 220V / 60Hz.

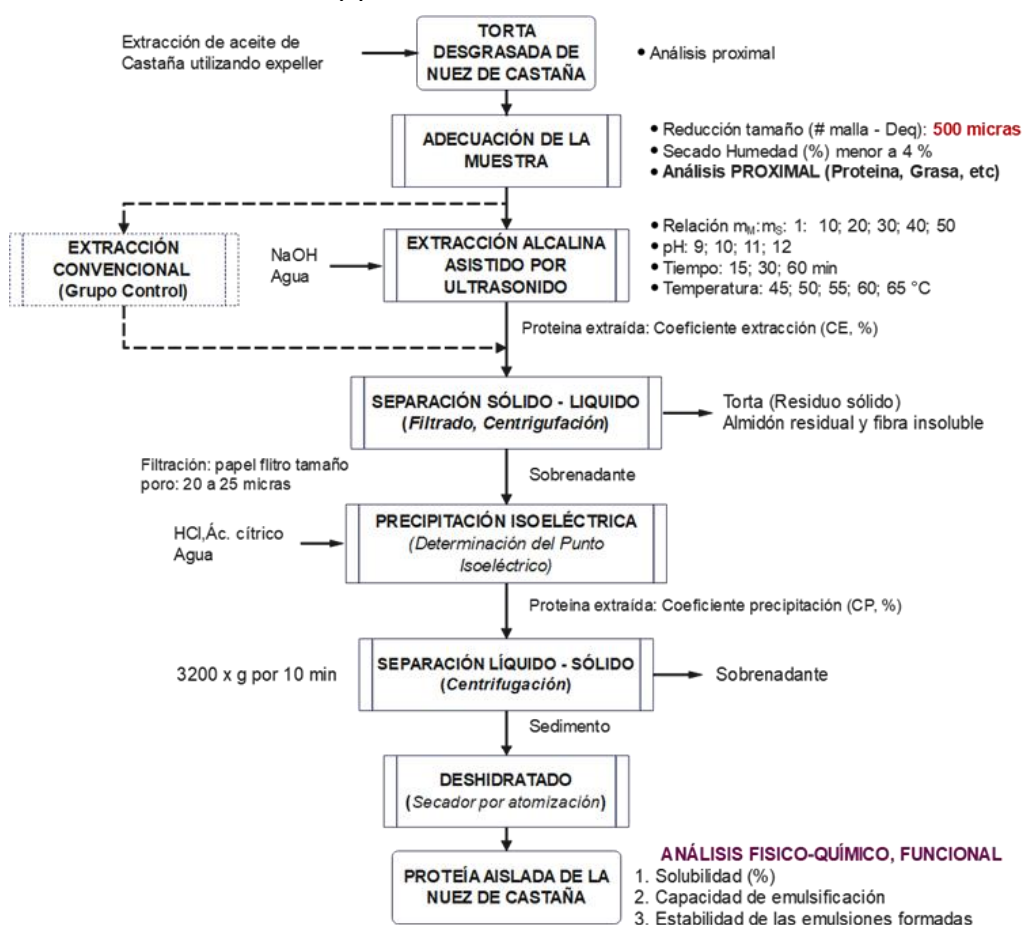
3.4.2 Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH), ACS reactante, $\pm 97,0$ %, pellets (anhidro), CAS 1310-73-2. Sixma aldrich, Merck peruana.
- Ácido clorhídrico (HCl), ACS reactante, 37%, CAS 7647-01-0. Sixma aldrich, Merck peruana.
- Hexano (C₆H₁₄), grado reactivo, $\pm 98,0$ %, CAS 110-54-3.
- Reactivo Folin-Ciocalteu, 2N. Sigma-aldrich N° F9252, para determinación de proteína por método Lowry.
- Albúmina de suero bovino. Grado $\geq 99\%$.
- Carbonato de sódio anhidro $\geq 99,5\%$, g. reactivo ACS, CAS 497-19-8.

- Sulfato cúprico, $\geq 99\%$, grado reactivo ACS, CAS 7758-98-7.
- Tartrato de Sodio, ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), CAS 6106-24-7. Estándar de referencia de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)
- Alcohol medicinal de 90°

3.4.3 Desarrollo experimental

Figura 12. Diagrama de bloques del desarrollo experimental para la extracción de proteína de la torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) por ultrasonido



Para establecer las condiciones operativas óptimas, fueron estadísticamente necesarios un conjunto de tratamientos considerados en la matriz de diseño expuesto en el ítem 3.5. Datos que permitieron representar el comportamiento del sistema, y a través de métodos de superficie respuesta y la función de deseabilidad determinar las mejores condiciones operativas.

La secuencia lógica para lograr obtener datos representativos se consideraron las siguientes actividades (Figura 12):

- a. Adquisición de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) calidad midget de la empresa Manutata, se llevó a la planta del CITE productivo ubicado en el Km 16.5 Carretera Puerto Maldonado – Cusco, Madre de Dios, Perú para su molienda y posteriormente se llevó a la planta piloto de Frutas y hortalizas de la UNAMAD, para la extracción de aceite y obtención de torta desgrasada;
- b. La torta desgrasada, se llevó a un proceso de deshidratación seguido de extracción de aceite remanente con hexano, utilizando métodos de soxhlet;
- c. Análisis proximal de la torta desgrasa con hexano: Humedad, proteína, grasa, carbohidratos, fibra y ceniza;
- d. Extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica (EAAU-PI) de la proteína de la torta desgrasada de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), según la matriz de diseño experimental;
- e. Separación de la torta y solución de proteína solubilizada por centrifugación;
- f. Precipitación isoeléctrica del sobrenadante (filtrado), con solución de ácido clorhídrico HCl al 1.0 M, variando el pH entre 4,5 – 5,0, según el procedimiento indicado por Hadidi et al. (2023) con algunas modificaciones.
- g. Separación del precipitado y la solución por centrifugación.
- h. Deshidratación del precipitado para obtener la proteína aislada en estado sólido. Para su mejor manejo, se procedió a la molienda y finalmente su almacenamiento a temperatura de 4 °C y su análisis posterior;
- i. Análisis físico-químico y funcional de la proteína aislada;

3.4.4 Métodos o procedimientos para utilizar

3.4.4.1 Material Experimental

La TDC se obtuvo mediante prensado mecánico de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*), calidad Midget, proporcionada por la empresa Manutata. La muestra fue transportada al laboratorio en bolsas doypack trilaminadas con lámina de aluminio y base plana, con una capacidad de 250 g, colocadas dentro de una caja térmica para garantizar el mantenimiento de la cadena de frío. La cantidad total de muestra recolectada fue de 1750 g.

3.4.4.2 Pretratamiento de la torta desgrasada por prensado mecánico.

La torta inicial de castaña (*Bertholletia excelsa*) (TCI) fue deshidratada en un secador de bandejas con circulación de aire convectivo a una temperatura de 60 °C, hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, la muestra se enfrió en una campana de desecación, para luego proceder a la reducción de tamaño y tamizado.

A continuación, la torta deshidratada fue sometida a un proceso de desgrasado mediante extracción Soxhlet, empleando hexano como solvente. Para cada muestra de 100 g, acondicionada en forma de cartucho, se utilizaron 250 mL de hexano, manteniendo el sistema a temperatura de ebullición durante 8 horas. Finalizado el proceso, la muestra desgrasada se colocó en una estufa a 40 °C con el objetivo de evaporar el solvente residual.

Este procedimiento se repitió hasta obtener la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo los procesos de extracción proteica y los análisis posteriores.

3.4.4.3 Análisis físico químico y funcional

A. El análisis proximal

El análisis proximal de la TDC se llevó a cabo en los laboratorios de bromatología de la UNA – Puno, siguiendo los métodos recomendados por la FAO Food and Nutrition Paper Vol 14/7, que se indican en la Tabla 7.

Tabla 7: Metodología del análisis proximal

Propiedad proximal (%)	Método AOAC
Humedad	934,06
Grasa	963,15
Proteína	990,03
Carbohidratos	985,29
Ceniza	923,03

B. Concentración y rendimiento de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó mediante el protocolo del método Folin-Ciocalteu fenol (Lowry et al. 1951; Oosta, Mathewson y Catravas 1978) basado en una curva de estandarización utilizando fenol Folin-Ciocalteu. El rendimiento de extracción de proteínas (η_{prot}) se calculará con la siguiente ecuación

$$\eta_{prot} (\%) = \frac{C_{PS} V_S}{10 m_p} \quad (3)$$

donde, η_{prot} es el rendimiento de extracción de la proteína (%),

C_{PS} , es la concentración de la proteína soluble en la solución de harina

De nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) (mg/L),

V_S , es el volumen de la solución de harina de la nuez (*Bertholletia excelsa*) (L) y

m_p , es la masa inicial de proteína en la muestra (mg) obtenida en el análisis proximal.

C. Capacidad de absorción de agua y aceite

Para la medición de la capacidad de absorción de agua y aceite, se pesó 0,5 g de Aislado proteico de castaña (APC) los cuales se mezcló con 5 mL de agua o aceite. La mezcla se agito durante 1 min y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron (1600 x g durante 25 min) y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se volvió a pesar la muestra y el agua o aceite absorbido, expresándose como g de aceite o agua/g de APC.

D. Propiedades emulsionantes

Las propiedades emulsionantes se evaluaron utilizando el protocolo descrito por Zhao et al. (2018), con modificaciones. En total, se colocaron 15 mL de solución de APC (1%) a pH 7 en un tubo Falcon de 50 mL de volumen y se homogenizo durante 15 s (mixer 12000 rpm). Luego se agregó lentamente 15 mL de aceite de soja y la mezcla se homogenizo nuevamente durante 1 min. La emulsión se centrifugo a 1300xG durante 5 min a temperatura ambiente. La capacidad emulsionante se calculó según la siguiente Ec. (Zhao et al. 2018),

$$\text{Capacidad emulsificante (\%)} = \left(\frac{V_{CEAC}}{V_{EDA}} \right) \times 100 \quad (5)$$

donde, V_{CEAC} , es el volumen de la capa emulsificada después de la centrifugación;

V_{EDA} es el volumen de emulsión antes de la centrifugación.

Para la determinación de la estabilidad emulsionante, la emulsión obtenida después de la homogeneización se calentó durante 30 min a 80 °C. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugo (1300 x G durante 5 min). La estabilidad emulsionante se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Estabilidad emulsionante (\%)} = \left(\frac{V_{CEACal}}{V_{EDA}} \right) \times 100 \quad (6)$$

donde, V_{CEACal} , es el volumen de la capa emulsificada después de calentamiento.

3.4.4.4 Establecimiento del punto isoelectrico para precipitación de la proteína solubilizada

El punto isoelectrico (pI) de las proteínas de la torta desgrasada de castaña (TDC) se determinó mediante el método de solubilidad mínima. Una suspensión de 50 g de TDC en 750 mL de agua destilada fue ajustada a pH 10,5 con NaOH 1 M para solubilización completa. Posteriormente, alícuotas de esta solución fueron acidificadas individualmente con HCl 1 M a valores de pH entre 3,0 y 5,4 (intervalos de 0,2 unidades). Tras 30 minutos de reposo para equilibrio de precipitación, las muestras fueron centrifugadas a 5000 ×

g durante 10 min. La concentración de proteína soluble en el sobrenadante se cuantificó por el método de Lowry (absorbancia a 500 nm).

El pI se definió como el pH de mínima solubilidad, determinado mediante el ajuste de los datos a modelos no lineales, para ello se realizará el uso de: modelo de picos extremos (ecuación 7), Gauss modificado (ecuación 8) y polinomio de grado superior (ecuación 9), seleccionándose el modelo con mejor ajuste para estimar el valor crítico.

Modelo de picos extremos:

$$y = y_0 + A \exp[-\exp(-z) - z + 1]$$

$$z = \frac{x - x_c}{w} \quad (7)$$

Donde:

y es la proteína precipitada (%)

x es el pH de la solución

Modelo de Gauss modificado:

$$f(x) = y_0 + (f_1 \times f_2) x$$

$$f(x) = y_0 + \frac{A}{t_0} e^{\left[\left(\frac{1}{2} \right) \left(\frac{w}{t_0} \right)^2 - \left(\frac{x - x_c}{t_0} \right) \right]} \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{\left(-\frac{y^2}{2} \right)} dy \quad (8)$$

$$f_1(x) = \frac{A}{t_0} \exp\left(-\frac{x}{t_0} \right)$$

$$f_2(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} w} \exp\left[-\frac{(x - x_c)^2}{2w^2} \right]$$

Modelo polinómico de grado superior

$$y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 + a_3 x^3 + a_4 x^4 + a_5 x^5 + a_6 x^6 + a_7 x^7 + a_8 x^8 + a_9 x^9 \quad (9)$$

Donde,

y es la proteína precipitada (%)

x es el pH de la solución

a_0, a_1, K, a_8, a_9 , son los coeficientes del modelo

3.4.4.5 Rendimiento proteico del proceso de extracción asistido por ultrasonido

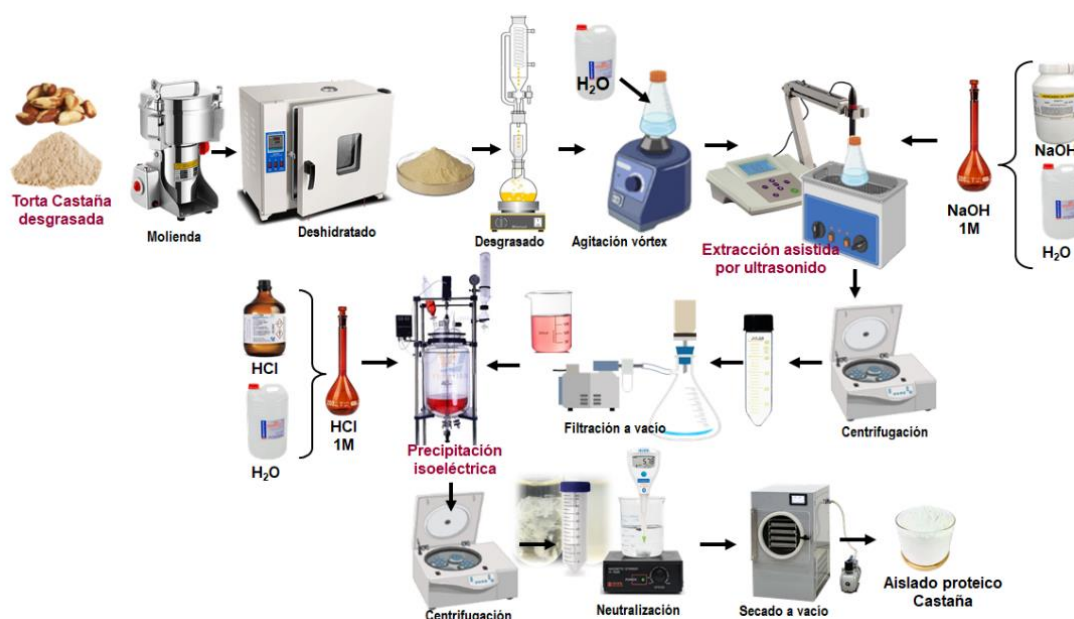
Las tres fracciones del proceso de extracción (bagazo, cuajada proteica y suero) se obtuvieron, se pesó y se analizaron el porcentaje de humedad y proteína siguiendo los procedimientos descritos en la Sección 2.4.2. Luego se calculó el rendimiento de proteína empleando la ecuación (10).

$$\text{Rendimiento en proteína (\%)} = \frac{\text{Fracción peso proteína (g)}}{\text{Peso de harina desgrasada (g)}} \times 100 \quad (10)$$

3.4.4.6 Extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica (EAAU-PI)

La extracción alcalina asistido con ultrasonido de la harina desgrasada de torta de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*), se realizó de acuerdo con métodos descritos por Domínguez et al., (2023) y Golly et al., (2020) con algunas modificaciones y descritos en la Figura 14 que resume las operaciones tradicionales (descrito en el ítem 3.4.4.5) y a EAU en este estudio.

Figura 13. Representación esquemática de extracción alcalina asistido por ultrasonido seguido de precipitación isoeléctrica de harina de torta de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) desgrasada



Para la AEEU, la harina de torta de Nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) utilizado fue de 25 g para cada tratamiento, el cual se trasvasó en un vaso de precipitado de 500 mL y se procedió a reconstituirse con agua destilada agitando suavemente con la asistencia de un agitador magnético, posteriormente se ajustó el pH de la solución a 8, 9, 10, 11 y 12 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M según la matriz de diseño (Tabla 10), consiguiéndose una relación de masa harina desgrasada (g) a volumen de solución (mL) de 1: 5; 1:10; 1:15; 1:20 y 1:25.

La solución preparada fue sumergido al baño de ultrasonido. Previos a la acción de ultrasonido, el baño se acondicionó a temperaturas de 20, 30, 40,50 y 60 °C. Una vez alcanzado el equilibrio térmico entre el baño y la solución, la muestra fue sujeto al efecto de ultrasonido por lapsos de tiempo de 15, 20, 25, 30 y 35 min.

Las suspensiones extraídas en cada tratamiento se enfriaron a 25 ± 2 °C y luego procedió a centrifugado (4500 rpm x 10 min), recuperándose el sobrenadante para determinar la concentración de proteína y calcular el rendimiento de proteína. Posteriormente el resto del sobrenadante se precipitó ajustando el pH a 4,5 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M por un lapso de 8 horas a 4 °C. La solución de proteína se centrifugo (4500 rpm x 20 min) y el precipitado se recuperó.

La proteína extraída de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) se deshidrató en un secador a 50°C durante 3 horas y se conservó en frascos acaramelados a 4°C para su posterior análisis físico-químico y funcional.

3.5 Tratamiento de los datos

Para establecer las condiciones operativas óptima de EAAU-PI que maximice las propiedades funcionales y rendimiento de proteína extraída de la TDC, se usó el método de superficie respuesta, diseño compuesto central (CCD) (Mongomery 2017; Vera Candiotti et al. 2014). Es un método sistemático y eficiente para determinar de parámetros multivariantes con múltiples respuestas. Las Características de los CCD son:

1. Una porción factorial, consistiendo en un diseño factorial completo a dos niveles, usando valores ± 1 .
2. Una porción axial consistiendo en $\pm\alpha$ pares de puntos, consistiendo en puntos asimétricos respecto a una distancia.
3. Puntos centrales n_0 con replicaciones

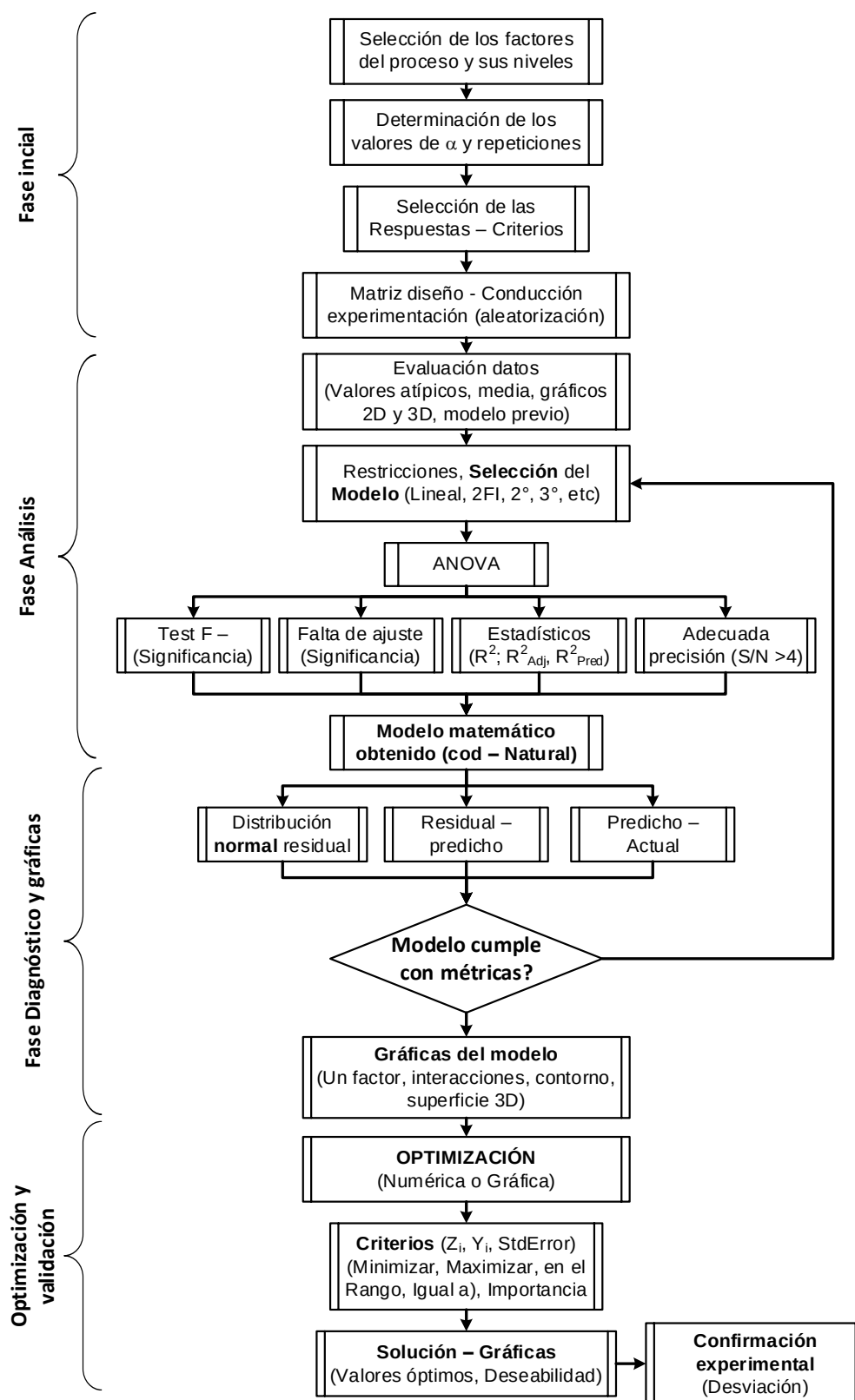
El número de experimentos se estableció a través de la siguiente ecuación:

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (11)$$

El objetivo consistió en seleccionar la mejor combinación de los parámetros de control, de modo que el producto o proceso es más robusto con respecto a los factores de ruido. Se utilizó el software Design Expert V. 13. El método CCD, utiliza un modelo polinómico de orden superior (segundo, tercera, etc.), según la siguiente ecuación,

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=0}^k \beta_j Z_j + \sum_{i=0; j \neq i}^k \beta_{ij} Z_{ij} + \sum_{j=0}^k \beta_{jj} Z_j^2 + \varepsilon_{ji} \quad (12)$$

Figura 14. Diagrama de bloques de la metodología de estudios con DCC



En este estudio, para cada uno de las técnicas de extracción, los parámetros considerados se indican en la matriz de factores, Tabla 8.

