

**Universidad Del Valle de Guatemala**  
**Facultad de Ciencias y Humanidades**  
**Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos**



**Preparación y Caracterización de un Aislado Proteico de la Semilla  
de Hule (*Hevea brasiliensis*) y su Evaluación Funcional**

Guatemala  
2005



**Universidad Del Valle de Guatemala**  
**Facultad de Ciencias y Humanidades**  
**Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos**



**Preparación y Caracterización de un Aislado Proteico de la Semilla  
de Hule (*Hevea brasiliensis*) y su Evaluación Funcional**

**René Roberto Sánchez De León**

Trabajo de investigación presentado para optar el grado académico de:

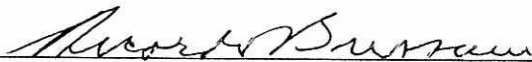
**Licenciado en Ingeniería en Ciencia de Alimentos**

**BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Guatemala  
2005

Vo. Bo.:

(f)



Dr. Ricardo Bressani


Tribunal:

(f)



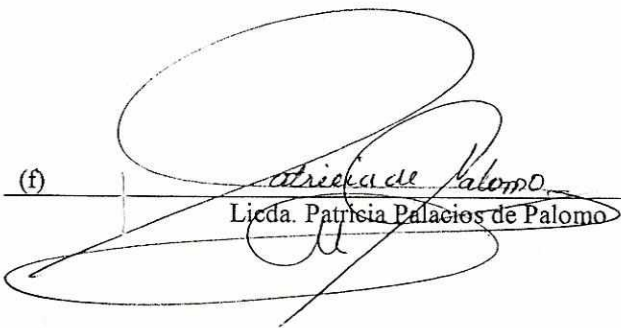
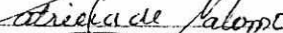
Dr. Ricardo Bressani

(f)



Licda. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f)

Licda. Patricia Palacios de Palomo

Fecha de aprobación: Guatemala, 07 de enero de 2005.

# Contenido

	<b>Página</b>
Resumen.....	iii
Lista de Tablas .....	iv
Lista de Diagramas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Ecuaciones.....	vii
Lista de Gráficos.....	viii
Prefacio.....	ix
I. Introducción.....	1
A. El problema y su importancia.....	1
B. Hipótesis.....	2
C. Objetivos.....	2
D. Materiales y métodos.....	3
II. Marco teórico.....	13
III. Resultados y Discusión.....	18
A. Composición de la semilla de hule.....	19
B. Extracción del aceite de la semilla de hule.....	20
C. Extracción de la proteína de semilla de hule.....	22
1. Determinación de la relación harina entre solvente para la extracción.....	24
2. Efecto del tiempo de extracción.....	26
3. Efecto de la temperatura en la extracción.....	26
4. Número de extracciones.....	26
D. Obtención del aislado de proteína de la semilla de hule.....	27
1. Composición del aislado de proteína.....	29
2. Evaluación nutricional del aislado.....	31
3. Rendimiento del aislado.....	33
4. Masa molecular de las proteínas de semilla de hule por electroforesis SDS-PAGE.....	33

E. Funcionalidad del aislado de proteína.....	34
1. Solubilidad e hidratación: efecto del pH y el calor.....	35
2. Actividad emulsificante.....	37
3. Estabilidad y capacidad de emulsión.....	38
4. Expansión y estabilidad de espuma.....	38
5. Capacidad de absorción de agua y aceite.....	39
6. Humectabilidad.....	41
7. Gelificación.....	42
IV. Conclusiones.....	43
V. Recomendaciones.....	44
VI. Bibliografía.....	46
VII. Apéndice.....	50
A. Gráficas, tablas y cálculos.....	50
B. Normas adjuntas.....	55
C. El proceso en fotos.....	61
D. Programación.....	64

## Resumen

El presente trabajo tenía como principal objetivo el diseño de un proceso de extracción de la proteína de semilla de hule mediante extracción isoelectrica, con el fin de obtener un aislado proteínico, que posteriormente se estudió para evaluar su toxicidad, su valor nutricional y la funcionalidad del mismo.