Un estudio sistemático con el método CCD, utiliza cuatro fases: Inicial, análisis, diagnósticos y gráficas y la optimización – validación de estudios, las mismas que se muestran en la Fig. 15. Por otro lado, los niveles de variación de las variables o factores considerados en el estudio se muestran en las Tablas 8. La matriz de respuesta y matriz de diseño representando las variables a escala natural se muestran en las Tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 8: Variables independientes y niveles

Factor	Nombre	Unidades	Niveles			Desviación estándar
			Inferior (- 1)	Central (0)	Superior (+)	
Z ₁	pH		9	10	11	0,91
Z ₂	Relación masa muestra:volu- men solución	g:mL	10	15	20	4,55
Z ₃	Tiempo sonicación	min	20	25	30	4,55
Z ₄	Temperatura extracción	°C	30	40	50	9,10

Tabla 9: Matriz de respuestas

Factor	Nombre	Unidades
Y ₁	Rendimiento en proteína extraída	g/100 g b.s
Y ₂	Proteína total en el APC	%
Y ₃	Solubilidad de la proteína aislada	%
Y ₄	Capacidad emulsificante	%
Y ₅	Estabilidad de la emulsión	%

Tabla 10: Matriz de diseño para la extracción alcalina asistido por ultrasonido

Run	pH solución	Relación Mm:Vs (g;mL)	Tiempo sonicación (min)	Temperatura extracción (°C)
1	10	5	25	40
2	10	25	25	40
3	10	15	25	60
4	12	15	25	40
5	9	10	30	30
6	11	20	20	50
7	10	15	25	40
8	9	20	30	50
9	9	10	20	50
10	11	10	30	30
11	10	15	25	20
12	9	20	20	50
13	10	15	25	40
14	10	15	25	40
15	11	10	20	30
16	10	15	25	40
17	10	15	15	40
18	11	20	30	30
19	9	20	30	30
20	11	20	20	30
21	11	10	30	50
22	11	10	20	50
23	9	10	30	50
24	9	20	20	30
25	11	20	30	50
26	8	15	25	40
27	10	15	35	40
28	10	15	25	40
29	9	10	20	30
30	10	15	25	40

Por otro lado, para la precipitación isoelectrica se llevó a cabo un plan experimental con el objetivo de establecer el pI basado en las características de las proteínas contenidas en la nuez de Castaña, según las corridas experimentales de la Tabla 11, desarrolladas por triplicado.

Tabla 11: Plan experimental para la precipitación isoelectrica

N°	pH	Grado de precipitación (%)		
		R1	R2	R3
1	3,0			
2	3,2			
3	3,4			
4	3,6			
5	3,8			
6	4,0			
7	4,2			
8	4,4			
9	4,6			
10	4,8			
11	5,0			
12	5,2			
13	5,4			

La evaluación y validación del modelo de ajuste, Ec.11 se realizó utilizando el ANOVA antes de la predicción, para garantizar que el modelo matemático proporcione una aproximación adecuada del comportamiento de respuesta real. Las expresiones ANOVA para el modelo de regresión se resumen en la Tabla 12 (Li, Lu y Gao 2021; Montgomery 2020).

La precisión general del modelo predicho se describirá mediante el coeficiente de determinación R^2 , que se calcula de la siguiente manera:

$$R^2 = \frac{SC_M}{SC_T} = 1 - \frac{SC_{Res}}{SC_T} \quad (13)$$

El valor de R^2 varía entre 0 y 1. Para el modelo predicho con buena precisión, el valor de R^2 es cercano a 1. Después de considerar el número de términos del modelo, se puede obtener un parámetro estadístico ajustado, R_{Adj}^2 ,

$$R_{Adj}^2 = 1 - \frac{MC_{Res}}{MC_T} = 1 - \frac{SC_{Res}/(n-p)}{SC_T/(n-1)} \quad (14)$$

El valor de R_{Adj}^2 disminuye a medida que aumentan las variables estadísticamente insignificantes en el modelo. Las diferencias entre los valores predichos y reales se definen como errores residuales, que desempeñan un papel fundamental en la evaluación de la precisión del modelo. Otro estadístico utilizado para medir la capacidad predictiva del modelo se expresa de la siguiente manera:

$$R_{Pred}^2 = 1 - \frac{SC_{Pred}}{SC_T} \quad (15)$$

El valor de R_{Pred}^2 y R_{Adj}^2 debe estar dentro de 0,2.

Tabla 12: Análisis ANOVA

Fuente de varianza	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de cuadrados	F_{obs}
Regresión	$SS_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MS_{reg} = \frac{SS_{reg}}{p - 1}$	$\frac{MS_{reg}}{MS_{res}}$
Residual	$SS_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{n - p}$	
Falta de ajuste	$SS_{lof} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$m - p$	$MS_{lof} = \frac{SS_{lof}}{m - p}$	$\frac{MS_{lof}}{MS_{puro}}$
Error puro	$SS_{puro} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MS_{puro} = \frac{SS_{puro}}{n - m}$	
Total	$SS_{total} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$		

La **función de deseabilidad** es otro método útil para optimizar múltiples respuestas simultáneamente. Por tanto, este enfoque tiende a satisfacer cada respuesta deseable lo antes posible sin comprometer excesivamente ninguna

especificación de rendimiento. En general, para maximizar el rendimiento η_{SFP} en AE extraído por HD y DES, la deseabilidad individual $d_j(\mathbf{z})$ es

$$d_j(\mathbf{z}) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y}_j(\mathbf{z}) \leq y_j^{\min} \\ \left(\frac{\hat{y}_j(\mathbf{z}) - y_j^{\max}}{y_j^{\max} - y_j^{\min}} \right)^{s_j} & \text{si } y_j^{\min} \leq \hat{y}_j(\mathbf{z}) \leq y_j^{\max} \\ 1 & \text{si } \hat{y}_j(\mathbf{z}) \geq y_j^{\max} \end{cases} \quad (16)$$

Mientras que para minimizar la relación del contenido de terpeno: terpenoide en el aceite esencial obtenido, la deseabilidad individual es,

$$d_j(\mathbf{z}) = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y}_j(\mathbf{z}) \leq y_j^{\min} \\ \left(\frac{y_j^{\min} - \hat{y}_j(\mathbf{z})}{y_j^{\max} - y_j^{\min}} \right)^{t_j} & \text{si } y_j^{\min} \leq \hat{y}_j(\mathbf{z}) \leq y_j^{\max} \\ 0 & \text{si } \hat{y}_j(\mathbf{z}) \geq y_j^{\max} \end{cases} \quad (17)$$

donde $y_j^{\min}$ y $y_j^{\max}$ denotan los valores mínimos y máximos para $\hat{y}_j$, respectivamente. Los parámetros s_j y t_j determinan la forma de la función de deseabilidad. La deseabilidad general (D), al cual se incorpora los pesos, basada en el concepto de la media geométrica, se determina con la siguiente ecuación:

$$D(\mathbf{z}) = \left(d_1^{w_j} \times d_2^{w_j} \times d_3^{w_j} \times d_4^{w_j} \right)^{\frac{1}{\sum_{j=1}^m w_j}} = \left[\prod_{j=1}^m d_j(\mathbf{z})^{w_j} \right]^{\frac{1}{\sum_{j=1}^m w_j}} \quad (18)$$

donde, w_j un peso relativo entre m respuestas.

CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

4.1 Aspectos generales

4.1.1 Procedencia de la muestra.

Las nueces de Castaña (*Bertholletia excelsa*) fueron adquiridas de la empresa Manutata SA, ubicado en la Carretera Iberia Km 4, Fundo San Fernando (Margen Izquierdo-Cruce la Cachuela), ubicado 12°33'31.1"S 69°09'40.2"W, a una altitud de 191 m S.N.M, latitud de -12,5586° a una temperatura máxima de 35 °C y temperatura mínima de 24°C con una humedad relativa promedio de 83% y con gravead local de 9,78m/s². Las muestras se trasladaron al Laboratorio de investigación de ingeniería agroindustrial (SL01 A-127) de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, ubicado 12° 35' 19.726"S 69° 12' 32.09"W, a una altitud de 207 m S.N.M, latitud de -12,5888° a una temperatura máxima de 34°C y temperatura mínima de 24°C con una humedad relativa promedio de 83% y gravedad local de 9.78 m/s² donde se realizó la adecuación de las muestras para la investigación.

4.1.2 Pre-tratamiento de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) previo al desgrasado

En esta etapa se realizó la separación nueces con algunas señales de daños físicos y posteriormente se procedió al laminado para el desgrasado posterior por prensado hidráulico en frio, llevado a cabo en la Planta Piloto de frutas de la UNAMAD ubicado 12° 35' 17"S 69° 12' 36"W., a una altitud de 206 m S.N.M, latitud de -12,5881° a una temperatura máxima de 34°C y

temperatura mínima de 24°C con una humedad relativa promedio de 83% y con gravedad local de 9.78 m/s².

4.1.3 Desgrasado mediante presado hidráulico en frío de la nuez de Castaña

Las muestras particuladas de nuez se sometieron a desgrasado por presado hidráulico en frío, a una presión constante de 1200 psi con muestras de 4,55 a 4,87 Kg cada lote con tiempo de 15 minutos a la presión máxima. Los datos de las masas extraídas en cada ensayo se muestran en la Tabla 13.

De los 18,87 Kg de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) se han obtenido 7,835 Kg de torta con un promedio de $1,9589 \pm 0,039$ Kg de torta en cada prensado. La cantidad de aceite en bruto extraído fue de 10,815 Litros con 7,14 % partículas suspendidas y un promedio de $2,7039 \pm 0,0368$ Litros de aceite en bruto por lote, que corresponden a un rendimiento en aceite extraído de $53,2236 \pm 0,3994$ % en volumen/peso de aceite filtrado.

Tabla 13: Datos del desgrasado de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*).

N°	Muestra inicial (Kg)	Torta desgrasada (Kg)	Aceite en bruto extraído (L)	Rendimiento Aceite filtrado (% v/p)
1	4,55	1,84	2,653	54,145
2	4,75	1,98	2,714	53,053
3	4,70	2,00	2,644	52,234
4	4,87	2,01	2,804	53,4625
	18,87	7,83	10,815	53,2236

4.1.4 Desgrasado de la harina por el método soxhlet

Previo al desgrasado final con solvente, la torta proveniente del presado hidráulico se deshidrató en una estufa con aire convectivo a temperatura de 60 °C hasta que las muestras permanecieran con peso constante. Posteriormente, estas muestras se enfriaron en una campana desecadora hasta alcanzar la temperatura ambiente (Aprox. 28 °C). La torta desgrasada

se sometió a molienda en un molino de cuchillas hasta lograr harina con un tamaño de partícula de malla 80 según la serie Tyler.

Para la extracción con soxhlet, se utilizaron aprox. 100 g de harina de torta y se procedió a desgrasar en un equipo soxhlet de 250 mL con hexano como solvente. Cada muestra se extrajo por un lapso de 5 horas (10 batch)

Tabla 14: Desgrasado de la harina de nuez de castaña por método Soxhlet

Nº	Muestra inicial (g)	Hexano (mL)	Muestra desgrasada desolventizado (g)
1	100,0	150	78,03
2	100,0	150	74,48
3	100,0	150	79,36
4	100,0	150	85,03
5	100,0	150	87,7

4.2 Caracterización proximal de la harina desgrasada de nuez de castaña

En la Tabla 15 se presenta la caracterización de análisis proximal la TDC en base húmeda.

Tabla 15: Análisis proximal de la torta desgrasada de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).

ENSAYOS REALIZADOS	UNIDADES	Laboratorio bromatología UNA-Puno
Humedad	%	4,49
Grasas	%	7,51
Proteínas	%	50,5
Carbohidratos	%	16,5
Fibra cruda	%	10,9
Cenizas	%	10,0

La TDC presentó una composición caracterizada por alto contenido de proteína (50,5%), grasa residual moderada (7,51%), fibra cruda (10,9%), carbohidratos

(16,5%), cenizas elevadas (10,0%) y baja humedad (4,49%), lo que confirma su naturaleza altamente concentrada en nutrientes tras la remoción parcial de lípidos. Comparativamente, estos valores son superiores a los reportados para tortas desgrasadas de soya (40–48% de proteína), maní (45–50%) y almendra (~40%), y similares a la torta de nuez de castaña desgrasada reportada en la literatura, lo que evidencia el potencial de la nuez de castaña como una fuente proteica vegetal competitiva en términos tecnológicos y nutricionales. El contenido de grasa residual es mayor al de tortas sometidas a extracción exhaustiva con solventes (<5%), lo cual puede atribuirse a las operaciones combinadas de prensado hidráulico y Soxhlet aplicadas al material, mientras que la fracción de fibra cruda y cenizas supera a la de otras semillas oleaginosas, reflejando la riqueza mineral característica de la castaña amazónica, especialmente en selenio, magnesio y hierro.

4.3 Curva de calibración para el análisis de proteína por método Lowry

La curva de calibración para el análisis de proteína por el método Lowry se construyó empleando albúmina sérica bovina (BSA) en el rango 0,0311–0,1246 mg·mL⁻¹, con la ecuación lineal obtenida, Ec. 19, y parámetros estadísticos que indican una excelente ajustabilidad del modelo ($R^2 = 0,99321$; R^2 ajustada = 0,99095; SCR = $3.82 \cdot 10^{-5}$).

Tabla 16: Curva de calibración

Nº	Concentración proteína de albumina bovina (mg/mL)	Lectura Absorbancia (%)
1	0,0311	0,2393 ± 0,01069
2	0,0467	0.2860 ± 0,008613
3	0,0623	0.3341 ± 0,008650
4	0,0934	0.4044 ± 0,010789
5	0,1246	0.4703 ± 0,015050

Estos resultados demuestran una respuesta altamente lineal y sensibilidad adecuada de la técnica en el rango evaluado, aunque el intercepto

ligeramente negativo sugiere la necesidad de control riguroso del blanco y verificación del cero instrumenta antes de cada corrida para evitar sesgos sistemáticos en lecturas próximas al límite inferior de la curva.

Figura 15. Curva patrón de la concentración de proteína de albúmina bovina (mg/mL) y la absorbancia (%) a 500 nm.

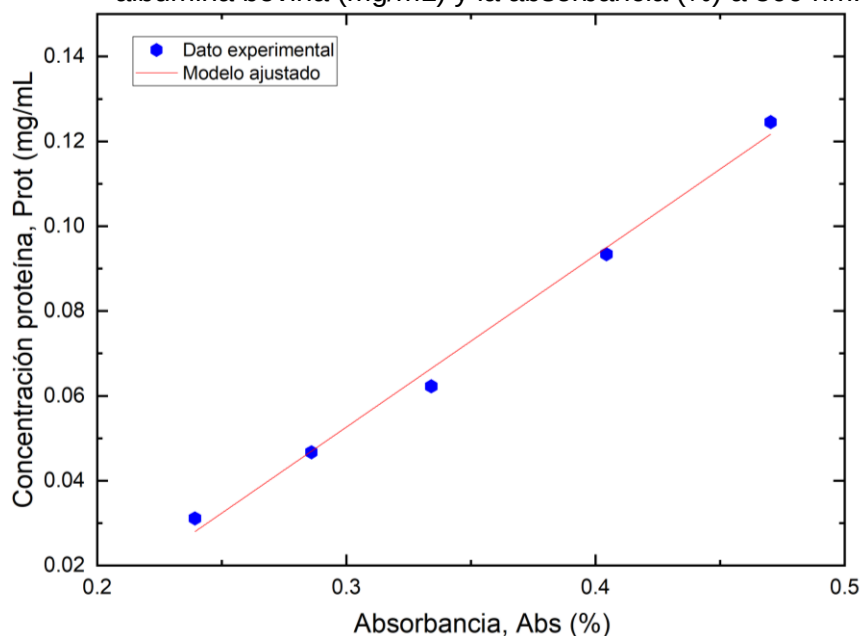


Tabla 17: Valores estadísticos para la curva patrón de de proteína de albúmina bovina (mg/mL) y la absorbancia (%) a 500 nm.

Parámetros	Valor	Error estándar	Valor t	Prob> t	Dependencia
A	0,06899	0,0069	10,00301	0,00213	0,94652
B	0,4054	0,01935	20,95589	2,38E-04	0,94652
ξ^2	1,27E-05				
SCR	3,82E-05				
R^2 (COD)	0,99321				
R^2_{Adj}	0,99095				

$$\text{Prot} = -0,06899 + 0,4054 \text{ Abs} \quad (19)$$

La selección del rango de trabajo ($\approx 0,03\text{--}0,12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) es coherente con adaptaciones contemporáneas del método Lowry para matrices alimentarias y extractos proteicos donde se busca alta sensibilidad y mínima interferencia (Lowry et al., 1951; Oosta et al., 1978), y es comparable a rangos y coeficientes de correlación reportados en estudios de extracción de proteínas asistida por ultrasonido y métodos alcalinos (p. ej. Wang et al., 2020), que también informan $R^2 > 0,99$ cuando la curva se prepara y controla adecuadamente.

4.4 Determinación del punto de precipitación isoelectrica de las proteínas de la harina de torta desgrasada de la nuez de castaña

Considerando que el punto isoelectrico (PI) de una proteína vegetal es el valor de pH al cual su carga neta superficial es cero, que dependen directamente de la composición en aminoácidos, particularmente de los residuos con cadenas laterales ionizables como aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico con carga negativa a pH fisiológico) y los aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina con carga positiva a pH fisiológico) y otros grupos ionizables (incluidos los fosfatos, carbohidratos unidos covalentemente).

Los datos experimentales se ajustaron a modelos polinómico, función de gauss y función de pico, cuyos coeficientes y estadísticos se pueden apreciar en la Tabla 18.

Los modelos matemáticos que estima el PI para la precipitación de la proteína de torta de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*), cuyos parámetros se muestran en la Tabla 18 son:

$$y = 9,274 + 74,202 \exp[-\exp(-z) - z + 1] \quad (12)$$

$$z = \frac{(x - 4,644)}{0,6227}$$

donde, y es la proteína precipitada (%)

x es el pH de la solución

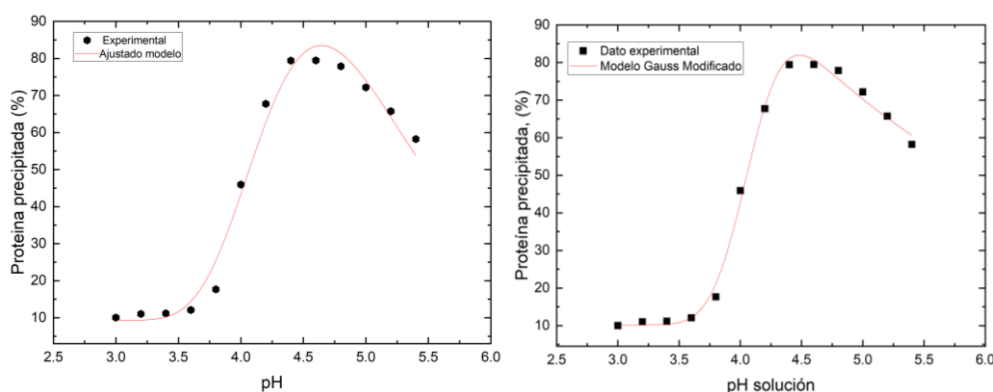
Basado en el modelo de función de picos del tipo extremo, la $d^2y/dx^2 = 0$ proporciona el valor del pH en el cual el % proteína es un máximo, siendo esta aproximadamente a 4,5. Este valor se considera como el punto de precipitación isoelectrica para la proteína en la torta desgrasada de la nuez de Castaña.

Tabla 18: Datos experimentales de PI ajustado a diferentes modelos estadísticos.

Modelo	Parámetro	Valor	Error estándar
Modelo de picos $y = y_0 + A \exp[-\exp(-z) - z + 1]$ $z = \frac{x - x_c}{w}$ Donde, y es la proteína precipitada (%) x es el pH de la solución	y_0	9,27437	2,45029
	x_c	4,64416	0,02806
	w	0,62268	0,03977
	A	74,20218	3,10584
	χ^2	17,659	
	RSS	158,9281	
	R^2	0,985	
Modelo de Gauss modificado $f(x) = y_0 + (f_1 \times f_2)x$ $f(x) = y_0 + \frac{A}{t_0} e^{\left[\left(\frac{1}{2}\right)\left(\frac{w}{t_0}\right)^2 - \left(\frac{x - x_c}{t_0}\right)\right]} \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{\left(-\frac{y^2}{2}\right)} dy$ $f_1(x) = \frac{A}{t_0} \exp\left(-\frac{x}{t_0}\right)$ $f_2(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}w} \exp\left[-\frac{(x - x_c)^2}{2w^2}\right]$	y_0	10,14224	1,24722
	A	206,539	21,3189
	x_c	4,06474	0,01864
	w	0,23393	0,02161
	t_0	2,2998	0,34286
	χ^2	5.27419	
	RSS	42,1936	
Modelo polinómico de grado superior $y = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + a_4x^4 + a_5x^5 + a_6x^6 + a_7x^7 + a_8x^8 + a_9x^9$	R^2	0,99603	
	R_{Adj}^2	0,99404	
	a_0	1,72E+07	498060,95
	a_1	-3,62E+07	889632,11
	a_2	3,37E+07	675458,35

Donde,	a_3	-1,81E+07	286116,17
y es la proteína precipitada (%)	a_4	6182411,854	79252,089
x es el pH de la solución	a_5	-1395694,04	18380,32
a_0, a_1, K, a_8, a_9 , son los	a_6	207978,3549	3750,458
coeficientes del modelo	a_7	-19722,460	520,174
	a_8	1079,70724	40,484
	a_9	-25,98936	1,3377
	χ^2	6,83772	
	RSS	20,51317	
	R^2	0,99807	
	R^2_{Adj}	0,99228	

Figura 16. Curva de precipitación isoelectrica de la proteína de torta de *B. excelsa*.



4.5 Extracción alcalina de proteína de la torta desgrasada de castaña por ultrasonido y precipitación isoelectrica

Los resultados de la extracción de proteína de la torta desgrasada de la nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) se muestra en la Tabla 19. Se puede apreciar que el rendimiento global de extracción de proteína (η , % b.s.) presentó una media de $24,24\% \pm 0,544$, con una desviación estándar de 2,978%, lo que indica una variabilidad moderada en los tratamientos experimentales. El valor mínimo fue de 17,48% a un pH de 9, una relación

Mm:Vs 10 g/mL, desarrollado en un tiempo de 30 min a una temperatura de 30 °C (Tratamiento 5) y el máximo de 29,07% cuando las condiciones operativas fueron de pH, la relación Mm:Vs 10 g/mL, el tiempo y la temperatura fueron de 11, 20 g/mL, 30 min y 30 °C respectivamente (Tratamiento 18), evidenciando que el cambio de pH y la relación Mm:Vs en los niveles de estudio tiene efectos significativos en la liberación de proteínas de la matriz vegetal (Figura 19). La varianza indica que en promedio los datos se separan 8,86 unidades cuadráticas de la media. Por otro lado, se observa una variabilidad moderada alrededor de la media (coeficiente de variación 12,3% según Tabla 20, aunque en ANOVA se reportó 4,27% que corresponde al modelo ajustado). En promedio, los datos se desvían 2,389 g PC/100 g absolutas respecto a la media.

La eficiencia de extracción alcalina (ξ) mostró una media del 87,95%, con un coeficiente de variación (C.V.) del 7,5%, indicando una alta consistencia en la solubilización proteica bajo condiciones alcalinas.

Las propiedades funcionales de la proteína extraída, como la capacidad emulsificante (CE) una media de $59,436 \pm 1,431$ % con una variabilidad y desviación estándar de 13,2% y 7,8 %, lo que nos variabilidad moderadas el rededor de la media y entre tratamientos experimentales. La máxima CE fue de 73,889%, cuando las condiciones operativas Z_1 , Z_2 , Z_3 y Z_4 fueron de 11, 20 g/mL, 30 min y 50 °C respectivamente, mientras que un mínimo 48,125% (Tratamiento 25) cuando Z_1 , Z_2 , Z_3 y Z_4 fueron de 8, 15 g/mL, 25 min y 40 °C respectivamente, tal como se puede apreciar en la Tabla 20. La Estabilidad emulsificante (EE) medio fue de $56,144 \pm 1,247$ %, con mínimos y máximos de 45,833 y 67,780 % respectivamente.

Tabla 19: Resultados de los tratamientos experimentales

N°	Rendimiento global η (% b.s)	Eficiencia extracción alcalina ξ (%)	Capacidad emulsificante CE (%)	Estabilidad emulsificante EE (%)	Capacidad de absorción de agua AAg (g agua/g APC)	Capacidad de absorción de aceite AA (g aceite/g APC)
1	20,3	83,4	58,7	56,0	2,5	2,6
2	26,5	85,6	67,3	61,5	2,4	2,7
3	24,3	87,2	58,4	55,0	2,3	2,8
4	27,4	87,7	69,9	65,8	2,4	2,8
5	17,5	84,2	49,3	47,5	2,4	2,5
6	27,3	87,3	67,6	63,2	2,6	2,7
7	23,2	84,6	63,7	60,7	2,4	2,7
8	25,6	83,5	61,6	60,0	2,3	2,7
9	18,7	86,4	49,8	48,8	2,3	2,5
10	23,4	86,8	72,2	67,4	2,4	2,8
11	20,9	84,3	48,7	46,0	2,2	2,5
12	21,2	77,5	54,5	50,7	2,2	2,6
13	25,9	97,5	50,8	50,0	2,4	2,5
14	24,6	89,9	53,1	50,4	2,4	2,5
15	25,5	74,1	60,0	59,1	2,3	2,6
16	23,6	96,1	61,4	59,6	2,5	2,6
17	24,3	86,8	50,0	49,4	2,4	2,5
18	29,1	98,7	73,9	67,8	2,6	2,8
19	25,5	88,6	53,5	50,6	2,2	2,5
20	22,6	77,1	61,7	60,6	2,4	2,7
21	28,2	97,5	66,7	61,2	2,3	2,7
22	26,9	98,5	66,7	61,1	2,4	2,7
23	22,5	76,4	58,3	54,5	2,2	2,6
24	23,6	93,0	58,3	53,0	2,1	2,6
25	28,5	89,8	73,7	67,8	2,7	2,8
26	22,6	86,3	48,1	45,8	2,3	2,4
27	27,8	92,3	59,5	57,2	2,3	2,6
28	26,3	95,3	59,0	56,4	2,2	2,6
29	19,7	91,8	48,4	46,0	2,3	2,4
30	23,6	90,3	58,2	51,3	2,3	2,6

Figura 17. Variación de Z1, Z3 y Z4 con el rendimiento global de extracción de proteínas de la torta de *B. excelsa*

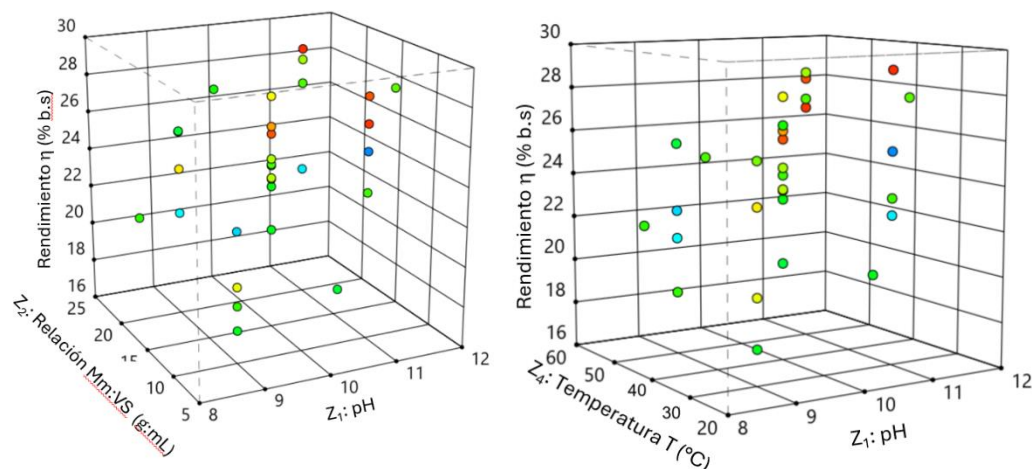


Tabla 20: Datos estadísticos descriptivos de los resultados

Factor	Media	Desv. estándar	Error estándar	Variancia (σ^2)	Coe- ficiente de varia- ción (CV)	Desvia- ción media absolu- ta	Míni- mo	Máxi- mo
η (% b.s)	24,24	2,98	0,54	8,87	0,12	2,39	17,48	29,07
ξ (%)	87,95	6,56	1,19	43,02	0,08	5,07	74,09	98,68
CE (%)	59,43	7,84	1,43	61,47	0,13	6,25	48,13	73,88
EE (%)	56,14	6,83	1,25	46,68	0,12	5,82	45,83	67,78
AAG	2,36	0,12	0,02	0,02	0,05	0,09	2,13	2,70
AA	2,62	0,12	0,02	0,01	0,05	0,09	2,35	2,79

Estos datos reflejan que la proteína extraída tiene una alta capacidad para formar emulsiones, de cada 100 unidades posibles de superficie de aceite, casi 73,89 son cubiertas y estabilizadas por la proteína. Las proteínas vegetales suelen tener valores de CE en el rango de 40–80 %, y proteínas animales (ej. suero, caseína) pueden estar en 70–90 %, resultados que acerca a la proteína aislada de la torta desgrasada de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) al de los lácteos, considerándose como muy prometedor para

aplicaciones alimentarias (bebidas vegetales, emulsiones cárnicas, etc.). Así mismo, la emulsión formada por la proteína obtenida es moderadamente estable en el tiempo, aproximadamente el 67,8 % de la emulsión inicial mantiene su estabilidad sin desestabilizarse (coalescer o separarse), toda vez que valores >70 % indican muy buena estabilidad, mientras que <50 % se consideran emulsiones inestables.

La capacidad de absorción de agua (AAG) y de aceite (AAC) fueron, en promedio, de $2,355 \pm 0,02$ g agua/g proteína y $2,623 \pm 0,021$ g aceite/g proteína, respectivamente. Los valores mínimos y máximos de la AAG fueron 2,132 y 2,704 g/g (tratamientos 24 y 25), mientras que para la AAC se registraron 2,352 y 2,792 g/g, respectivamente (tratamientos 26 y 25). En ambos casos se observó que el pH tuvo un efecto altamente significativo. Las desviaciones estándar fueron bajas, lo que indica una reducida variabilidad en torno a la media y entre los tratamientos experimentales (Tabla 20).

Tabla 21: Prueba de normalidad de las variables respuesta (test de Shapiro-Wilk)

	DF	Statistic	p-value
Rendimiento global	30	0,97326	0,63178
Eficiencia extracción	30	0,9594	0,29897
Capacidad emulsificante	30	0,94463	0,12127
Estabilidad emulsificante	30	0,94528	0,12624
Capacidad absorción de agua	30	0,96131	0,3344
Capacidad absorción de aceite	30	0,96008	0,31118

La AAG, definida como la capacidad de las proteínas para retener agua en su estructura (a través de enlaces de hidrógeno, grupos polares y cavidades internas), está funcionalmente relacionada con la hidratación, la viscosidad y la gelificación en matrices alimentarias. El valor reportado en esta tesis es comparable al de la proteína de soya, lo que sugiere un potencial para mejorar la viscosidad, cohesión y rendimiento en productos como hamburguesas vegetales, panificación y sopas instantáneas.

Por su parte, la AAC corresponde a la capacidad de la proteína para retener lípidos en su matriz (mediante interacciones hidrofóbicas con aminoácidos no polares), un comportamiento relevante para la retención de sabor, textura, untuosidad y aplicaciones en productos cárnicos y panificados. La proteína de castaña obtenida mostró valores en el rango máximo reportado para la soya, lo que permite inferir su alta aplicabilidad en la industria alimentaria.

Previo a los análisis estadísticos predictivos, los resultados (Tabla 19) fueron sometidos a pruebas de normalidad de Shapiro–Wilk (Tabla 21). Los valores- p obtenidos para todas las variables respuesta ($p > 0,05$) indican que no se puede rechazar la hipótesis nula de normalidad. Esto confirma que los datos experimentales para el rendimiento (η), eficiencia (ξ), capacidad emulsificante (CE), estabilidad emulsificante (EE), absorción de agua (AAG) y absorción de aceite (AAC) se distribuyen normalmente, cumpliendo un supuesto fundamental para la validez del posterior Análisis de Varianza (ANOVA). Esto respalda la aplicación de modelos basados en mínimos cuadrados. Asimismo, para los residuales del modelo matemático de rendimiento de extracción, los tests de Shapiro–Wilk ($p = 0,3006$) y Kolmogorov–Smirnov ($p = 0,6164$) confirmaron que no se rechaza la normalidad de los residuales; en consecuencia, el supuesto de normalidad se encuentra satisfecho.

4.5.1 Rendimiento y eficiencia de extracción

El modelo de superficie de respuesta ajustado (Ec. 10) explica el 95,01 % ($R^2 = 0,9501$) de la variabilidad total en el rendimiento de proteína extraída (η , % b.s.), manteniendo un coeficiente de variación experimental (CV) del 4,27 %, lo cual indica alta precisión relativa. La falta de ajuste no fue significativa (p -valor = 0,8804), y los residuales cumplen normalidad (Shapiro-Wilk, $p = 0,30063$), validando la inferencia estadística. El valor F de 13,44, $p > 0,0001$ y una suma de cuadrados del modelo de 244,29 frente a un residual de 12,83 respaldan esta afirmación.

Tabla 22: ANOVA para el rendimiento de extracción

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media de cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	244,29	17	14,37	13,44	< 0,0001
Z_1 : pH	11,58	1	11,58	10,83	0,0065
Z_2 : Relación Mm:Vs	46,82	1	46,82	43,78	< 0,0001
Z_3 : Tiempo sonicación	19,85	1	19,85	18,56	0,001
Z_4 :Temperatura extracción	14,84	1	14,84	13,88	0,0029
Z_1Z_2	12,26	1	12,26	11,47	0,0054
Z_1Z_4	4,55	1	4,55	4,25	0,0616
Z_2Z_3	10,78	1	10,78	10,09	0,008
Z_2Z_4	4,50	1	4,50	4,21	0,0626
Z_1^2	0,25	1	0,25	0,23	0,6367
Z_2^2	2,64	1	2,64	2,47	0,142
Z_3^2	3,35	1	3,35	3,14	0,1019
Z_4^2	6,92	1	6,92	6,47	0,0257
$Z_1Z_2Z_3$	0,83	1	0,83	0,78	0,3951
$Z_1Z_3Z_4$	6,40	1	6,40	5,99	0,0308
$Z_2Z_3Z_4$	9,41	1	9,41	8,80	0,0118
$Z_1Z_2^2$	6,63	1	6,63	6,20	0,0284
$Z_1Z_2Z_3Z_4$	1,57	1	1,57	1,47	0,2493
Residual	12,83	12	1,07		
Falta de ajuste	4,45	7	0,64	0,38	0,8804
Error puro	8,38	5	1,68		
Cor Total	257,12	29			

Del análisis de varianza (ANOVA, Tabla 22), para un nivel de significancia del 95%, los factores independientes Z_2 (relación Mm:Vs, g:mL, con $p < 0.0001$) y Z_3 (tiempo de sonicación, min, con $p < 0,001$) tienen un efecto altamente significativo. Un aumento en Z_2 (en decir, menor dilución) incrementa el rendimiento global (η , g proteína/100 g muestra b.s), posiblemente por una mayor concentración de sólidos disponibles para la extracción. Tiempos prolongados (hasta 30 min) favorecen la ruptura celular y liberación de proteínas. Mientras tanto, el Z_1 (pH, $p < 0,0065$) y Z_4 (temperatura, °C, $p < 0,0029$) son significativos para $\alpha = 0,05$. Valores alcalinos (pH 10–11) mejoran la solubilidad proteica al inducir carga negativa y repulsión electrostática y temperaturas más altas (hasta 50 °C) facilitan la difusión, aunque se debe evitar la desnaturalización extrema.

Mientras tanto, las interacciones significativas ($\alpha < 0,05$) fueron, Z_1Z_2 (pH x Relación Mm:Vs, $p < 0,0054$) y Z_2Z_3 (Relación Mm:Vs x Tiempo, $p < 0,008$), que corrobora la significancia de la Relación Mm:Vs en el rendimiento de extracción. Por otro lado, las interacciones de orden superior que tienen un efecto significativo en η (g proteína/100g muestra), fueron Z_4^2 , $Z_1Z_3Z_4$, $Z_2Z_3Z_4$ y $Z_1Z_2^2$, lo que sugiere un punto óptimo de temperatura (probablemente alrededor de 40–50 °C), más allá del cual el rendimiento podría disminuir. Esto implica que la relación entre estos factores no es lineal y su combinación influye de manera compleja.

Tabla 23: Valores estadísticos del rendimiento y eficiencia.

Estadísticos	Valor
Desv. Estándar	1,03
Media	24,24
C.V. %	4,27
R ²	0,9501
R ² Ajustada	0,8794
R ² Predicho	0,7157
Precisión adecuada	14,8135

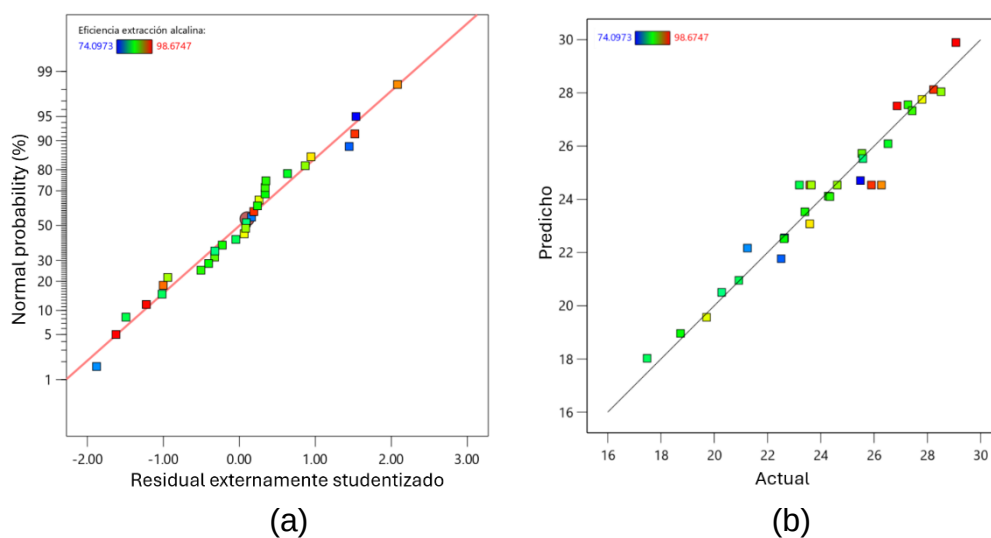
La falta de ajuste no fue significativa ($p = 0,8804$), lo cual es deseable, ya que indica que el modelo ajusta adecuadamente los datos y no hay evidencia de que se esté omitiendo una estructura importante.

Los supuestos estadísticos de normalidad de los datos y de los residuales se cumplen, evaluados con las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk ($p = 0,3$) y Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,61643$), lo que validan la aplicabilidad de las conclusiones y la confiabilidad del modelo matemático generado, que está representado en la Fig 18.

El modelo matemático (Ec. 10) mostró un alto poder predictivo, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9501, lo que significa que el 95.01% de la variabilidad en el rendimiento es explicada por los factores incluidos. El R^2 ajustado de 0,8794 y el R^2 predicho de 0,7157 son coherentes, indicando que el modelo no está sobre ajustado y tiene buena capacidad predictiva. La precisión adecuada (signal to noise ratio) de 14,81 (muy superior al umbral de 4) confirma que el modelo tiene una buena relación señal-ruido y es adecuado para navegar el espacio de diseño.

$$\begin{aligned} \eta = & -38,034 + 7,519 Z_1 + 12,02 Z_2 - 2,219 Z_3 - 0,468 Z_4 - 1,338 Z_1 Z_2 \\ & + 0,035 Z_1 Z_4 + 0,106 Z_2 Z_3 + 0,0299 Z_2 Z_4 + 0,096 Z_1^2 - 0,458 Z_2^2 \\ & + 0,0139 Z_3^2 - 0,005 Z_4^2 - 0,00086 Z_1 Z_2 Z_3 + 0,003 Z_1 Z_3 Z_4 \\ & - 0,000088 Z_2 Z_3 Z_4 + 0,0446 Z_1 Z_2^2 - 0,000153 Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 \end{aligned} \quad (10)$$

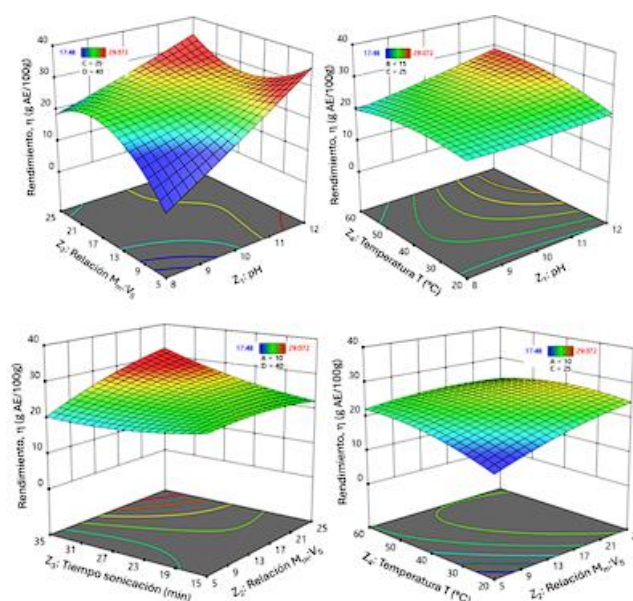
Figura 18. a) Normal vs residual y b) Predicho vs actual



Efectos marginales y curvaturas, que se observan en la Fig. 12, nos indica que un incremento unitario en la relación Mm:Vs (Z_2) eleva η en 1,40 % b.s. (coeficiente codificado positivo, $p < 0,0001$). Por otro lado, cada minuto adicional de sonicación (Z_3) incrementa η en 0,91 % b.s. ($p = 0,001$). Mientras tanto el término cuadrático Z_4^2 (T^2) es significativo y negativo (coef. = $-0,5023$), evidenciando curvatura cóncava; existe un máximo local alrededor de 40 °C, y temperaturas superiores a 50 °C disminuyen el rendimiento. La interacción Z_1Z_2 (pH $\times$ Mm:Vs) es negativa (coef. = $-0,876$), señalando que el beneficio de aumentar la proporción de solvente se ve atenuado cuando el pH se aleja de 10.