Fue posible desarrollar un proceso de extracción para la proteína de semilla de hule con los siguientes parámetros: relación harina entre solvente 5%, a 25 °C, durante 60 minutos, con dos extracciones, adición de ácido clorhídrico y etanol para la precipitación de la proteína, para finalmente ser aislada mediante centrifugación-filtrado y luego de un proceso de secado y molienda obtener el aislado de proteína. El aislado de proteína presentó un contenido de 23.5 mg lisina reactiva/g proteína y 0.0344 mg HCN (ácido cianhídrico/g producto), estos resultados indican en primera instancia que la proteína de semilla de hule no es una fuente proteínica muy buena, sin embargo no es tóxica pues dado el contenido de HCN sería necesario que un humano de unos 60 kg consumiera alrededor de 1.84 kg en una ingesta para ser intoxicado por este aislado.

Según los resultados de la presente investigación, la proteína de hule no es un buen emulsificante, no forma una espuma estable y no es capaz de formar un gel fuerte y cohesionado. No obstante, el aislado presenta buena absorción de agua y aceite, además de humectarse fácilmente, las dos primeras propiedades sugieren que el mismo podría utilizarse en formulaciones alimenticias para salchichas, bizcochos, pan y productos horneados pobres en absorción de grasa, por ejemplo: buñuelos.

El aislado de proteína presentó cuatro grupos de proteínas detectados por electroforesis de gel con docecil sulfato de sodio y poliacrilamida o SDS-PAGE (por sus siglas en inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel), los grupos hallados presentaban las siguientes masas moleculares: grupo de masa alrededor de 7 a 10 kD, grupo dos alrededor de 30 a 36 kD, un tercero aproximadamente de 75 kD y finalmente, un cuarto grupo de unos 118 kD.

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Diseño experimental para el estudio de las variables de extracción de la proteína de semilla de hule.....	5
2	Contenido de proteínas de la semilla de hule según su solubilidad.....	14
3	Reseña de las propiedades funcionales de las proteínas alimenticias.....	16
4	Composición proximal de la semilla de hule ( <i>Hevea brasiliensis</i> ).....	19
5	Porcentaje de proteína de semilla de hule extraída durante 60 minutos a diferentes relaciones harina/solvente y a 25 °C y 40 °C.....	25
6	Composición del aislado de proteína de semilla de hule ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) obtenido mediante precipitación isoelectrica.....	30
7	Contenido de lisina en el aislado de proteína de semilla de hule.....	31
8	Contenido de glucósidos cianogénicos (como ácido cianhídrico HCN) en el aislado de proteína de semilla de hule.....	32
9	Propiedades funcionales del aislado de proteína de semilla de hule.....	35
10	Porcentaje de proteína de semilla de hule extraída a 25 °C y 40 °C.....	50
11	Valores de proteína extraídos en porcentaje predichos por los modelos de regresión del gráfico No. 13.....	54

## Lista de diagramas

Diagrama		Página
1	Esquema de extracción del aceite de la semilla de hule.....	4
2	Operaciones generales para la preparación de un aislado de proteína de semilla de hule.....	6
3	Esquema de extracción de la proteína de semilla de hule, a partir de la harina desgrasada.....	7
4	Balance de masa para la determinación del rendimiento de extracción de proteínas de semilla de hule.....	33

## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Factores que influncian las propiedades funcionales de proteínas en alimentos.....	16
2	Patrón de flujo en un tanque con agitación con el agitador no centrado.....	28
3	Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de semilla de hule.....	34

## Lista de ecuaciones

<b>Ecuación</b>		<b>Página</b>
1	Rendimiento de la extracción de proteínas.....	7
2	Incremento de volumen de espuma.....	8
3	Actividad emulsificante.....	11
4	Expresión de la cantidad de masa transferida.....	20
5	Media aritmética.....	51
6	Expresión para la evaluación de diferencias entre dos poblaciones, mediante el test "t" de student.....	51
7	Desviación estándar ponderada.....	51