Por tanto, el análisis estadístico confirma que la extracción alcalina asistida por ultrasonido es un proceso robusto y reproducible para la recuperación de proteínas de la torta desgrasada de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*). Los factores relación masa:solvente y tiempo de sonicación son los principales determinantes del rendimiento, mientras que interacciones de segundo y tercer orden modulan la respuesta de manera significativa. El modelo cuantitativo obtenido permite predecir y optimizar η con una precisión del ± 4 %, sentando las bases para el escalado del proceso

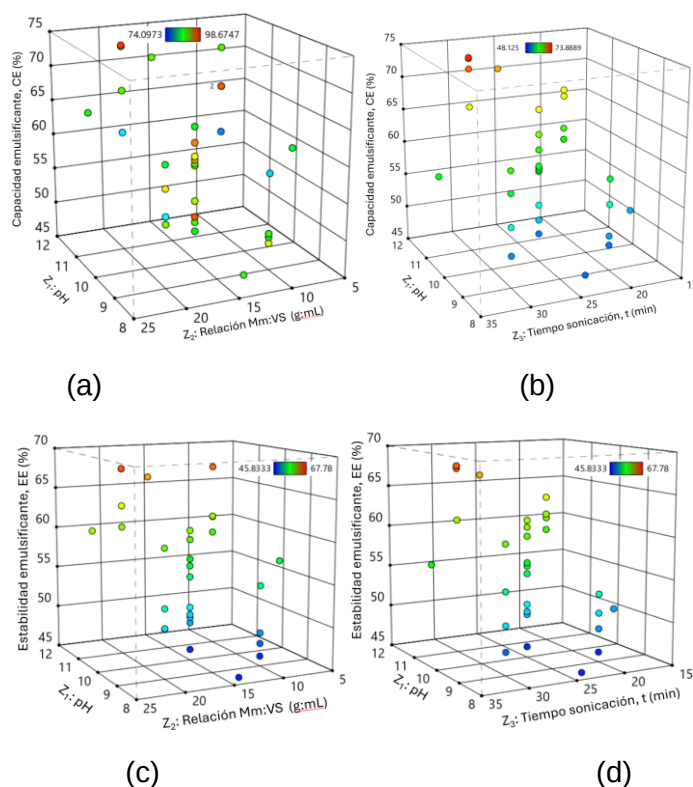
Figura 19. Representación del comportamiento del rendimiento como función de Z_1 , Z_2 , Z_3 y Z_4



4.5.2 Capacidad y estabilidad emulsificante de la proteína obtenida

La capacidad emulsificante (CE, %) mostró una media de $59,436 \pm 1,43$ %, con una desviación estándar de 3,61% y un coeficiente de variación (C.V.) del 6,08%, lo que indica una dispersión moderada y consistencia aceptable entre tratamientos. El valor mínimo fue de 48,1% (tratamiento 26) y el máximo de 73,9% (tratamiento 18), evidenciando que ciertas condiciones operativas favorecen significativamente la formación de emulsiones estables. Por otro lado, la estabilidad emulsificante (EE, %) presentó una media de $56,144 \pm 1,247$ %, desviación estándar de 3,40% y C.V. del 6,05%, indicando un comportamiento similar en términos de reproducibilidad, que se muestra en la Fig. 20.

Figura 20. a) y b) Variación de Z1, Z2 y Z3 con la capacidad emulsificante (CE, %); c) y d) Variación de Z1, Z2 y Z3 con la estabilidad emulsificante (EE, %) de la proteína obtenida de la torta de *B. excelsa*.



Ambas variables respuesta mostraron rangos amplios de comportamiento, lo cual es favorable para la modelización, ya que refleja sensibilidad a los

cambios en los factores de proceso. La normalidad de los datos fue preliminarmente confirmada mediante pruebas no paramétricas, sentando las bases para el uso de modelos polinomiales generalizados.

Tabla 24: ANOVA para la capacidad emulsificante (CE, %)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	1612,91	16	100,81	7,72	0,0003
Z_1 : pH	967,88	1	967,88	74,11	< 0,0001
Z_2 :Relación Mm:Vs	106,99	1	106,99	8,19	0,0133
Z_3 :Tiempo sonicación	155,1	1	155,1	11,88	0,0043
Z_4 :Temperatura extracción	70,33	1	70,33	5,39	0,0372
Z_2Z_3	0,0854	1	0,0854	0,0065	0,9368
Z_2Z_4	0,1355	1	0,1355	0,0104	0,9204
Z_3Z_4	0,0983	1	0,0983	0,0075	0,9322
Z_1^2	2,74	1	2,74	0,2097	0,6546
Z_2^2	42,64	1	42,64	3,26	0,094
Z_3^2	13,03	1	13,03	0,9976	0,3361
Z_4^2	25,6	1	25,6	1,96	0,1849
$Z_1Z_2Z_3$	11,04	1	11,04	0,8452	0,3747
$Z_1Z_2Z_4$	7,28	1	7,28	0,5572	0,4687
$Z_1Z_3Z_4$	89,42	1	89,42	6,85	0,0213
$Z_2Z_3Z_4$	6,72	1	6,72	0,5145	0,4859
$Z_1^2Z_2^2$	62,89	1	62,89	4,82	0,047
Residual	169,79	13	13,06		
Falta de ajuste	49,87	8	6,23	0,2599	0,955
Error puro	119,92	5	23,98		
Cor Total	1782,7	29			

El modelo global para la CE fue altamente significativo ($p < 0.0003$), con un valor F de 7,72, lo que indica que el modelo explica adecuadamente la variabilidad observada (Tabla 23). El valor de falta de ajuste no fue significativo ($p = 0,955$), lo cual es deseable, ya que sugiere que el modelo ajusta bien los datos y no hay evidencia de falta de ajuste.

Los factores principales con efecto significativo ($p < 0,05$) fueron: pH (Z_1): $p < 0,0001$, con una suma de cuadrados de 967,88, siendo el factor más influyente. Un aumento del pH (especialmente a valores alcalinos como 11–12) incrementa la carga negativa de las proteínas, mejorando su solubilidad y exposición de regiones hidrofóbicas, lo que facilita la adsorción en la interfase aceite-agua. La relación masa:volumen (Z_2): $p = 0,0133$, muestra que relaciones más altas (mayor concentración de sólidos) mejoran la CE, posiblemente por una mayor disponibilidad de proteína interfacial. Mientras tanto, el tiempo de sonicación (Z_3): $p = 0,0043$, indicando que tiempos prolongados (hasta 30–35 min) favorecen la desagregación y exposición de dominios funcionales. La temperatura (Z_4): $p = 0,0372$, sugiriendo que temperaturas moderadas ($\sim 50^\circ\text{C}$) mejoran la movilidad molecular y difusión, aunque valores extremos podrían inducir agregación. Además, la interacción $Z_1^2 Z_2^2$, $p = 0,047$ fue significativo, lo que implica un efecto no lineal complejo entre estos factores, probablemente relacionado con la saturación de sitios emulsionantes a altas concentraciones y pH extremos.

Términos de segundo orden como Z_2^2 , $p = 0,094$, mostraron tendencia hacia la significancia, sugiriendo un posible punto óptimo en la relación sólido:líquido. Por otro lado, interacciones binarias como $Z_2 Z_3$, $Z_2 Z_4$ y $Z_3 Z_4$ no fueron significativas ($p > 0,05$), indicando independencia relativa entre sus efectos combinados.

El modelo final, expresado en términos codificados y transformado a escala natural, es:

$$\begin{aligned}
CE(\%) = & 73,605 - 22,1233 Z_1 + 0,9106 Z_2 + 2,3542 Z_3 + 1,4922 Z_4 \\
& - 0,4656 Z_2 Z_3 - 0,1725 Z_2 Z_4 + 0,0521 Z_3 Z_4 + 1,4535 Z_1^2 + 0,3137 Z_2^2 \\
& - 0,0062 Z_3^2 - 0,0045 Z_4^2 + 0,0359 Z_1 Z_2 Z_3 + 0,0106 Z_1 Z_2 Z_4 \\
& - 0,008945 Z_1 Z_3 Z_4 + 0,00259 Z_2 Z_3 Z_4 - 0,00237 Z_1^2 Z_2^2
\end{aligned} \quad (10)$$

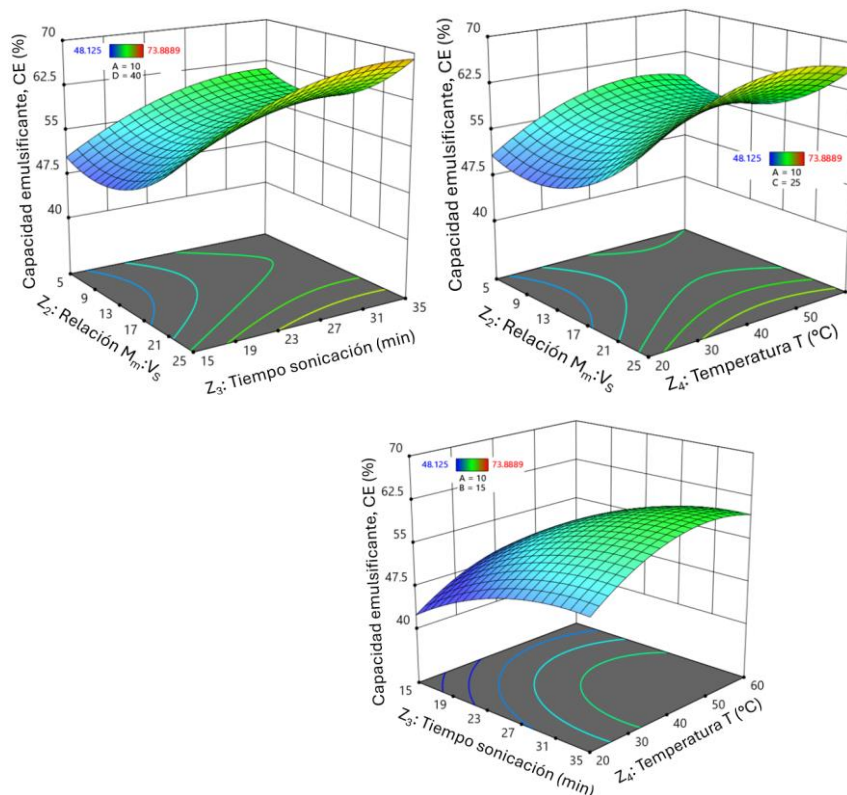
Este modelo incluye efectos lineales, cuadráticos, interacciones binarias y términos cúbicos, reflejando la naturaleza multifactorial del proceso. Los coeficientes positivos de Z_1 , Z_2 , Z_3 y Z_4 indican que aumentar estos factores mejora la CE, mientras que los términos cuadráticos negativos sugieren comportamientos cóncavos (máximos locales). Así el alto coeficiente de Z_1 (22,12) confirma que el pH es el principal modulador de la CE, el término Z_1^2 negativo (-0,4656) sugiere que existe un pH óptimo (~11–12), más allá del cual la CE podría disminuir por sobreionización o precipitación incipiente. La interacción $Z_1 Z_2$ positiva (0,3137) indica sinergia entre pH elevado y alta relación masa: volumen.

Tabla 25: Métricas de bondad del ajuste de los modelos matemáticos

Estadísticos	Capacidad emulsificante	Estabilidad emulsificante
Desviación estándar	3,61	3,4
Media	59,44	56,14
C.V. %	6,08	6,05
R^2	0,9048	0,8638
R^2 Ajustado	0,7875	0,7531
R^2 Predicho	0,6514	0,6191
Precisión adecuada	9,9625	10,2227

El modelo de la Ec. 10, presenta un coeficiente de determinación R^2 de 0,9048, lo que indica que explica el 90,48% de la variabilidad en la CE. El R^2 ajustado de 0,7875 y el R^2 predicho de 0,6514 son coherentes, mostrando que el modelo no está sobreajustado (Tabla 25). La precisión adecuada (signal to noise ratio) de 9,96 supera el umbral recomendado de 4, lo que valida su capacidad para navegar el espacio de diseño y realizar predicciones confiables.

Figura 21. Comportamiento de la capacidad emulsificante (CE, %) función de Z1, Z2, Z3 y Z4



El modelo para EE también fue altamente significativo ($p < 0,0001$), con un valor F de 7,80. El lack of fit no fue significativo ($p = 0,9654$), lo que respalda la bondad del ajuste.

Factores significativos ($p < 0,05$) incluyen:

pH (Z_1): $p < 0,0001$, con suma de cuadrados de 782,88, nuevamente el factor dominante. Valores alcalinos promueven una red proteica más resistente en la interfase.

Relación masa:volumen (Z_2): $p = 0,0317$, indicando que mayor concentración de proteína mejora la estabilidad de la película interfacial.

Tiempo de sonicación (Z_3): $p = 0,0085$, sugiriendo que una sonicación prolongada favorece la homogeneización y formación de gotas más pequeñas y estables.

Término cuadrático Z_2^2 : $p = 0,036$, lo que indica un efecto no lineal en la relación masa:volumen, posiblemente debido a la viscosidad excesiva o saturación interfacial a altas concentraciones.

La interacción Z_1Z_4 (pH $\times$ temperatura, $p = 0,1889$) no fue significativa, pero mostró tendencia, sugiriendo que la combinación de pH alto y temperatura moderada puede tener un efecto aditivo.

Tabla 26: ANOVA para la estabilidad emulsificante de la proteína obtenida de la torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*).

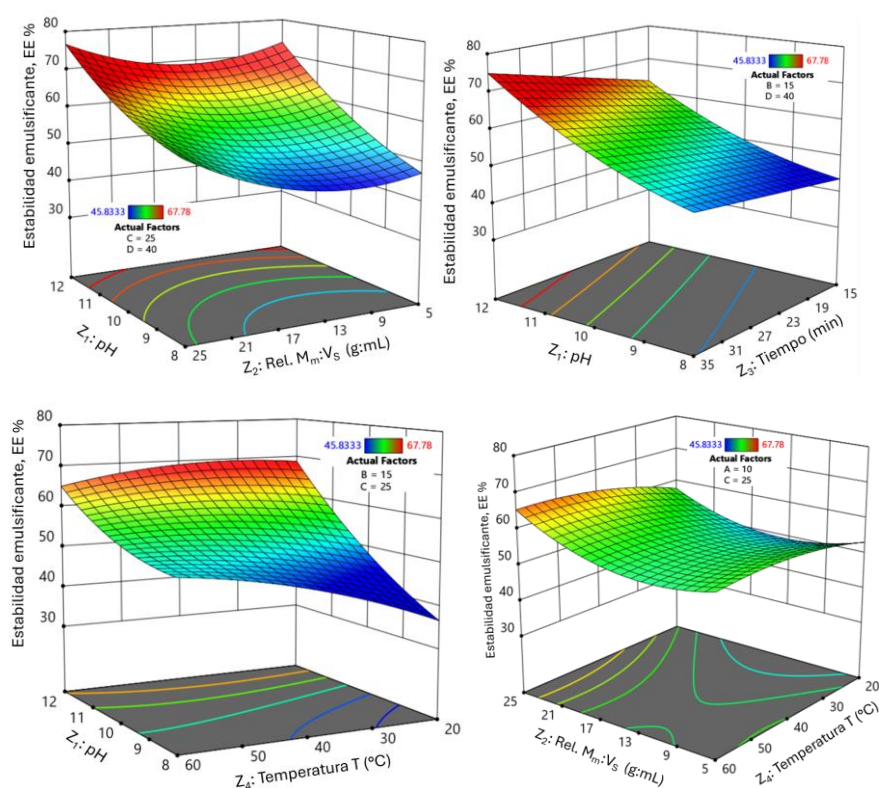
Fuente	Suma cuadrados	Grados libertad	Suma cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	1169,39	13	89,95	7,8	0,0001
Z_1 : pH	782,88	1	782,88	67,91	< 0,0001
Z_2 :Relación Mm:Vs	63,83	1	63,83	5,54	0,0317
Z_3 :Tiempo sonicación	103,83	1	103,83	9,01	0,0085
Z_4 :Temperatura extracción	46,2	1	46,2	4,01	0,0625
Z_1Z_2	3,03	1	3,03	0,2626	0,6153
Z_1Z_3	2,15	1	2,15	0,1862	0,6719
Z_1Z_4	21,72	1	21,72	1,88	0,1889
Z_2Z_4	1,03	1	1,03	0,0894	0,7688
Z_1^2	15,5	1	15,5	1,34	0,2632
Z_2^2	60,4	1	60,4	5,24	0,036
Z_4^2	9,63	1	9,63	0,8349	0,3744
$Z_1Z_3Z_4$	44,69	1	44.,9	3,88	0,0665
$Z_2Z_3Z_4$	10,76	1	10,76	0,9332	0,3484
Residual	184,45	16	11,53		
Falta de ajuste	69,51	11	6,32	0,2749	0,9654
Error puro	114,94	5	22,99		
Cor Total	1353,85	29			

Estadístico	Valor
Std. Dev.	3,4
Mean	56,14
C.V. %	6,05
R ²	0,8638
Adjusted R ²	0,7531
Predicted R ²	0,6191
Adeq Precision	10,2227

El modelo ajustado es:

$$\begin{aligned}
 EE(\%) = & 24,02442 - 5,46019 Z_1 - 0,769263 Z_2 - 0,603798 Z_3 + 1,69667 Z_4 \\
 & - 0,087 Z_1 Z_2 + 0,09018 Z_1 Z_3 - 0,105918 Z_1 Z_4 - 0,006896 Z_2 Z_4 \\
 & + 0,744104 Z_1^2 + 0,058748 Z_2^2 - 0,005863 Z_4^2 \\
 & - 0,000423 Z_1 Z_3 Z_4 + 0,000479 Z_2 Z_3 Z_4
 \end{aligned} \quad (11)$$

Figura 22. Comportamiento de la estabilidad emulsificante (EE, %) de la proteína de la torta desgrasada de *B. exce/sa* como función de Z1, Z2, Z3 y Z4



Este modelo destaca por la influencia positiva del pH (coeficiente 5,46) y el efecto estabilizador de tiempos y temperaturas moderadas. El término Z_1^2 positivo (0,744) sugiere que la EE continúa mejorando con el pH en el rango estudiado, sin mostrar un punto de inflexión claro, a diferencia de la CE.

Figura 23. a) Normal vs residual y b) Predicho vs actual para la estabilidad emulsificante de la proteína de torta de nuez de Castaña desgrasada

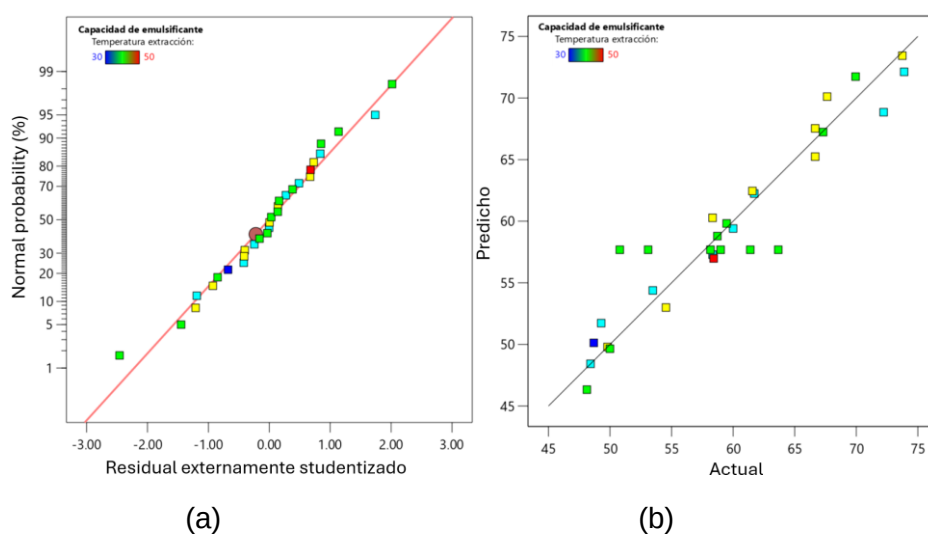
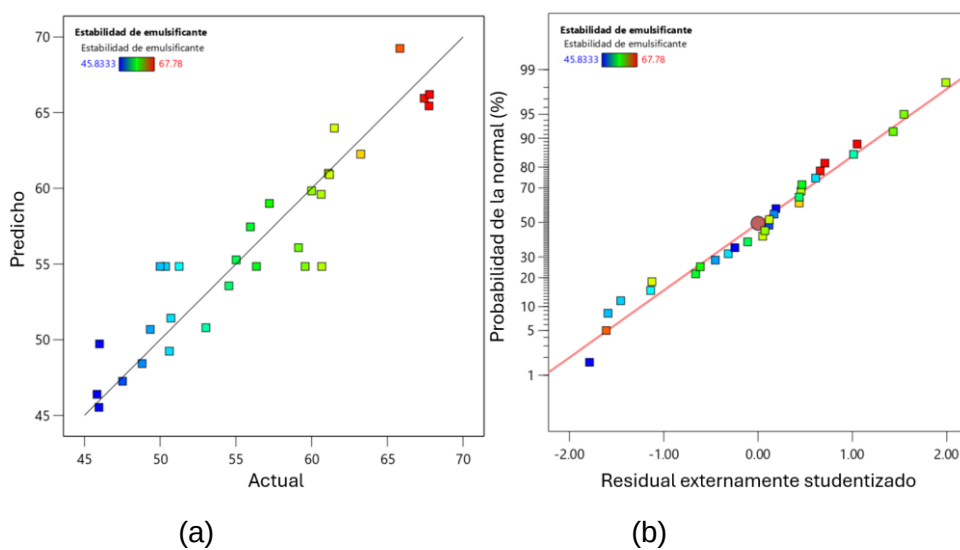


Figura 24. a) Normal vs residual y b) Predicho vs actual, para la capacidad emulsificante de la proteína de torta de nuez de Castaña.



Para ambas respuestas (CE y EE), el análisis de residuos confirmó la validez de los modelos matemáticos Ecs. 10 y 11. Por otro lado, las gráficas residuos vs. valor predicho no mostraron patrones sistemáticos, indicando homocedasticidad (Fig. 23 y 24). Las gráficas valor predicho vs. valor real exhibieron una fuerte correlación lineal, validando la precisión predictiva.

El análisis de normalidad mediante Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov no rechazó la hipótesis nula de normalidad de los residuos:

Para CE: p-Shapiro = 0,21778, p-KS = 0,67055

Para EE: p-Shapiro = 0,55974, p-KS = 0,81156

Esto cumple con uno de los supuestos fundamentales de la regresión lineal múltiple.

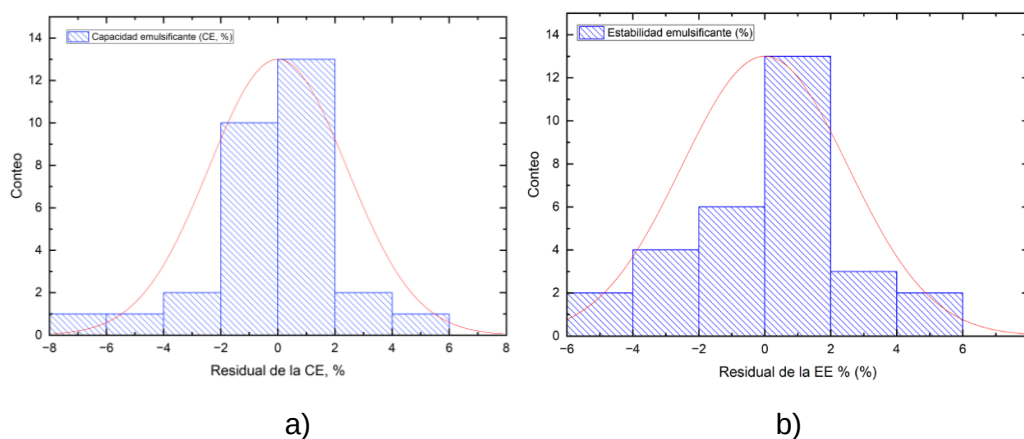
Tabla 27: Análisis de los residuales para la capacidad emulsificante de la proteína de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*).

	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
Capacidad emulsificante (CE, %)	5,57E-04	2,41913	0,44167
Estabilidad emulsificante (EE, %)	8,73E-04	2,52149	0,46036

Tabla 28: Tabla Análisis de normalidad

Tipo de prueba	Capacidad emulsificante		Estabilidad emulsificante	
	Estadístico	Valor-p	Estadístico	Valor-p
Shapiro-Wilk	0,95413	0,21778	0,97074	0,55974
Kolmogorov Smirnov	0,12974	0,67055	0,11742	0,81156

Figura 25. Distribución normal de los residuales para a) capacidad emulsificante y b) Estabilidad emulsificante de la proteína de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*).



Interpretación Funcional y Comparación con Sistemas Alimentarios

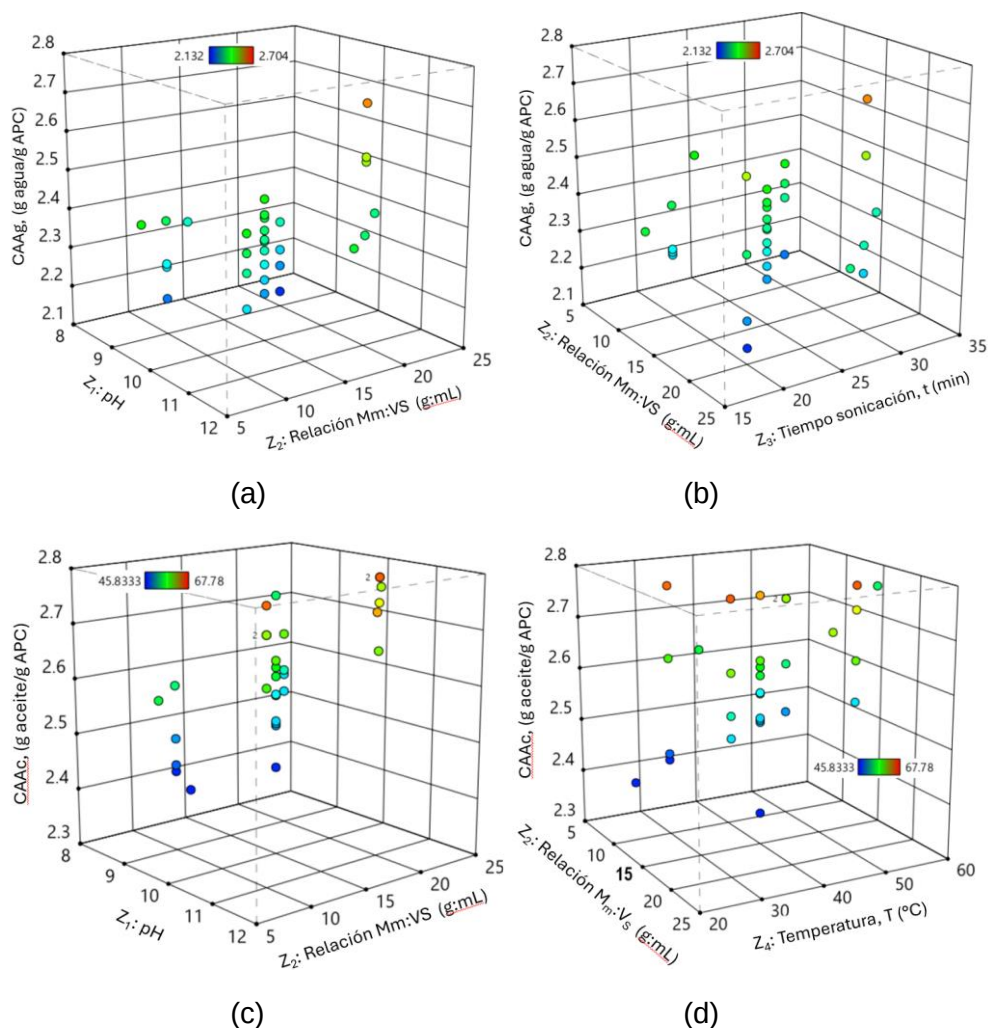
Los valores máximos de CE (~73,9%) y EE (~67,8%) son comparables o superiores a los reportados para aislados proteicos de leguminosas como soja (CE ~60–70%) y chícharo, e incluso cercanos a algunos derivados lácteos. Esto posiciona a la proteína de la nuez de castaña como un agente emulsionante potencialmente viable en matrices alimenticias como salsas, bebidas fortificadas o productos cárnicos.

La dependencia crítica del pH sugiere que su aplicación será más eficaz en sistemas neutros a ligeramente alcalinos. Además, la mejora con el tiempo de sonicación indica que la energía ultrasónica no solo libera proteínas, sino que también modifica su conformación, exponiendo dominios hidrofóbicos esenciales para la actividad emulsionante.

4.5.3 Capacidad de absorción de agua y aceite por la proteína

Las capacidades de absorción de agua (CAAg) y aceite (CAAc) son propiedades funcionales críticas que determinan la potencial aplicación de los aislados proteicos en matrices alimentarias, influyendo en características como la jugosidad, estabilidad y textura de los productos.

Figura 26. a) y b) Variación de Z1, Z2 y Z3 con la CAAg (g agua/g APC); c) y d) Variación de Z1, Z2 y Z4 con la CAAC (g aceite/g APC)



La CAAg presentó una media de 2,355 g agua/g APC, con una desviación estándar de 0,122 y un coeficiente de variación (C.V.) del 5,18%, indicando buena reproducibilidad. El rango observado fue de 2,132 a 2,704 g/g, lo que evidencia sensibilidad al proceso. Por otro lado, la CAAC mostró una media superior de 2,623 g aceite/g APC, con una desviación estándar de 0,117 y un C.V. del 4,46%, reflejando aún mayor consistencia (Fig. 26). Ambos valores son competitivos frente a aislados de soja (CAA_g ≈ 1,5–2,0 g/g; CAAC ≈ 2,0–2,5 g/g), sugiriendo un perfil funcional favorable para aplicaciones alimentarias.

La normalidad de los residuos fue confirmada mediante pruebas Shapiro-Wilk ($p = 0,51329$ para CAAg, $p = 0,9448$ para CAAC) y Kolmogorov-Smirnov ($p = 1.0$ para ambas), validando los supuestos paramétricos.

El análisis de varianza (ANOVA) para la CAAg (Tabla 29) revela un modelo estadísticamente significativo (Valor $p < 0,0001$), lo que indica que las variables independientes y sus interacciones tienen un efecto real y mensurable sobre esta propiedad. El factor individual más significativo es el pH (Z_1), con un valor- $p < 0,0001$. Su coeficiente negativo en el modelo codificado ($-0,2682$) indica que, dentro del rango estudiado, un aumento en el pH de extracción conduce a una disminución en la CAAg de la proteína aislada. Esto podría deberse a modificaciones en la estructura terciaria de las proteínas que afectan la disponibilidad de grupos hidrofílicos. Los factores individuales Relación Masa:Volumen (Z_2), Tiempo de sonicación (Z_3) y Temperatura (Z_4) no mostraron efectos significativos individualmente ($p > 0,05$). Sin embargo, su importancia se manifiesta a través de interacciones con otros factores.

La interacción (pH x Relación Mm:Vs) es altamente significativa ($p=0,0006$), demostrando que el efecto del pH sobre la CAAg está modulado por la proporción de harina y solvente utilizada. Otras interacciones significativas como (Relación x Temperatura, $p=0,0118$), (Tiempo x Temperatura, $p=0,0454$), y resaltan la compleja naturaleza multifactorial del proceso de extracción y su impacto en la funcionalidad proteica. Esto sugiere que el pH del medio alcalino juega un rol dominante en la hidratación y solubilización de grupos polares de las proteínas.

Tabla 29: ANOVA para la capacidad de absorción de agua por la proteína obtenida de la torta de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*).

Fuente	Suma cuadrados	Grados libertad	Media cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	0,3568	13	0,0274	8,54	< 0,0001
Z_1 : pH	0,1432	1	0,1432	44,58	< 0,0001
Z_2 :Relación Mm:Vs	0,0042	1	0,0042	1,32	0,268
Z_3 :Tiempo sonicación	0,0042	1	0,0042	1,32	0,268
Z_4 :Temperatura extracción	0,0118	1	0,0118	3,67	0,0734
AB	0,059	1	0,059	18,38	0,0006
AD	0,0114	1	0,0114	3,56	0,0773
BC	0,0094	1	0,0094	2,93	0,1063
BD	0,0259	1	0,0259	8,07	0,0118
CD	0,0151	1	0,0151	4,71	0,0454
D ²	0,0112	1	0,0112	3,49	0,0803
BCD	0,0098	1	0,0098	3,05	0,0999
A ² B	0,0178	1	0,0178	5,54	0,0317
A ² C	0,0245	1	0,0245	7,62	0,0139
Residual	0,0514	16	0,0032		
Lack of Fit	0,0351	11	0,0032	0,9783	0,5497
Pure Error	0,0163	5	0,0033		
Cor Total	0,4082	29			

El comportamiento cuadrático del pH refleja que la CAAg aumenta progresivamente hasta un valor óptimo (~pH 10–11), donde la ionización de los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$ genera repulsión electrostática entre cadenas, aumentando la exposición de sitios hidrofílicos. A valores más altos, la excesiva desnaturalización reduce la capacidad de retención de agua por colapso de estructuras secundarias.

El modelo presenta un R^2 de 0,8741, lo que significa que explica el 87,41% de la variabilidad total observada en la CAAg. El R^2 Ajustado (0,7718) es

razonable, considerando el número de términos en el modelo. El R^2 Predicho (0,6328) sugiere una capacidad aceptable para predecir nuevas observaciones. El valor de "Adeq Precision" de 13,916 (> 4) confirma una señal adecuada y que el modelo es apto para navegar el espacio de diseño.

Tabla 30: Datos estadísticos de capacidad de absorción de agua

Estadístico	Valor
Std. Dev.	0,0567
Mean	2,36
C.V. %	2,4
R^2	0,8741
Adjusted R^2	0,7718
Predicted R^2	0,6328
Adeq Precision	13,916

La prueba de "Lack of Fit" no es significativa ($p=0,5497 > 0,05$), lo que indica que el modelo se ajusta bien a los datos experimentales y no existe un patrón no explicado.

Los residuales siguen una distribución normal, confirmada por las pruebas de Shapiro-Wilk ($p=0,51329$) y Kolmogorov-Smirnov ($p=1.0$). Esto valida los supuestos del ANOVA y la confiabilidad de los valores-p reportados.

Modelo Matemático:

La ecuación en escala natural permite cuantificar y predecir la CAAg en función de las condiciones de operación:

$$\begin{aligned} \text{CAA}g(\%) = & 3,24426 - 0,2682 Z_1 - 0,08963 Z_2 + 0,06256 Z_3 + 0,0316 Z_4 + 0,0149 Z_1 Z_2 \\ & + 0,002675 Z_1 Z_4 - 0,00299 Z_2 Z_3 - 0,00167 Z_2 Z_4 - 0,0021 Z_3 Z_4 \\ & - 1,96 \times 10^{-4} Z_4^2 + 9,9 \times 10^{-5} Z_2 Z_3 Z_4 - 1,39 \times 10^{-4} Z_1^2 Z_2 + 1,1210^{-4} Z_1^2 Z_3 \end{aligned}$$

Este modelo permite predecir el comportamiento de absorción de agua con precisión estadística aceptable, mostrando que la condición óptima experimental se encuentra en torno a pH 11, relación 1:20 (m:v), 30–50 °C y 20–30 min de sonicación, con una capacidad máxima de ≈ 2.70 g H_2O /g proteína aislada (APC).

Figura 27. a) Normal vs residual y b) Predicho vs actual para la capacidad de absorción de agua por la proteína de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) desgrasada.

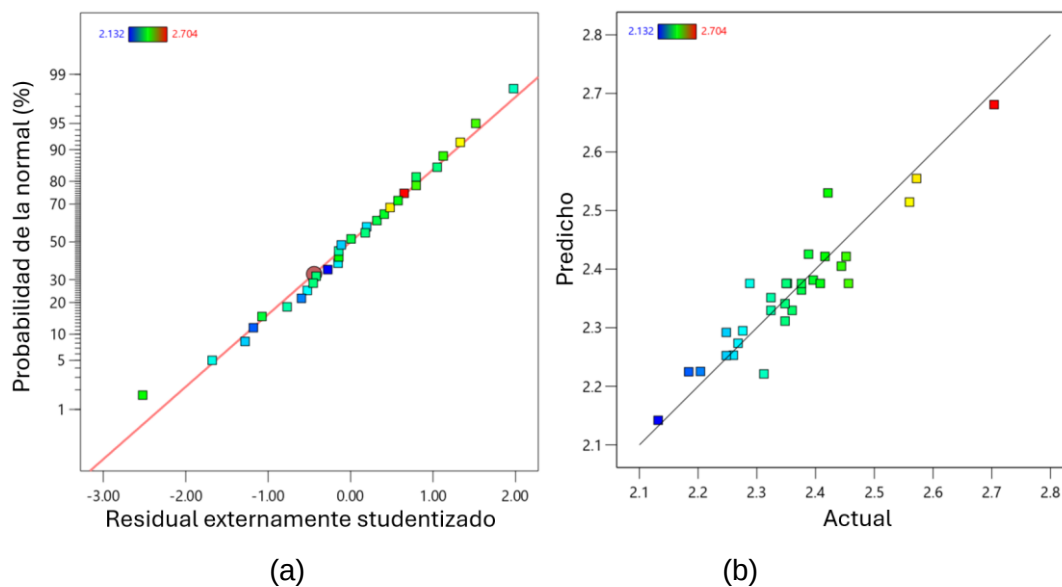


Tabla 31: Análisis de los residuales

	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
Capacidad absorción de agua (CAAg, %)	-3,33E-06	0,0421	0,00769

Figura 28. Distribución normal de los residuales de la CAAg.

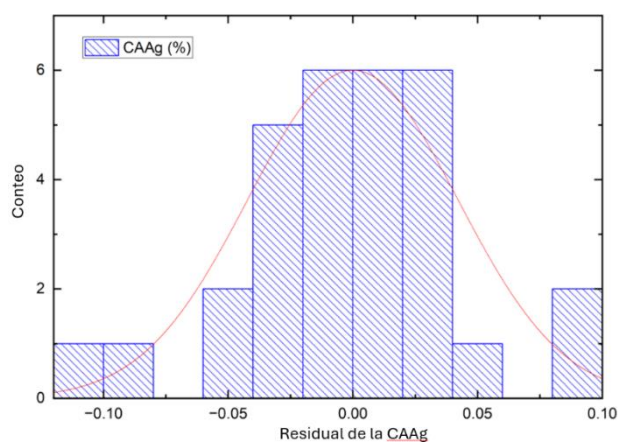
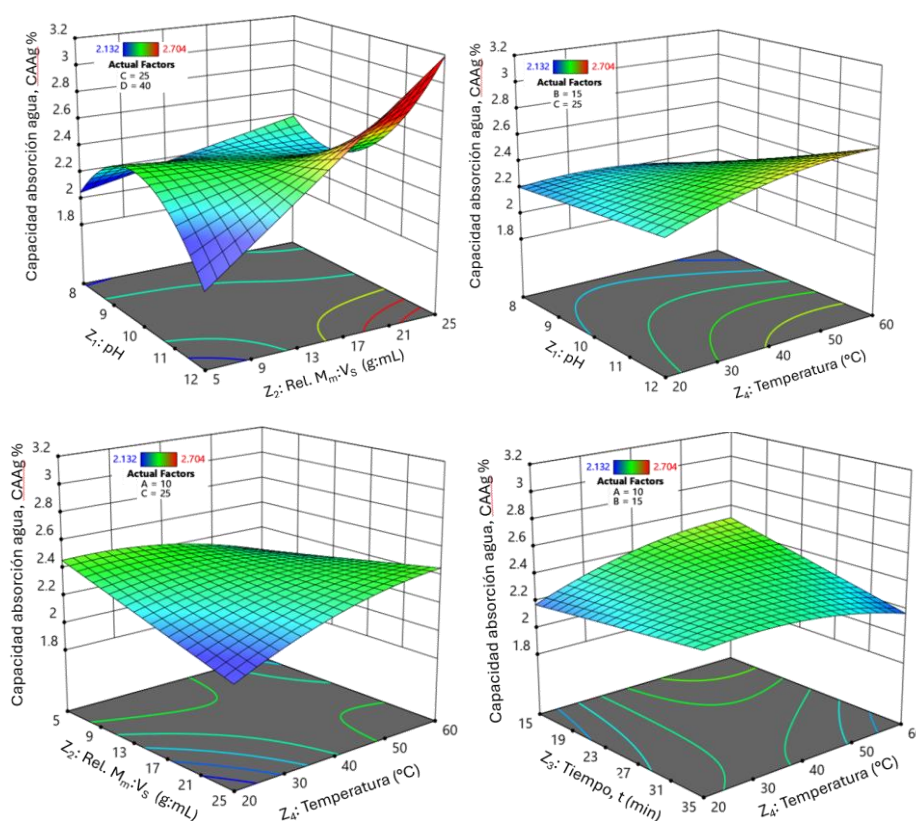


Tabla 32: Análisis de normalidad del residual de la capacidad de absorción de agua

Pruebas	Estadístico	Valor-p	Decisión (5%)
Shapiro-Wilk	0,96904	0,51329	No se rechaza la normalidad
Kolmogorov Smirnov	0,09171	1,0	No se rechaza la normalidad
Chen-Shapiro	-0,082	0,04132	

Figura 29. Comportamiento de la capacidad de absorción de agua (g agua/g proteína aislada de castaña) como funciones de Z1, Z2, Z3 y Z4.



Los gráficos de superficie de respuesta (Figura 23) ilustran estas complejas interacciones. La gráfica (Z1: pH vs. Z2: Relación) muestra que la CAAg no sigue una tendencia lineal simple con el pH; parece disminuir a medida que el pH aumenta desde 8, para luego incrementarse marcadamente a valores de pH más altos (cerca de 11). La interacción significativa Z2Z4 (Relación-Temperatura) se visualiza en la gráfica inferior izquierda. La CAAg se

maximiza cuando ambos factores están en sus niveles altos (Temperatura > 50°C y Relación > 21 g:mL).

Desde el punto de vista funcional, estos resultados indican que las proteínas extraídas presentan alta afinidad por moléculas polares de agua, relacionada con la abundancia de aminoácidos hidrofílicos (serina, treonina, ácido aspártico y glutámico). Esta propiedad es crítica en formulaciones alimentarias donde se busca mejorar la textura, jugosidad y retención de humedad (p. ej., análogos cárnicos o productos horneados).

2. Capacidad absorción de aceite por la proteína de castaña

Tabla 33: ANOVA para la capacidad de absorción de aceite por la proteína obtenida de la torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*).

Fuente	Suma cuadrados	Grados libertad	Media cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	0,3466	10	0,0347	15,31	< 0,0001
Z_1 : pH	0,2235	1	0,2235	98,74	< 0,0001
Z_2 :Relación Mm:Vs	0,0261	1	0,0261	11,55	0,003
Z_3 :Tiempo sonicación	0,0181	1	0,0181	8,02	0,0107
Z_4 :Temperatura extracción	0,0451	1	0,0451	19,91	0,0003
Z_1Z_2	0,0037	1	0,0037	1,64	0,2152
Z_1Z_3	0,0017	1	0,0017	0,7426	0,3996
Z_1Z_4	0,002	1	0,002	0,8946	0,3561
Z_2^2	0,0247	1	0,0247	10,92	0,0037
Z_3^2	0,0007	1	0,0007	0,3048	0,5873
Z_4^2	0,0035	1	0,0035	1,56	0,2275
Residual	0,043	19	0,0023		
Falta de ajuste	0,0334	14	0,0024	1,24	0,4364
Error puro	0,0096	5	0,0019		
Cor Total	0,3896	29			

El ANOVA para la CAAC (Tabla 33) también indica un modelo altamente significativo ($p < 0,0001$) con un valor F de 15,31. La "Falta de Ajuste" no fue significativo ($p = 0,4364$), respaldando la validez del modelo.

El modelo exhibe un alto poder explicativo, con $R^2 = 0,8896$, R^2 ajustado = 0,8315 y R^2 predicho = 0,6573, denotan una adecuada correlación y robustez del modelo predictivo, que explica el 83,15% de la variabilidad de la CAAC. El coeficiente de variación (C.V. = 1,82%) confirma la precisión experimental. La "Precisión adecuada" de 14,682 refuerza la idoneidad del modelo, superando ampliamente el umbral de 4, indicando un modelo robusto para optimización.

Para un nivel de confiabilidad del 95 % ($p < 0,05$) cuatro factores individuales mostraron efectos altamente significativos ($p < 0,05$) sobre la CAAC. El pH (Z_1) es nuevamente el factor más influyente ($p < 0,0001$), pero en este caso su efecto es positivo (coeficiente +0,136). Un aumento en el pH conduce a un incremento en la CAAC, posiblemente al exponer más grupos hidrofóbicos al desplegar la estructura proteica. La Relación masa:volumen (Z_2): $p = 0,003$, indicando que mayores concentraciones de proteína mejoran la absorción de aceite. Tiempo de sonicación (Z_3), $p = 0,0107$, sugiriendo que tiempos prolongados (~30–35 min) favorecen la desagregación y exposición de regiones apolares, y la temperatura (Z_4), $p = 0,0003$, mostrando que temperaturas más altas (~50 °C) reducen la viscosidad y mejoran la movilidad molecular. Mientras tanto el término cuadrático Relación Masa:Volumen Z_2^2 , $p = 0,0037$, indicando un comportamiento cóncavo, con un posible punto óptimo en la relación sólido:líquido. Ninguna de las interacciones lineales ($Z_1 Z_2$, $Z_1 Z_3$, $Z_1 Z_4$) fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Este modelo predice una máxima capacidad de absorción de aceite (~2,79 g aceite/g APC) en condiciones cercanas a pH 11, relación 1:20, 30 min de sonicación y 50 °C.