## Lista de gráficos

Gráfico		Página
1	Solubilidad de proteínas de la semilla de hule según su pH.....	15
2	Variación del contenido de proteína y grasa en la harina de semilla de hule entera y la harina desgrasada.....	21
3	Solubilidad de proteínas de la semilla de hule según su pH.....	23
4	Comparación de tratamientos para la extracción de la proteína de semilla de hule ( <i>Hevea brasiliensis</i> ).....	24
5	Comparación entre diversos tratamientos de extracción.....	25
6	Determinación del número de extracciones necesarias para producir un aislado de proteína de semilla de hule ( <i>Hevea brasiliensis</i> ).....	27
7	Efecto del pH en la solubilidad e hidratación de la proteína de semilla de hule.....	36
8	Efecto del calor en la solubilidad e hidratación de la proteína de semilla de harina de hule.....	37
9	Comparación del porcentaje de actividad emulsificante del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos.....	38
10	Comparación del porcentaje de incremento de volumen de espuma del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos.....	39
11	Comparación de la absorción de agua del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos.....	40
12	Comparación de la absorción de aceite del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos.....	41
13	Curva de Calibración con Seroalbúmina Bovina (BSA) para la determinación de los factores óptimos de extracción de la proteína de semilla de hule, mediante método de Bradford.....	50
14	Curva de calibración con albúmina de huevo para la evaluación del efecto del calor y el pH en la solubilidad e hidratación del aislado de proteína de semilla de hule, mediante método de Bradford.....	52
15	Curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) por método de Bradford, para la determinación de las concentraciones de aislado de semilla de hule a utilizar en electroforesis SDS-PAGE.....	53
16	Curva de calibración con colorante naranja 12 para la determinación de lisina reactiva en el aislado de proteína de semilla de hule.....	53
17	¿Qué pudo haber sucedido de utilizar distintas relaciones harina entre solvente? un modelo de acercamiento.....	54

## Prefacio

Este trabajo surgió de una charla entre mi asesor y yo unos 365 días atrás. Desde entonces se inició un arduo trabajo que incluyó el diseño del protocolo, recolección de información, pláticas con expertos en diversos temas relacionados, la planificación del experimento, una presentación preliminar del protocolo, largas jornadas de trabajo en el laboratorio y finalmente, la redacción del presente informe. La tesis presentada busca afanosamente ser una luz que abra diversos caminos en la investigación de la explotación de la semilla de hule, caminos iniciados en nuestra casa de estudios por personas como la Lic. Selle o el Lic. Lottman.

Esta tesis es de los últimos pasos para llegar a una de las metas de mi caminar, en el cual debo agradecer a muchísimas personas que han dado gracia a mis 22 años en la autopista de la vida... en primer lugar doy gracias a Dios, por ser mi mejor inversionista que amorosamente me deposita 86,400 segundos para que pueda ser instrumento en su obra de amor; a María, la Madre Auxiliadora por ser mi "Maestra"; a mis padres, los ingenieros cuya mejor herramienta en su fábrica fue el amor; al hombre que se me adelantó, pero que siempre estará conmigo... gracias tío Fredy por su amor y su confianza en mí; a mi tía Rosita la mujer de 1,000 en la escala de 1 a 100; a mis hermanos por su amor fraterno y en especial a Gloria Amanda y Sergio por su ayuda técnica en las presentaciones de este trabajo; a Paulo y la Rose, mis primos, que siempre han sido ejemplos para mí; a los salesianos, mis educadores, porque siempre me recibe un espíritu amoroso en sus casas; a todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo: el Dr. Bressani, mi asesor... Newton dijo: "*si he visto más allá que todo el mundo es porque me paré sobre hombros de gigantes*", gracias por ser mi gigante en esta observación; a Ingrid, Don Moisés, Don Juan, el Ing. Rossi, Kelly, la Lic. Palomo, la Lic. Colmenares, Olivia, Don Carlos, a la gente del edificio "I" que me auxilió para hacer la electroforesis, gracias por su ayuda desinteresada y su caritativa humanidad que siempre se tradujo en palabras amables, en compartir información y en oración mediante el trabajo bien hecho; al Dr. Carasganaby Devendra, por su ayuda con los comentarios guías acerca de cómo reducir los glucósidos cianogénicos de la semilla de hule; a mis amigos: el Gas Noble Martínez, el Flortío Chores, Chatío, el hombre de caminado caricaturesco (Pistol Pete), el Monstruo de la Nestlé, las Alimentógolas de AECA-UVG, los chicos PIENSA, la Muñeca Llorona, la Mujer que fue Sirena, por compartir 5 años llenos de esfuerzo, sudor, risas, tristezas y sueños que pido a Dios puedan hacer dulce realidad. Gracias muy especiales a todos mis catedráticos de la UVG, mi casa de estudios, por compartir sus enseñanzas y porque debido a su trabajo la gente podrá llamarme ahora Ingeniero.