Tabla 34: Datos estadísticos de absorción de aceite.

Estadístico	Valor
Desv. Estándar	0,0476
Media	2,62
C.V. %	1,82
R ²	0,8896
R ² Ajustado	0,8315
R ² Predicho	0,6573
Precisión adecuada	14,682

La bondad del ajuste se confirmó mediante los tests de normalidad (Shapiro–Wilk, $p = 0,9448$; Kolmogorov–Smirnov, $p = 1.0$) y ausencia de falta de ajuste ($p = 0,4364$).

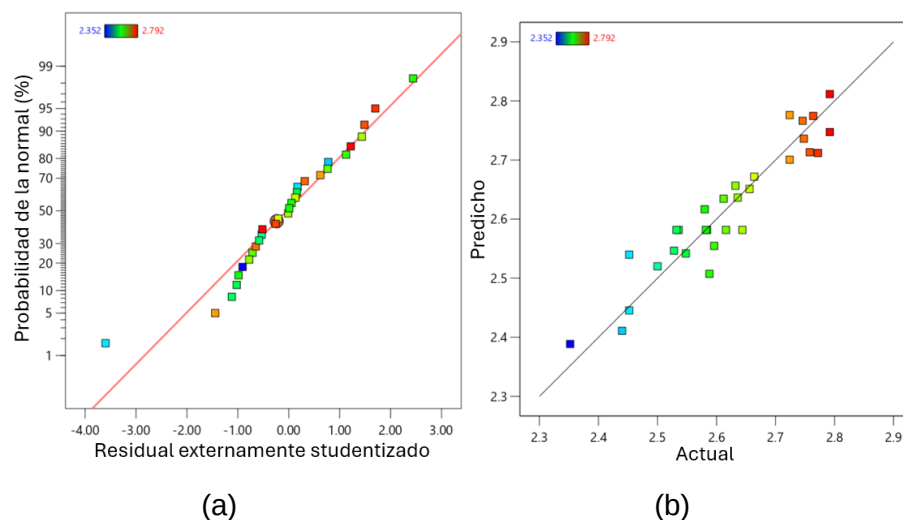
Desde el punto de vista funcional, esta elevada CAAC sugiere que la proteína aislada de la torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) posee alta afinidad por moléculas lipofílicas, lo cual puede atribuirse a la presencia de residuos hidrofóbicos (leucina, valina, fenilalanina) y a la conformación parcialmente desplegada generada por la sonicación. Esta propiedad resulta esencial para el desarrollo de emulsiones estables, productos cárnicos y sistemas encapsulantes de compuestos bioactivos.

El alto coeficiente positivo de Z_1 (0,136), consistente con la exposición de hidrofobicidad superficial a pH alcalino.

El coeficiente negativo de Z_3 (−0,0249), que puede explicarse por la desnaturalización extrema o fragmentación excesiva de proteínas tras sonicación prolongada, reduciendo su capacidad de formar matrices lipofílicas.

$$\begin{aligned}
 CAAC(\%) = & 1,38275 + 0,136 Z_1 + 0,001443 Z_2 - 0,024929 Z_3 + 0,006612 Z_4 \\
 & - 0,00305 Z_1 Z_2 + 0,00205 Z_1 Z_3 - 0,001125 Z_1 Z_4 \\
 & + 0,001189 Z_2^2 + 1,99 \times 10^{-4} Z_3^2 + 1,12 \times 10^{-4} Z_4^2
 \end{aligned}$$

Figura 30. a) Normal vs residual y b) Predicho vs actual para la capacidad de absorción de aceite por la proteína de torta de nuez de Castaña (*Bertholletia excelsa*) desgrasada.



La validación del modelo se confirma mediante el análisis de residuales (Figura 30). Los gráficos de probabilidad normal (Fig. 30a) y Predichos vs. Actuales (Fig. 30b) , junto con las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, $p = 0,9448$), confirman que el modelo cumple con los supuestos estadísticos.

Tabla 35: Análisis de los residuales para la CAAC

	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
Capacidad absorción de aceite (CAAC, %)	1,00E-05	0,03852	0,00703

Tabla 36: Análisis de normalidad de capacidad de absorción de aceite

Pruebas	Estadístico	Valor-p	Decisión (5%)
Shapiro-Wilk	0,98546	0,9448	No se rechaza la normalidad
Kolmogorov Smirnov	0,09874	1,0	No se rechaza la normalidad
Chen-Shapiro	-0,11718	0,04132	

Figura 31. Distribución de la normalidad del residual de la CAAa.

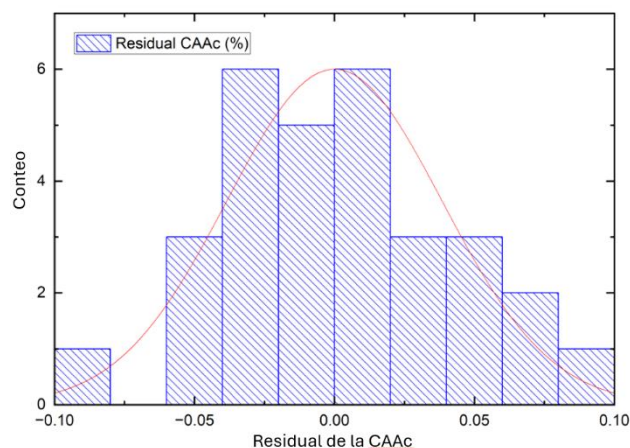
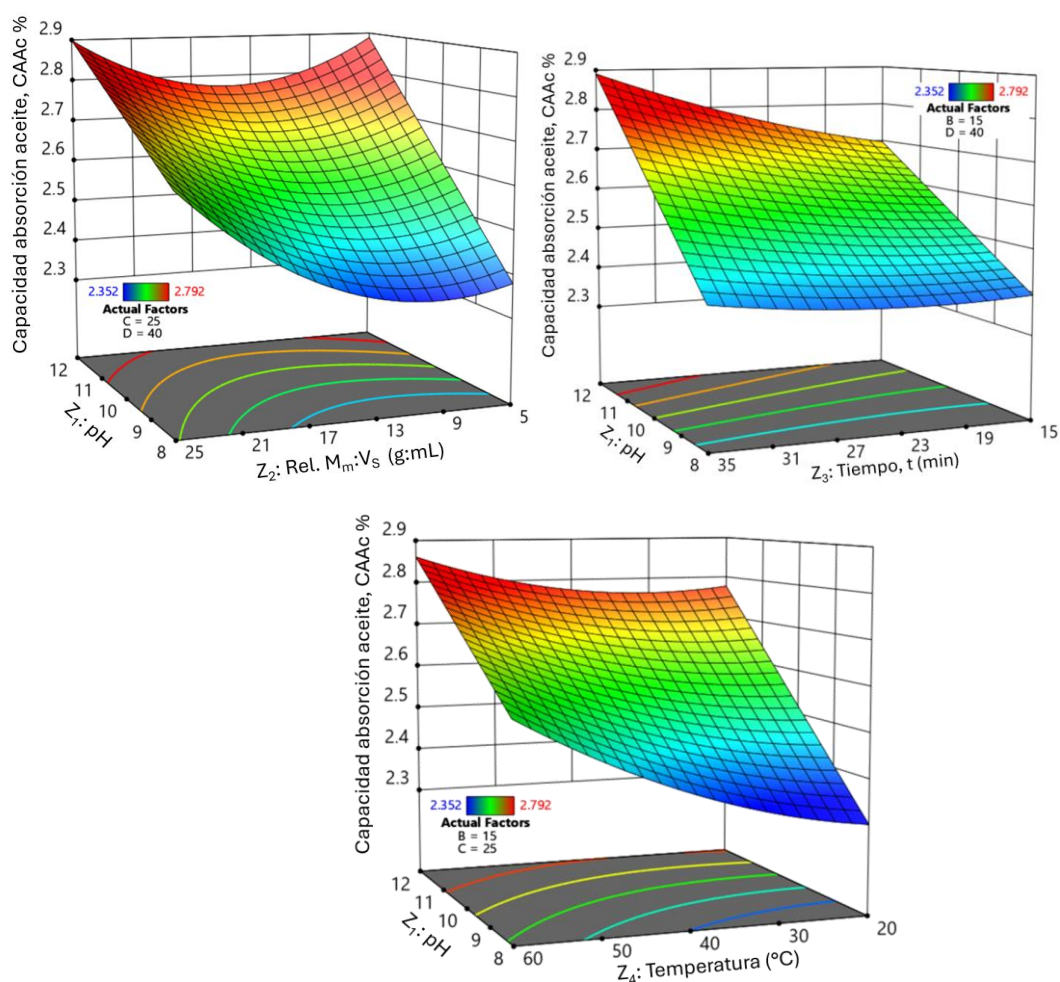


Figura 32. Comportamiento de la capacidad de absorción de aceite (g aceite/g proteína aislada de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*)) como funciones de Z1, Z2, Z3 y Z4.



Las superficies de respuesta (Figura 32) permiten interpretar el efecto de las variables significativas: Efecto del pH (Z1) y Temperatura (Z4): Se observa una clara tendencia positiva. La CAAC aumenta significativamente a medida que se incrementan tanto el pH (hacia 12) como la Temperatura (hacia 60°C). El pH es el factor de mayor impacto, como lo demuestra su alto valor F y bajo valor-p.

Efecto del Tiempo (Z3): El tiempo de sonicación muestra un efecto lineal negativo, como lo indica el coeficiente negativo en la ecuación (-0,024929). Tiempos de sonicación más largos (hacia 35 min) tienden a disminuir ligeramente la CAAC.

Efecto de la Relación (Z2): La gráfica (Z1 vs Z2) muestra la curvatura predicha por el término Z22. La CAAC aumenta con la relación Mm:Vs hasta un punto óptimo (alrededor de 17-21 g:mL) y luego parece estabilizarse o disminuir ligeramente.

Análisis conjunto y consideraciones físico-químicas

Tanto la CAAG como la CAAC mostraron valores elevados en el rango de 2,3–2,8 g/g, evidenciando que la proteína de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa*) posee excelentes propiedades funcionales de retención y adsorción, comparables con proteínas vegetales comerciales como la soya (2,4–2,7 g/g) y girasol (2,2–2,5 g/g).

El ultrasonido contribuyó a la modificación estructural controlada de las proteínas, mejorando la accesibilidad de grupos reactivos hidrofílicos e hidrofóbicos por cavitación acústica y ruptura de enlaces no covalentes.

El comportamiento simultáneo de CAAG y CAAC respalda la hipótesis de que la extracción alcalina asistida por ultrasonido optimiza las propiedades funcionales de la proteína, incrementando su aplicabilidad industrial como ingrediente funcional, emulsionante o agente texturizante. Para ambas respuestas, el análisis de residuos confirmó la validez del modelo:

- Las gráficas residuales vs. valor predicho no mostraron heterocedasticidad.

- Las gráficas valor predicho vs. valor real exhibieron una fuerte correlación lineal.
- La normalidad de los residuos fue confirmada mediante pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,5$).
- La media de los residuos cercana a cero ($-3,33\text{E-}06$ para CAAG, $1,00\text{E-}05$ para CAAC) indica ausencia de sesgo sistemático.

4.6 Optimización

Los resultados obtenidos permiten establecer rigurosamente las condiciones operativas óptimas para la EAAU-PI de proteínas a partir de la TDC, con el objetivo de maximizar simultáneamente el rendimiento y las propiedades funcionales del aislado proteico (APC). El análisis se basa en un enfoque de optimización numérica mediante la función de deseabilidad global (D), utilizando modelos matemáticos previamente validados, de las Ecs. 10 a 15.

Modelos matemáticos considerados en cada etapa de las respuestas de estudio:

$$\begin{aligned} \eta = & -38,034 + 7,519 Z_1 + 12,02 Z_2 - 2,219 Z_3 - 0,468 Z_4 - 1,338 Z_1 Z_2 \\ & + 0,035 Z_1 Z_4 + 0,106 Z_2 Z_3 + 0,0299 Z_2 Z_4 + 0,096 Z_1^2 - 0,458 Z_2^2 \\ & + 0,0139 Z_3^2 - 0,005 Z_4^2 - 0,00086 Z_1 Z_2 Z_3 + 0,003 Z_1 Z_3 Z_4 \\ & - 0,000088 Z_2 Z_3 Z_4 + 0,0446 Z_1 Z_2^2 - 0,000153 Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \xi = & 792,61158 - 66,3486 Z_1 + 6,95656 Z_2 - 26,5494 Z_3 - 19,2966 Z_4 \\ & - 0,4643 Z_1 Z_2 + 2,6858 Z_1 Z_3 + 2,2079 Z_1 Z_4 + 0,0788 Z_2 Z_3 \\ & + 0,2792 Z_2 Z_4 + 0,4781 Z_3 Z_4 - 1,1856 Z_1^2 - 0,6361 Z_2^2 \\ & - 0,01499 Z_4^2 - 0,03308 Z_1 Z_2 Z_4 - 0,0509 Z_1 Z_3 Z_4 + 0,0563 Z_1 Z_2^2 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \text{CE}(\%) = & 73,605 - 22,1233 Z_1 + 0,9106 Z_2 + 2,3542 Z_3 + 1,4922 Z_4 \\ & - 0,4656 Z_2 Z_3 - 0,1725 Z_2 Z_4 + 0,0521 Z_3 Z_4 + 1,4535 Z_1^2 + 0,3137 Z_2^2 \\ & - 0,0062 Z_3^2 - 0,0045 Z_4^2 + 0,0359 Z_1 Z_2 Z_3 + 0,0106 Z_1 Z_2 Z_4 \\ & - 0,008945 Z_1 Z_3 Z_4 + 0,00259 Z_2 Z_3 Z_4 - 0,00237 Z_1^2 Z_2^2 \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned}
EE(\%) = & 24,02442 - 5,46019 Z_1 - 0,769263 Z_2 - 0,603798 Z_3 + 1,69667 Z_4 \\
& - 0,087 Z_1 Z_2 + 0,09018 Z_1 Z_3 - 0,105918 Z_1 Z_4 - 0,006896 Z_2 Z_4 \\
& + 0,744104 Z_1^2 + 0,058748 Z_2^2 - 0,005863 Z_4^2 \\
& - 0,000423 Z_1 Z_3 Z_4 + 0,000479 Z_2 Z_3 Z_4
\end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned}
CAAg(\%) = & 3,24426 - 0,2682 Z_1 - 0,08963 Z_2 + 0,06256 Z_3 + 0,0316 Z_4 \\
& + 0,0149 Z_1 Z_2 + 0,002675 Z_1 Z_4 - 0,00299 Z_2 Z_3 - 0,00167 Z_2 Z_4 \\
& - 0,0021 Z_3 Z_4 - 1,96 \times 10^{-4} Z_4^2 + 9,9 \times 10^{-5} Z_2 Z_3 Z_4 \\
& - 1,39 \times 10^{-4} Z_1^2 Z_2 + 1,1210^{-4} Z_1^2 Z_3
\end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned}
CAAc(\%) = & 1,38275 + 0,136 Z_1 + 0,001443 Z_2 - 0,024929 Z_3 + 0,006612 Z_4 \\
& - 0,00305 Z_1 Z_2 + 0,00205 Z_1 Z_3 - 0,001125 Z_1 Z_4 \\
& + 0,001189 Z_2^2 + 1,99 \times 10^{-4} Z_3^2 + 1,12 \times 10^{-4} Z_4^2
\end{aligned} \quad (15)$$

La optimización se realizó mediante una función de deseabilidad global (D, Ec. 17), combinando múltiples objetivos: maximizar rendimiento global (η), la eficiencia de extracción (ξ), la capacidad emulsificante (CE), la estabilidad emulsificante (EE), la capacidad de absorción de agua (CAAg) y aceite (CAAc), mientras se minimizan los errores estándar asociados a cada predicción. Este enfoque es adecuado para problemas multiobjetivo, ya que permite equilibrar compromisos entre respuestas que pueden tener tendencias contrapuestas. Todos los factores y respuestas fueron ponderados con una “importancia” de 3, asumiendo igual relevancia funcional (Tabla 20).

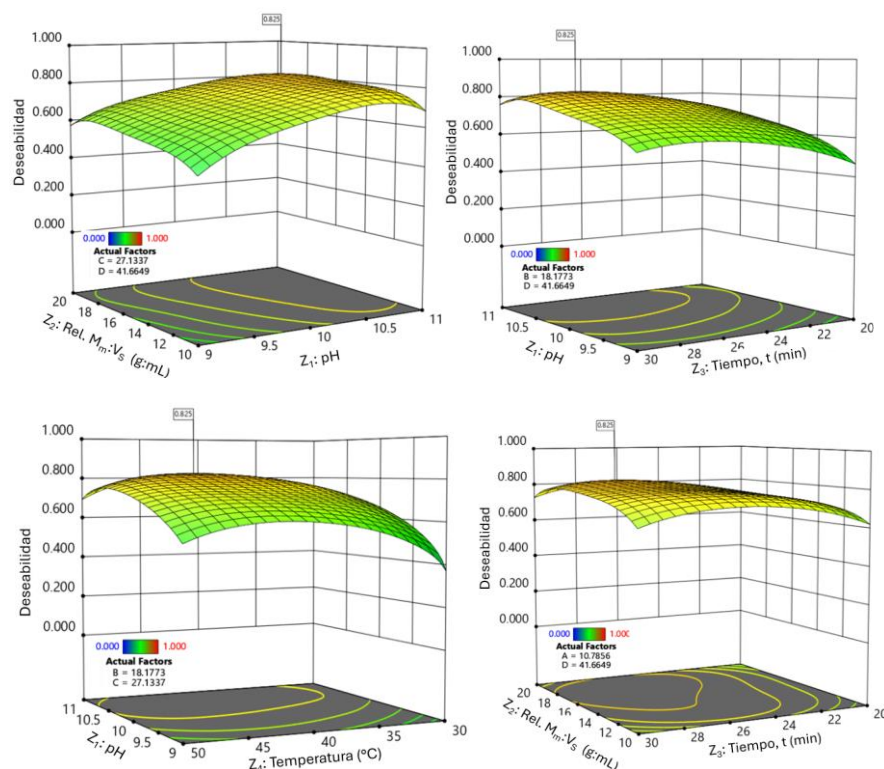
$$D(\mathbf{z}) = \left(d_1^{w_j} \times d_2^{w_j} \times d_3^{w_j} \times d_4^{w_j} \right)^{\frac{1}{\sum_{j=1}^m w_j}} = \left[\prod_{j=1}^m d_j(\mathbf{z})^{w_j} \right]^{\frac{1}{\sum_{j=1}^m w_j}} \quad (17)$$

El valor de deseabilidad $D = 0,825$ indica una solución altamente satisfactoria, ya que valores superiores a 0,7 son considerados aceptables en procesos industriales, y cercanos a 1 representan un ajuste casi perfecto.

Tabla 37: Restricciones consideradas para la optimización

Nombre	Criterio optimización	Límite inferior	Límite superior	Importancia
Z_1 : pH	En el rango	9	11	3
Z_2 : Relación Mm:Vs	En el rango	10	20	3
Z_3 : Tiempo sonicación	En el rango	20	30	3
Z_4 : Temperatura extracción	En el rango	30	50	3
Rendimiento global	Maximizar	17,48	29,072	3
StdErr(Rendimiento global)	Minimizar	0,4222	0,9900	3
Eficiencia extracción alcalina	Maximizar	74,0973	98,6747	3
StdErr(Eficiencia extracción alcalina)	Minimizar	1,2148	3,3489	3
Capacidad de emulsificante	Maximizar	22,5726	60,746	3
StdErr(CE)	Minimizar	1,4754	2,9508	3
Estabilidad de emulsificante	Maximizar	48,125	73,889	3
StdErr(Ee)	Minimizar	1,1715	2,5866	3
CAAg	Maximizar	2,132	2,704	3
StdErr(CAAg)	Minimizar	0,01336	0,04456	3
CAAc	Maximizar	2,352	2,792	3
StdErr(CAAc)	Minimizar	0,01646	0,03596	3

Figura 33. Identificación gráfica de las condiciones óptimas de estudio



Las condiciones operativas predichas en la Tabla 38, se ubican dentro del dominio experimental explorado, lo cual garantiza que la predicción no implique extrapolación más allá del rango de validez de los modelos. El pH óptimo (~10,8) confirma hallazgos previos sobre la solubilidad proteica máxima en medio alcalino, donde la carga negativa neta promueve la repulsión electrostática y desagregación de complejos proteicos. La relación masa:volumen elevada (18,2 g:mL) sugiere que una menor dilución favorece la concentración de proteína disponible para la sonicación, aunque podría afectar la transferencia de energía ultrasónica si aumenta excesivamente la viscosidad. El tiempo de sonicación (27,1 min) y la temperatura (41,7 °C) también están en el extremo superior del rango, indicando que la energía mecánica y térmica prolongadas mejoran la liberación de proteínas, siempre que no induzcan desnaturalización severa.

Los gráficos de superficie de respuesta para la deseabilidad (Figura 33) confirman visualmente esta solución. Las zonas de máxima deseabilidad (color amarillo) se localizan consistentemente a valores de pH altos (aprox. 10.5-11) y relaciones Z2 altas (aprox. 16-20 g:mL), validando la solución numérica encontrada.

Tabla 38: Resultado de la optimización

Variable	Valor
Z_1 : pH	10,785
Z_2 : Relación Mm:Vs	18,175
Z_3 : Tiempo sonicación	27,139
Z_4 : Temperatura extracción	41,659
η : Rendimiento global	26,994
StdErr (η)	0,432
ξ : Eficiencia extracción alcalina	92,779
StdErr (ξ)	1,387
CE : Capacidad de emulsificante	66,924
StdErr (CE)	1,404
EE : Estabilidad de emulsificante	62,243
StdErr (EE)	1,280
$CAAg$: Capacidad de absorción de agua	2,499
StdErr (CAAg)	0,020
$CAAc$: Capacidad de absorción de aceite	2,705
StdErr (CAAc)	0,019
Deseabilidad	0,825

Bajo estas condiciones óptimas, los modelos matemáticos ajustados predicen los siguientes valores para las variables respuesta, reflejando un alto rendimiento y excelentes propiedades funcionales. Especialmente destacable es la alta capacidad emulsificante y lipofilia, que posicionan al aislado como un ingrediente funcional potencialmente viable en alimentos emulsionados.

La validación experimental se realizó bajo condiciones cercanas a las óptimas predichas (Z_1 pH = 11, Z_2 Relación masa muestra: volumen solución = 18,2,

Z_3 tiempo de sonicación = 27 min. y Z_4 Temperatura de extracción alcalina = 42 min). Los resultados promedio de tres réplicas se muestran en la Tabla 39. Un análisis comparativo revela una excelente concordancia, con errores relativos moderados. El error más significativo se observa en el rendimiento global (η), con una subestimación del 9,93%. Este margen de error es razonable en procesos de ingeniería de alimentos, dado que puede atribuirse a variabilidad inherente en el material biológico (torta de nuez de castaña *Bertholletia excelsa*), pequeñas fluctuaciones operativas o limitaciones del modelo polinomial. No obstante, el hecho de que el valor validado (29,969%) sea coherente con el máximo observado en el diseño experimental (29,072%, tratamiento 25) refuerza la validez del proceso de optimización.

Las propiedades funcionales presentan errores relativos entre 8% y 14%, lo cual es aceptable dada la complejidad de los fenómenos interfaciales involucrados. La subestimación de CE y EE sugiere que el modelo no captura completamente la mejora conformacional inducida por la sonicación y el pH óptimo.

Tabla 39: Validación de las condiciones operativas óptimas a las condiciones de Z1 (pH = 11), Z2 (Relación masa muestra: volumen solución = 18,2), Z3 (tiempo de sonicación = 27 min) y Z4 (Temperatura de extracción alcalina = 42 min)

N°	Rendimiento global η (% b.s)	Eficiencia extracción alcalina ξ (%)	Capacidad emulsificante CE (%)	Estabilidad emulsificante EE (%)	Capacidad de absorción de agua AAG (g agua/g APC)	Capacidad de absorción de aceite AA (g aceite/g APC)
1	29,994	96,00	77,78	67,78	2,252	2,452
2	30,010	93,40	76,47	67,85	2,256	2,360
3	29,960	92,90	77,809	67,303	2,260	2,348
Prom	29,9693	94,10	77,354	67,645	2,256	2,387
StdDv	0,03495	1,6643	0,762	0,298	0,004	0,057
StErr	0,02018	0,9609	0,44	0,172	0,002	0,033

Los modelos subyacentes han sido previamente validados estadísticamente: $R^2 > 0,86$, R^2 ajustado $> 0,75$, precisión adecuada $> 9,9$. falta de ajuste no significativo ($p > 0,4$) para todas las respuestas. Residuos normales (pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov no significativas). Esto confirma que los modelos tienen buena capacidad explicativa y predictiva. El pequeño sesgo observado en la validación puede deberse a: Variabilidad no capturada en la materia prima, Efectos de orden en la replicación del experimento, y limitaciones del modelo linealizado para predecir comportamientos no lineales extremos.

La desviación entre el valor experimental y valor teórico de optimización multivariable según la función de deseabilidad es,

$$\varepsilon(\eta_{global}) = \left| \frac{\eta_{exp} - \eta_{teo}}{\eta_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{29,9693 - 26,994}{29,9693} \right| 100\% = 9,927\%$$

$$\varepsilon(\xi) = \left| \frac{\xi_{exp} - \xi_{teo}}{\xi_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{94,10 - 92,779}{94,10} \right| 100\% = 1,404 \%$$

$$\varepsilon(CE) = \left| \frac{CE_{exp} - CE_{teo}}{CE_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{77,809 - 66,924}{77,809} \right| 100\% = 13,989 \%$$

$$\varepsilon(EE) = \left| \frac{EE_{exp} - EE_{teo}}{EE_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{67,645 - 62,243}{67,645} \right| 100\% = 8,3564 \%$$

$$\varepsilon(CAAG) = \left| \frac{CAAG_{exp} - CAAG_{teo}}{CAAG_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{2,256 - 2,499}{2,256} \right| 100\% = 10,771 \%$$

$$\varepsilon(CAAC) = \left| \frac{CAAC_{exp} - CAAC_{teo}}{CAAC_{exp}} \right| 100\% = \left| \frac{2,387 - 2,705}{2,387} \right| 100\% = 13,322 \%$$

4.7 Análisis fisicoquímico de la proteína aislada de torta de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).

El aislado proteico (APC) presentó una composición de 84,75% de proteína base húmeda (b.h.), que equivale a 89,389% base seca (b.s.). Este valor representa un aumento sustancial respecto al 50,5% presente en la materia prima, lo que implica una eficiencia de enriquecimiento proteico del 76,8%. Esta elevada pureza confirma que el proceso de extracción alcalina seguido de precipitación isoelectrica es altamente selectivo para las proteínas solubles, permitiendo la eliminación efectiva de carbohidratos, lípidos residuales y cenizas.

La eficiencia del proceso puede cuantificarse mediante la relación de enriquecimiento (RE):

$$RE = \frac{\text{Proteína}_{\text{aislado}}}{\text{Proteína}_{\text{Torta desgrasada}}} = \frac{89,389}{50,50} = 1,77$$

Un RE > 1,7 indica un proceso de fraccionamiento muy eficiente, comparable o superior al de aislados comerciales de soja (~80–85% b.s.).

Tabla 40: Análisis proximal de la proteína aislada de *B. excelsa* obtenida

Parámetros	Composición (% b.h)	Masa unitaria Base húmeda (g)	Masa unitaria base seca (g)	Composición % (b.s)
Humedad	5,200	0,520	0,000	0,000
Proteína	84,750	8,475	8,475	89,389
Grasa	1,560	0,156	0,156	1,645
Carbohidratos	3,100	0,310	0,310	3,270
Fibra	1,200	0,120	0,120	1,266
Ceniza	4,200	0,420	0,420	4,430
TOTAL	100,0	10,000	9,481	100,0

La composición final del APC (base seca), Tabla 40, reflejan un producto de alta calidad: El bajo contenido de grasa (< 2%) indica una eficaz remoción de lípidos residuales durante el prensado hidráulico y el desgrasado con hexano.

El contenido de carbohidratos (3,27%) sugiere una buena separación de azúcares solubles y polisacáridos, aunque no completa, lo cual es típico en aislados vegetales. Las cenizas (4,43%), aunque ligeramente superiores a algunos aislados comerciales, son coherentes con la presencia de minerales inherentes a la semilla amazónica, incluyendo selenio (6,67 mg/kg), un nutriente valioso.

La correlación con el modelo de optimización, con el análisis proximal no es una variable de respuesta directa en el modelo matemático, su valor está intrínsecamente ligado a las condiciones óptimas predichas. El modelo para el rendimiento global (η) y la eficiencia de extracción (ξ) alcanzó un máximo predicho de 26,994% y 92,779%, respectivamente, bajo condiciones de pH 10,785, relación Mm:Vs 18,175 g:mL, 27,139 min y 41,659 °C. La validación experimental arrojó un rendimiento de $29,969 \pm 0,02\%$, lo cual es consistente con la obtención de un aislado de alta pureza (89,389% proteína).

Este resultado valida indirectamente los modelos, ya que un alto rendimiento combinado con una alta pureza indica que el proceso no solo maximiza la cantidad extraída, sino también las propiedades funcionales del producto. La función de deseabilidad ($D = 0,825$) incorporó múltiples objetivos funcionales, y el hecho de que el aislado final cumpla con estándares de pureza aceptables para ingredientes alimentarios refuerza la robustez de la estrategia de optimización.

CONCLUSIONES

Este estudio establece un protocolo riguroso y optimizado para la obtención de un aislado proteico funcional de alta calidad a partir de la torta desgrasada de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K) (TDC), mediante extracción alcalina asistida por ultrasonido (EAAU) seguida de precipitación isoeléctrica. La aplicación del diseño compuesto central (CCD) y la metodología de superficie de respuesta (RSM) permitió modelar con precisión los efectos individuales, cuadráticos e interactivos de cuatro variables operativas —pH, relación masa:volumen, tiempo y temperatura de sonicación— sobre el rendimiento de extracción y las propiedades funcionales clave del APC.

Los modelos matemáticos desarrollados mostraron una alta significancia estadística ($p < 0,0001$), bondad de ajuste robusta ($R^2 > 0,86$, R^2 ajustado $> 0,75$) y ausencia de falta de ajuste (lack of fit, $p > 0,4$), validando su capacidad predictiva. El pH emergió como el factor dominante en todas las respuestas, consistentemente influenciado por interacciones significativas con otros parámetros. Mediante la función de deseabilidad ($D = 0.825$), se predijeron condiciones óptimas: pH 10,79, relación 18,18 g: mL, 27,14 min de sonicación y 41,66 °C, logrando un equilibrio entre cantidad y las propiedades funcionales del producto.

La validación experimental arrojó un rendimiento de $29.97 \pm 0.02\%$, con propiedades funcionales sobresalientes: capacidad emulsificante (CE) de $77,35 \pm 0.44\%$, estabilidad emulsificante (EE) de $67,65 \pm 0,17\%$, capacidad de absorción de agua (CAAg) de $2,256 \pm 0,002$ g/g y aceite (CAAc) de $2,387 \pm 0,033$ g/g, con errores relativos $\leq 14\%$, lo que confirma la validez del modelo. El análisis proximal reveló un APC con 89,39% de proteína en base seca, bajo contenido de grasa (1,64%) y cenizas (4,43%), indicativo de una alta pureza.

En conjunto, estos resultados demuestran que la EAAU-PI es un proceso eficiente y reproducible para transformar un subproducto agroindustrial subutilizado en un ingrediente funcional de alto valor agregado. El aislado proteico de nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) presenta propiedades funcionales comparables o superiores a las de aislados

comerciales, posicionándolo como un candidato prometedor para su incorporación en alimentos fortificados, nutraceuticos y formulaciones sostenibles, contribuyendo así a la economía circular en la región amazónica.

SUGERENCIAS

Se recomienda realizar estudios como:

- Ampliar el estudio a nivel piloto o industrial para comprobar la eficiencia del proceso con ultrasonido en mayor escala.
- Analizar el valor nutricional completo del APC, especialmente su contenido y biodisponibilidad de selenio.
- Aprovechar el residuo del proceso para obtener otros productos, como fibra o antioxidantes naturales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUILAR-ACOSTA, L., SERNA-SALDIVAR, S., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J., ESCALANTE-ABURTO, A. y CHUCK-HERNÁNDEZ, C., 2020. Effect of Ultrasound Application on Protein Yield and Fate of Alkaloids during Lupin Alkaline Extraction Process. *Biomolecules*, vol. 10, no. 2, pp. 292. ISSN 2218-273X. DOI 10.3390/biom10020292.
- [2] AJIBOLA, C.F. y ALUKO, R.E., 2022. Physicochemical and Functional Properties of 2S, 7S, and 11S Enriched Hemp Seed Protein Fractions. *Molecules*, vol. 27, no. 3, pp. 1059. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules27031059.
- [3] ALCÂNTARA, D.B., DIONÍSIO, A.P., ARTUR, A.G., SILVEIRA, B.K.S., LOPES, A.F., GUEDES, J.A.C., LUZ, L.R., NASCIMENTO, R.F., LOPES, G.S., HERMSDORFF, H.H.M. y ZOCCOLO, G.J., 2022. Selenium in Brazil nuts: An overview of agronomical aspects, recent trends in analytical chemistry, and health outcomes. *Food Chemistry*, vol. 372, pp. 131207. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2021.131207.
- [4] AMPE, C., VAN DAMME, J., DE CASTRO, L.A.B., SAMPAIO, M.J.A.M., VAN MONTAGU, M. y VANDEKERCKHOVE, J., 1986. The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *European Journal of Biochemistry*, vol. 159, no. 3, pp. 597-601. ISSN 0014-2956. DOI 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09926.x.
- [5] ANDREOLI, V., BAGLIANI, M., CORSI, A. y FRONTUTO, V., 2021. Drivers of Protein Consumption: A Cross-Country Analysis. *Sustainability*, vol. 13, no. 13, pp. 7399. ISSN 2071-1050. DOI 10.3390/su13137399.
- [6] ARCE GUZMÁN, A.Y., 2015. *DISEÑO DE UNA PRENSA TIPO EXPPELLER PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE A PARTIR DE SEMILLAS OLEAGINOSAS, MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE INGENIERÍA INVERSA* . Medellín : UNIVERSIDAD EAFIT.
- [7] ARIANE, M.K., MARISTELA, M., SILMARA, M.M., RENATA, H.S., KARINE, S.N., HELYDE, A.M. y AUGUSTO, K.J., 2015a. Properties of Brazil nuts: A review.

- African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 8, pp. 642-648. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/AJB2014.14184.
- [8] ARIANE, M.K., MARISTELA, M., SILMARA, M.M., RENATA, H.S., KARINE, S.N., HELYDE, A.M. y AUGUSTO, K.J., 2015b. Properties of Brazil nuts: A review. *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 8, pp. 642-648. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/AJB2014.14184.
- [9] ARIANE, M.K. y VILDES, M.S., 2015. Brazil nut allergy: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 9, no. 26, pp. 633-644. ISSN 1996-0816. DOI 10.5897/AJPP2014.4206.
- [10] BANSAL, M., POONIA, A., KOLLURI, S.R.P. y VASUNDHARA, 2023. Introduction on Bioactive Compounds, Sources and their Potential Applications. *Bioactive Components*. Singapore: Springer Nature Singapore, pp. 3-26.
- [11] BEZERRA, M.A., SANTELLI, R.E., OLIVEIRA, E.P., VILLAR, L.S. y ESCALEIRA, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, vol. 76, no. 5, pp. 965-977. ISSN 00399140. DOI 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [12] BHARGAVA, N., MOR, R.S., KUMAR, K. y SHARANAGAT, V.S., 2021. Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 70, pp. 105293. ISSN 13504177. DOI 10.1016/j.ultsonch.2020.105293.
- [13] BISHT, A., SINGH, S.K. y KALDATE, R., 2021. Bertholletia excelsa. *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease*. S.l.: Elsevier, pp. 379-387.
- [14] CABALLERO ESPEJO, J., MESSINGER, M., ROMÁN-DAÑOBEYTIA, F., ASCORRA, C., FERNANDEZ, L. y SILMAN, M., 2018. Deforestation and Forest Degradation Due to Gold Mining in the Peruvian Amazon: A 34-Year Perspective. *Remote Sensing*, vol. 10, no. 12, pp. 1903. ISSN 2072-4292. DOI 10.3390/rs10121903.
- [15] CARDOSO, B.R., DUARTE, G.B.S., REIS, B.Z. y COZZOLINO, S.M.F., 2017. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects.

- Food Research International*, vol. 100, pp. 9-18. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2017.08.036.
- [16] CHEMAT, F., ABERT VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A.-S., NUTRIZIO, M., REŽEK JAMBRAK, A., MUNEKATA, P.E.S., LORENZO, J.M., BARBA, F.J., BINELLO, A. y CRAVOTTO, G., 2020. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem.* [en línea], vol. 22, no. 8, pp. 2325-2353. DOI 10.1039/C9GC03878G. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C9GC03878G>.
- [17] CHÉMAT, Farid. y VOROBIEV, Eugène., 2020. *Green food processing techniques : preservation, transformation and extraction*. S.l.: Academic Press, an imprint of Elsevier. ISBN 9780128153536.
- [18] CHUNHIENG, T., PÉTRITIS, K., ELFAKIR, C., BROCHIER, J., GOLI, T. y MONTET, D., 2004a. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 13, pp. 4318-4322. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf049643e.
- [19] CHUNHIENG, T., PÉTRITIS, K., ELFAKIR, C., BROCHIER, J., GOLI, T. y MONTET, D., 2004b. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf049643e.
- [20] CRUZ-SOLIS, I., IBARRA-HERRERA, C.C., ROCHA-PIZAÑA, M. del R. y LUNA-VITAL, D., 2023. Alkaline Extraction–Isoelectric Precipitation of Plant Proteins. *Green Protein Processing Technologies from Plants*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1-29.
- [21] DA SILVA, A., SILVEIRA, B.K.S., DE FREITAS, B.V.M., HERMSDORFF, H.H.M. y BRESSAN, J., 2022. Effects of Regular Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Consumption on Health: A Systematic Review of Clinical Trials. *Foods*, vol. 11, no. 18, pp. 2925. ISSN 2304-8158. DOI 10.3390/foods11182925.
- [22] DING, Y., MA, H., WANG, K., AZAM, S.M.R., WANG, Y., ZHOU, J. y QU, W., 2021. Ultrasound frequency effect on soybean protein: Acoustic field

- simulation, extraction rate and structure. *LWT*, vol. 145, pp. 111320. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2021.111320.
- [23] DUKE, J.A., 2017. *Handbook of Nuts*. S.l.: CRC Press. ISBN 9780203752685.
- [24] ESCOBAL, J. y ALDANA, U., 2003. Are Nontimber Forest Products the Antidote to Rainforest Degradation? Brazil Nut Extraction in Madre De Dios, Peru. *World Development*, vol. 31, no. 11, pp. 1873-1887. ISSN 0305750X. DOI 10.1016/j.worlddev.2003.08.001.
- [25] FUNASAKI, M., MENEZES, I.S., BARROSO, H. dos S., ZANOTTO, S.P. y CARIOCA, C.R.F., 2013. Tocopherol profile of Brazil nut oil from different geographic areas of the Amazon region. *Acta Amazonica*, vol. 43, no. 4, pp. 505-509. ISSN 0044-5967. DOI 10.1590/S0044-59672013000400012.
- [26] GALLEGO-JUÁREZ, J.A., 2017. Basic Principles of Ultrasound. *Ultrasound in Food Processing*. S.l.: Wiley, pp. 1-26.
- [27] GAO, K., RAO, J. y CHEN, B., 2024. Plant protein solubility: A challenge or insurmountable obstacle. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 324, pp. 103074. ISSN 00018686. DOI 10.1016/j.cis.2023.103074.
- [28] GAO, Z., SHEN, P., LAN, Y., CUI, L., OHM, J.-B., CHEN, B. y RAO, J., 2020. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, vol. 131, pp. 109045. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2020.109045.
- [29] GENÇDAĞ, E., GÖRGÜÇ, A. y YILMAZ, F.M., 2021. Recent Advances in the Recovery Techniques of Plant-Based Proteins from Agro-Industrial By-Products. *Food Reviews International*, vol. 37, no. 4, pp. 447-468. ISSN 8755-9129. DOI 10.1080/87559129.2019.1709203.
- [30] GHAZANFAR, S., MUHAMMAD ALI, G., ABID, R., FARID, A., AKHTAR, N., AKHTAR BATOOL, N., KHALID, S., K. OKLA, M., S. AL-AMRI, S., A. ALWASEL, Y. y HAMEED, Y., 2022. An Overview of Functional Food. *Current Topics in Functional Food*. S.l.: IntechOpen,
- [31] GOMES, S. y TORRES, A.G., 2016. Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by <sc>HPLC</sc>. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture*, vol. 96, no. 8, pp. 2805-2814. ISSN 0022-5142. DOI 10.1002/jsfa.7448.
- [32] GOOGLE MAPS, 2025. Vista Fotografica (12°33'31.1"S 69°09'40.2"W). .
- [33] GUO, F., JIN, T., HOWARD, A. y ZHANG, Y.-Z., 2007. Purification, crystallization and initial crystallographic characterization of brazil-nut allergen Ber e 2. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, vol. 63, no. 11, pp. 976-979. ISSN 1744-3091. DOI 10.1107/S1744309107051445.
- [34] H. MYERS, R., C. MONTGOMERY, D. y M. ANDERSON-COOK, C., 2016. *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. S.l.: s.n.
- [35] HADIDI, M., IBARZ, A. y POURAMIN, S., 2021. Optimization of extraction and deamidation of edible protein from evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil processing by-products and its effect on structural and techno-functional properties. *Food Chemistry*, vol. 334, pp. 127613. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127613.
- [36] HAREL, O. y JBARA, M., 2023. Chemical Synthesis of Bioactive Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 62, no. 13, ISSN 1433-7851. DOI 10.1002/anie.202217716.
- [37] HELIKH, A.O., GAO, D. y DUAN, Z., 2020. OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED ALKALINE EXTRACTION OF PUMPKIN SEED MEAL PROTEIN ISOLATE BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *Scientific notes of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series: Technical Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 100-104. ISSN 26635941. DOI 10.32838/2663-5941/2020.2-2/17.
- [38] HU, X., ZENG, Z., ZHANG, J., WU, D., LI, H. y GENG, F., 2023. Molecular dynamics simulation of the interaction of food proteins with small molecules. *Food Chemistry*, vol. 405, pp. 134824. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.134824.
- [39] IBIAPINA, A., GUALBERTO, L. da S., DIAS, B.B., FREITAS, B.C.B., MARTINS, G.A. de S. y MELO FILHO, A.A., 2022. Essential and fixed oils from Amazonian

- fruits: proprieties and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 32, pp. 8842-8854. ISSN 1040-8398. DOI 10.1080/10408398.2021.1935702.
- [40] JAHAN, K., ASHFAQ, A., YOUNIS, K., YOUSUF, O. y ISLAM, R.U., 2022. A review of the effects of ultrasound-assisted extraction factors on plant protein yield and functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 16, no. 4, pp. 2875-2883. ISSN 2193-4126. DOI 10.1007/s11694-022-01390-6.
- [41] JAYASINGHE, S.B. y CARUSO, J.A., 2011. Investigation of Se-containing proteins in *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC-ESI-MS methods. *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 307, no. 1-3, pp. 16-27. ISSN 13873806. DOI 10.1016/j.ijms.2010.12.005.
- [42] JIA-TIH, L. y SHUKAO, L., 1990. The thermodynamic properties of protein. *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 23, no. 7, pp. 976-980. ISSN 0022-3727. DOI 10.1088/0022-3727/23/7/037.
- [43] JOHN, J.A. y SHAHIDI, F., 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of Functional Foods*, vol. 2, no. 3, pp. 196-209. ISSN 17564646. DOI 10.1016/j.jff.2010.04.008.
- [44] KARABULUT, G., YILDIZ, S., KARACA, A.C. y YEMIŞ, O., 2023. Ultrasound and enzyme-pretreated extraction for the valorization of pea pod proteins. *Journal of Food Process Engineering*, vol. 46, no. 12, ISSN 0145-8876. DOI 10.1111/jfpe.14452.
- [45] LARREA-ALCÁZAR, D., VILLANUEVA, G., POMA, A., ZENTENO-RUIZ, F., ARAUJO-MURAKAMI, A., ALTAMIRANO, S. y UGARTE, C., 2018. El árbol de la castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lecythidaceae) en Bolivia: distribución geográfica e impacto de la deforestación 2010-2015. ,
- [46] LAUTENBACH, V., HOSSEINPOUR, S. y PEUKERT, W., 2021. Isoelectric Point of Proteins at Hydrophobic Interfaces. *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, ISSN 2296-2646. DOI 10.3389/fchem.2021.712978.
- [47] LI, Q.-Z., ZHOU, Z.-R., HU, C.-Y., LI, X.-B., CHANG, Y.-Z., LIU, Y., WANG, Y.-L. y ZHOU, X.-W., 2023. Recent advances of bioactive proteins/polypeptides

- in the treatment of breast cancer. *Food Science and Biotechnology*, vol. 32, no. 3, pp. 265-282. ISSN 1226-7708. DOI 10.1007/s10068-022-01233-6.
- [48] LI, Z., LU, D. y GAO, X., 2021. *Optimization of mixture proportions by statistical experimental design using response surface method - A review*. 2021. S.l.: s.n.
- [49] LIMA, L.W., STONEHOUSE, G.C., WALTERS, C., MEHDAWI, A.F. El, FAKRA, S.C. y PILON-SMITS, E.A.H., 2019. Selenium Accumulation, Speciation and Localization in Brazil Nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Plants*, vol. 8, no. 8, pp. 289. ISSN 2223-7747. DOI 10.3390/plants8080289.
- [50] LIU, D., DI, H., GUO, Y., BETCHEM, G. y MA, H., 2022. Multi-mode S-type ultrasound-assisted protein extraction from walnut dregs and in situ real-time process monitoring. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 89, pp. 106116. ISSN 13504177. DOI 10.1016/j.ultsonch.2022.106116.
- [51] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, ISSN 00219258. DOI 10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
- [52] LUIS BYRON MÉNDEZ HURTARTE, 2012. *DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRENSA HIDRÁULICA PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES FIJOS, EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DE EXTRACTOS VEGETALES (LIEXVE) DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA*. Guatemala: UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
- [53] MACOVESCU, G., CHELARU, C., IGNAT, M., ALBU, L. y GURAU, D., 2018. Validation of method for determining the isoelectric point of protein solutions. *Leather and Footwear Journal*, vol. 18, no. 1, pp. 53-66. ISSN 15834433. DOI 10.24264/lfj.18.1.7.
- [54] MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA, R., PUŚCION-JAKUBIK, A., GRABIA, M., PERKOWSKI, J., NOWAKOWSKI, P., BIELECKA, J., SOROCZYŃSKA, J., KAŃGOWSKI, G., BOŁTRYK, J.M. y SOCHA, K., 2022. Nuts as a Dietary Enrichment with Selected Minerals—Content Assessment Supported by

- Chemometric Analysis. *Foods*, vol. 11, no. 20, pp. 3152. ISSN 2304-8158. DOI 10.3390/foods11203152.
- [55] MARTÍN GORDO, D.A., 2018. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, vol. 9, no. 1, pp. 81-104. ISSN 2145-6453. DOI 10.22490/21456453.1968.
- [56] MELO, V.M.M., XAVIER-FILHO, J., LIMA, M.S. y PROUVOST-DANON, A., 1994. Allergenicity and tolerance to proteins from brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Food and Agricultural Immunology*, vol. 6, no. 2, pp. 185-195. ISSN 0954-0105. DOI 10.1080/09540109409354829.
- [57] MINCETUR, 2023. Reporte de comercio regional, Diciembre 2023. <https://www.gob.pe/7717-reporte-de-comercio-regional-rcr>.
- [58] MONGOMERY, D.C., 2017. *Montgomery: Design and Analysis of Experiments*. S.l.: s.n.
- [59] MONGOMERY, D.C., 2020. *Design and Analysis of Experiments*. S.l.: s.n. ISBN 9781119492498.
- [60] MONTGOMERY, D.C., 2020. *Design and analysis of experiments*. S.l.: Wiley. ISBN 9781119492498.
- [61] MOREDA-PIÑEIRO, J., SÁNCHEZ-PIÑERO, J., ALONSO-RODRÍGUEZ, E., TURNES-CAROU, I., LÓPEZ-MAHÍA, P. y MUNIATEGUI-LORENZO, S., 2020. Major, minor and trace elements composition of Amazonian foodstuffs and its contribution to dietary intake. *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 14, no. 3, pp. 1314-1324. ISSN 2193-4126. DOI 10.1007/s11694-020-00379-3.
- [62] NITIWUTTITHORN, C., WONGSASULAK, S., VONGSAWASDI, P. y YONGSAWATDIGUL, J., 2024. Effects of alkaline and ultrasonication on duckweed (*Wolffia arrhiza*) protein extracts' physicochemical and techno-functional properties. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 8, ISSN 2571-581X. DOI 10.3389/fsufs.2024.1343615.
- [63] OELLER, M., KANG, R., BELL, R., AUSSERWÖGER, H., SORMANNI, P. y VENDRUSCOLO, M., 2023. Sequence-based prediction of pH-dependent

- protein solubility using CamSol. *Briefings in Bioinformatics*, vol. 24, no. 2, ISSN 1467-5463. DOI 10.1093/bib/bbad004.
- [64] OGUNWOLU, S.O., HENSHAW, F.O., MOCK, H.P. y MATROS, A., 2010. Production of protein concentrate and isolate from cashew (<i>Anacardium occidentale L.</i>) nut. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, vol. 10, no. 5, ISSN 1684-5358. DOI 10.4314/ajfand.v10i5.56334.
- [65] OOSTA, G.M., MATHEWSON, N.S. y CATRAVAS, G.N., 1978. Optimization of Folin-Ciocalteu reagent concentration in an automated Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, ISSN 10960309. DOI 10.1016/0003-2697(78)90723-6.
- [66] P. PETRECHEN, G., ARDUIN, M. y AMBRÓIO, J., 2019. Morphological Characterization of Brazil Nut Tree (*Bertholletia excelsa*) Fruit Pericarp. *Journal of Renewable Materials*, vol. 7, no. 7, pp. 683-692. ISSN 2164-6341. DOI 10.32604/jrm.2019.04588.
- [67] PREECE, K.E., HOOSHYAR, N., KRIJGSMAN, A., FRYER, P.J. y ZUIDAM, N.J., 2017. Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 113, pp. 94-101. ISSN 02552701. DOI 10.1016/j.cep.2016.09.003.
- [68] RAHMAN, M.M. y LAMSAL, B.P., 2021. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 20, no. 2, pp. 1457-1480. ISSN 1541-4337. DOI 10.1111/1541-4337.12709.
- [69] RAYAN, A.M., SWAILAM, H.M. y HAMED, Y.S., 2023. Composition, Structure, and Techno-Functional Characteristics of the Flour, Protein Concentrate, and Protein Isolate from Purslane (*Portulaca oleracea L.*) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 78, no. 1, pp. 117-123. ISSN 0921-9668. DOI 10.1007/s11130-022-01028-4.
- [70] RÖDER, M., FILBERT, H. y HOLZHAUSER, T., 2010. A novel, sensitive and specific real-time PCR for the detection of traces of allergenic Brazil nut

- (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, no. 5, pp. 2279-2288. ISSN 1618-2642. DOI 10.1007/s00216-010-4072-2.
- [71] SANTOS, O.V., CORRÊA, N.C.F., CARVALHO, R.N., COSTA, C.E.F., FRANÇA, L.F.F. y LANNES, S.C.S., 2013. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. *Food Research International*, vol. 51, no. 2, pp. 841-847. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2013.01.054.
- [72] SANTOS, O.V., CORRÊA, N.C.F., SOARES, F.A.S.M., GIOIELLI, L.A., COSTA, C.E.F. y LANNES, S.C.S., 2012. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*, vol. 47, no. 2, pp. 253-258. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2011.06.038.
- [73] SCHRAUZER, G.N., 2000. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *The Journal of Nutrition*, vol. 130, no. 7, pp. 1653-1656. ISSN 00223166. DOI 10.1093/jn/130.7.1653.
- [74] SCOPUS, 2024. SCOPUS. .
- [75] SELVIN, A.S.M., ISMAEL, M.F., RICARDO, S.A., JHUNIOR, A.M.F. y MARÍA, da C.C.F., 2020. Determination of total phenolic compounds, antioxidant activity and nutrients in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 14, no. 8, pp. 373-376. ISSN 1996-0875. DOI 10.5897/JMPR2020.6953.
- [76] SENGAR, A.S., THIRUNAVOOKARASU, N., CHOUDHARY, P., NAIK, M., SUREKHA, A., SUNIL, C.K. y RAWSON, A., 2022. Application of power ultrasound for plant protein extraction, modification and allergen reduction – A review. *Applied Food Research*, vol. 2, no. 2, pp. 100219. ISSN 27725022. DOI 10.1016/j.afres.2022.100219.
- [77] SHARMA, G.M., MUNDOMA, C., SEAVY, M., ROUX, K.H. y SATHE, S.K., 2010. Purification and Biochemical Characterization of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* L.) Seed Storage Proteins. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry*, vol. 58, no. 9, pp. 5714-5723. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf9036326.
- [78] SHRESTHA, S., HAG, L. van 't, HARITOS, V.S. y DHITAL, S., 2021. Lupin proteins: Structure, isolation and application. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 116, pp. 928-939. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2021.08.035.
- [79] SILLERO, A. y RIBEIRO, J.M., 1989. Isoelectric points of proteins: Theoretical determination. *Analytical Biochemistry*, vol. 179, no. 2, pp. 319-325. ISSN 00032697. DOI 10.1016/0003-2697(89)90136-X.
- [80] SUÁREZ CUBAS, J.G., 2010. *Utilización de la torta de castaña, Bertholletia excelsa (Lecythidaceae) en dietas de crecimiento para juveniles de gamitana, Colossoma macropomum (Pisces, Serrasalminidae) criados en estanques de tierra*. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- [81] SUN, S.S.M., LEUNG, F.W. y TOMIC, J.C., 1987. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) proteins: fractionation, composition, and identification of a sulfur-rich protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 35, no. 2, pp. 232-235. ISSN 0021-8561. DOI 10.1021/jf00074a016.
- [82] SUN, X., ABIOYE, R.O., ACQUAH, C. y UDENIGWE, C.C., 2023. Application of Ultrasound Technology in Plant-Based Proteins: Improving Extraction, Physicochemical, Functional, and Nutritional Properties. *Green Protein Processing Technologies from Plants* [en línea]. Cham: Springer International Publishing, pp. 265-289. Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-16968-7_11.
- [83] SUN, X., ZHANG, W., ZHANG, L., TIAN, S. y CHEN, F., 2020. Molecular and emulsifying properties of arachin and conarachin of peanut protein isolate from ultrasound-assisted extraction. *LWT*, vol. 132, pp. 109790. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109790.
- [84] SWENSON, J.J., CARTER, C.E., DOMECH, J.-C. y DELGADO, C.I., 2011. Gold Mining in the Peruvian Amazon: Global Prices, Deforestation, and Mercury Imports. *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, pp. e18875. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0018875.

- [85] TAKEUCHI, K.P. y EGEE, M.B., 2019. Bioactive Compounds of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.): Nutritional and Health Aspects. . S.l.: s.n., pp. 1-15.
- [86] UNIPROT, 2024. Universal Protein Knowledgebase. .
- [87] U.S. NATIONAL SCIENCE FOUNDATION, 2026. Protein Data Bank (RCSB PDB). *Integrative 3D Structures from the PDB Archive*.
- [88] VAN BILSEN, J.H., KNIPPELS, L.M., PENNINKS, A.H., NIEUWENHUIZEN, W.F., DE JONGH, H.H. y KOPPELMAN, S.J., 2013. The protein structure determines the sensitizing capacity of Brazil nut 2S albumin (*Ber e1*) in a rat food allergy model. *Clinical and Translational Allergy*, vol. 3, no. 1, ISSN 2045-7022. DOI 10.1186/2045-7022-3-36.
- [89] VASQUEZ-ROJAS, W. V., MARTÍN, D., MIRALLES, B., RECIO, I., FORNARI, T. y CANO, M.P., 2021. Composition of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK), Its Beverage and By-Products: A Healthy Food and Potential Source of Ingredients. *Foods*, vol. 10, no. 12, pp. 3007. ISSN 2304-8158. DOI 10.3390/foods10123007.
- [90] VASQUEZ-ROJAS, W.V., HERNÁNDEZ, D.M., CANO, M.P. y REALI, T.F., 2023. Extraction and Analytical Characterization of Phenolic Compounds from Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Skin Industrial by-Product. *Trends in Sciences*, vol. 20, no. 8, pp. 5457. ISSN 2774-0226. DOI 10.48048/tis.2023.5457.
- [91] VERA CANDIOTI, L., DE ZAN, M.M., CÁMARA, M.S. y GOICOECHEA, H.C., 2014. *Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development*. 2014. S.l.: s.n.
- [92] VIGNESH, A., AMAL, T.C., SARVALINGAM, A. y VASANTH, K., 2024. A review on the influence of nutraceuticals and functional foods on health. *Food Chemistry Advances*, vol. 5, pp. 100749. ISSN 2772753X. DOI 10.1016/j.focha.2024.100749.
- [93] WANG, F., ZHANG, Y., XU, L. y MA, H., 2020. An efficient ultrasound-assisted extraction method of pea protein and its effect on protein

functional properties and biological activities. *LWT*, vol. 127, pp. 109348. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2020.109348.

- [94] WILLEM, H.V., INGRAM, V.J. y GUARIGUATA, M.R., 2019. Brazil nut forest concessions in the Peruvian Amazon: success or failure? *International Forestry Review*, vol. 21, no. 2, pp. 254-265. ISSN 1465-5489. DOI 10.1505/146554819826606540.
- [95] WRABL, J.O., LARSON, S.A. y HILSER, V.J., 2002. Thermodynamic environments in proteins: Fundamental determinants of fold specificity. *Protein Science*, vol. 11, no. 8, pp. 1945-1957. ISSN 0961-8368. DOI 10.1110/ps.0203202.
- [96] YANG, J., 2009. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 42, no. 10, pp. 1573-1580. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2009.05.019.
- [97] YAO, S., LI, W., MARTIN, G.J.O. y ASHOKKUMAR, M., 2023. An Investigation into the Mechanism of Alkaline Extraction-Isoelectric Point Precipitation (AE-IEP) of High-Thiol Plant Proteins. *Applied Sciences*, vol. 13, no. 11, pp. 6469. ISSN 2076-3417. DOI 10.3390/app13116469.
- [98] ZHANG, F., LI, X. y WEI, Y., 2023. Selenium and Selenoproteins in Health. *Biomolecules*, vol. 13, no. 5, pp. 799. ISSN 2218-273X. DOI 10.3390/biom13050799.
- [99] ZHAO, X., ZHANG, X., LIU, H., ZHANG, G. y AO, Q., 2018. Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles. *Food Hydrocolloids*, ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2017.08.024.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de operacionalización de las variables

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	INDICES
VARIABLES INDEPENDIENTES	Condiciones operativas de extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoeléctrica de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Proporción masa muestra: volumen solución	g: mL	10; 20; 30; 40; 50
		pH solución	Escala de pH	9; 10; 11; 12; 13
		Temperatura del proceso	°C	45; 50; 55; 60; 65
		Tiempo de sonicación	min	30; 60; 90; 120; 150
VARIABLES DEPENDIENTES	Rendimiento y propiedades funcionales de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Concentración de proteína	Porcentaje de proteína	%
		Capacidad de absorción de agua y aceite	Agua/aceite retenido por APC	g/g
		Capacidad y estabilidad emulsificante	Formación y estabilidad de emulsión	%
		Rendimiento global en proteína aislada de <i>B. excelsa</i>	Rendimiento de extracción	%

Anexo 2. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA DE INVESTIGACION
Formulación de problema: ¿Cuál es la condición operativa óptima de extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoelectrica que maximice las propiedades funcionales y rendimiento de proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K)?	Objetivo general: Optimizar el proceso de extracción alcalina asistida por ultrasonido y la precipitación isoelectrica de proteínas presentes en la torta desgrasada de la nuez de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K). Objetivos específicos: - Establecer la relación cuantitativa entre las condiciones de operación de extracción alcalina asistido por ultrasonido con el rendimiento y concentración de proteína extraída; - Determinar el punto de precipitación isoelectrica de las proteínas de la harina de torta desgrasada de Castaña (TDC); - Analizar cómo los factores de extracción (pH de la solución, tiempo de sonicación, temperatura de extracción y proporción de masa de harina de castaña desgrasada respecto al volumen del solvente) afectan el rendimiento, contenido de proteína, solubilidad y actividad emulsificante de la proteína extraída de la nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).; y - Determinar las condiciones operativas óptimas para la extracción asistida por ultrasonido que maximicen el rendimiento, solubilidad y actividad emulsificante de la proteína extraída de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).	La extracción alcalina asistida por ultrasonido en condiciones óptimas de proporción de masa, pH, temperatura y tiempo, seguida de precipitación isoelectrica, maximiza el rendimiento y mejora las propiedades funcionales (solubilidad y actividad emulsificante) de las proteínas extraídas de la torta desgrasada de nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>), haciéndolas aptas para aplicaciones alimentarias.	Variables independientes: -pH de Extracción alcalina (8,9,10,11,12), -Relación masa muestra; volumen solución (1;5,10,20,25), -Temperatura de extracción (20,30,40,50,60°C), -Tiempo de Sonicación (15,20,25,30,35min). Variables dependientes: -Rendimiento de extracción (%), -Contenido de proteína (%), -Capacidad de absorción de agua y aceite (g/g), -Actividad de emulsificante (%).	Tipo de estudio Estudio experimental predictivo-comparativo. Material Experimental Torta desgrasada fue obtenida por prensado mecánico de la nuez de Castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>) calidad Midget. El análisis proximal se llevó a cabo siguiendo los métodos recomendados por la FAO Food and Nutrition Paper Vol 14/7. Concentración y rendimiento de proteínas. se determinó mediante el protocolo del método Folin-Ciocalteu fenol (Lowry et al. 1951; Oosta, Mathewson y Catravas 1978). Capacidad de absorción de agua y aceite Propiedades emulsionantes Las propiedades emulsionantes se evaluaron utilizando el protocolo descrito por Zhao et al. (2018), con modificaciones. Extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoelectrica La extracción alcalina asistido con ultrasonido de la harina desgrasada de torta de Castaña, se realizó de acuerdo con métodos descritos por Domínguez et al., (2023) y Golly et al., (2020) con algunas modificaciones.

**Anexo 3. Resultados de análisis proximal de la TDC, APC optimizado y descarte
de la extracción alcalina del laboratorio de control de calidad de la
Universidad Nacional del Altiplano**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD**



FIQ Nro

Nº 002389

Certificado de Análisis

ASUNTO : ANALISIS FISICO QUIMICO DE NUEZ DE CASTAÑA

SOLICITANTE : -Bach. GARCIA GUERRERO, Lucia
-Bach. VARGAS RIVERA, Stiven

PROYECTO DE TESIS : Optimización de la extracción alcalina asistido por ultrasonido y precipitación isoelectrica de proteínas contenidas en la torta desgrasada de la nuez de castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)

PROCEDENCIA : UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

MOTIVO : CONTROL DE CALIDAD

MUESTREO : 16/12/2024, por el interesado

ANÁLISIS : 16/12/2024

CODIGO DE MUESTRA : B009-00698

RESULTADOS DE CALIDAD FISICO QUIMICO

ENSAYOS	M - 1	M - 2	M - 3
HUMEDAD %	4.49	8.05	9.39
CENIZAS %	10.00	0.34	16.77
PROTEINA %	50.50	80.97	16.94
GRASA %	7.51	0.00	0.00
FIBRA CRUDA %	10.90	1.51	33.82
CARBOHIDRATOS %	16.16	9.13	23.08

METODOS DE ENSAYO:

Humedad: NTP 205.002:1979 (Revisada el 2016) (1979)

Ceniza: NTP 205.004:2017.

Proteína: NTP 205.005:2018. CEREALES

Grasa: NTP 205.003:2017/CT 1:2018

Fibra cruda: NTP 205.003:2017/CT 1:2018

Carbohidratos por diferencia

CONCLUSIÓN

Los resultados de los ensayos estan conformes.

FECHA DE EMISION: Puno, C.U.: 27 de diciembre del 2024

vºgº

Ing. Oswaldo Arpasí Alca
CIP. 160625
Analista de Laboratorio de Control de Calidad
F.I.Q. - U.N.A. - PUNO



Donaires Flores
DECANO DE LA F.I.Q.
U.N.A. - PUNO

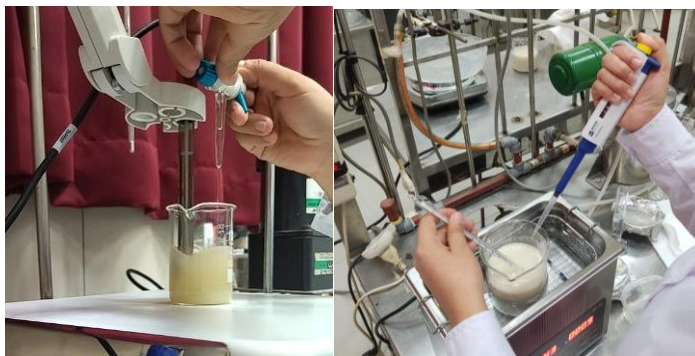
Anexo 4. Molienda y extracción del aceite por prensado hidráulico.



Anexo 5. Extracción de aceite por método Soxhlet



Anexo 6. Extracción alcalina asistido por ultrasonido



Anexo 7. Separación de fases por centrifugado



Anexo 8. Precipitación isoelectrica y obtención del APC.



Anexo 9. Determinación de concentración de proteína





Anexo 10. Determinación del punto isoelectrico de la torta desgrasada de Castaña (*Bertholletia excelsa*).



Anexo 11. capacidad de absorción de agua y aceite.



Anexo 12. Propiedades de emulsificante