En fin, podría llenar hojas de hojas agradeciendo a todas las personas que han marcado una diferencia en mi vida, pero se perdería el sentido de la tesis. Así que gracias a las personas de ayer, las de hoy y las que vendrán, ha sido un placer descubrir sus historias detrás de sus rostros... gracias a Ud., amable lector que critica o aplaude este trabajo pues sus críticas o aplausos dan validez a estas líneas.

*You're packing a suitcase for a place  
None of us has been  
A place that has to be believed  
To be seen*

*You could have flown away  
A singing bird  
In an open cage*

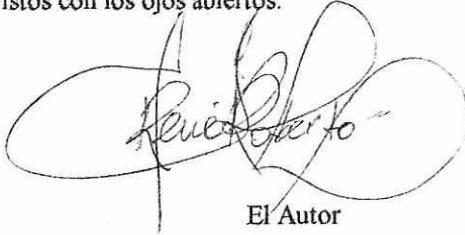
*Who will only fly  
Only fly for freedom*

*Walk on  
Walk on  
What you got  
You can't deny it*

*Can't sell it or buy it (Album ATYCLB, U2)*

En la Ciudad de Guatemala a los 7 días del mes de septiembre de 2004, en algún rincón con aires de Madrilismo y lleno de sueños vistos con los ojos abiertos.

Dixi,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Reinhold", enclosed within a large, loopy, circular flourish.

El Autor

# I. Introducción

## A. El problema y su importancia

Guatemala es un país rico en recursos naturales dado la diversidad de climas que confluyen en su geografía. Sin embargo, esta riqueza de recursos no se ha traducido en riqueza tangible puesto que los recursos siguen siendo potenciales. Además, en años recientes, las crisis alimenticias han golpeado a la población de escasos recursos y adicionalmente las tendencias económicas y comerciales del país incluyen el Tratado de Libre Comercio (TLC por sus siglas) firmado con Estados Unidos, que aún no se ha ratificado, y nuevos TLC en perspectiva con Europa, Chile y quizá Asia.

Guatemala, entonces se debe inclinar al desarrollo industrial que maximice el uso de sus factores de producción. De tal manera que este marco coyuntural en el país debiera abrir las puertas del desarrollo agroindustrial (entiéndase por agroindustria la práctica de la agricultura de manera industrial y mecanizada) total. Una agroindustria total se refiere a la actividad en el cual se busca la explotación completa de las materias primas, aprovechando incluso lo que se considera como desecho. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas fuentes alimenticias de bajo precio, que puedan utilizarse para el consumo local, en aras de ser parte de mercados externos, y de las cuales, se puedan desarrollar subproductos que brinden nuevas oportunidades de empleo y fortalezcan al país en una economía de libre comercio.

Hasta hace poco, el cultivo del hule representó un fuerte ingreso para la economía guatemalteca, sin embargo, los precios empezaron a bajar como consecuencia del aumento de la oferta del hule tras el desarrollo de este cultivo en países asiáticos (en la actualidad, la oferta de Guatemala representa menos del 1% de la oferta mundial del hule). La utilización de la semilla del hule abre una brecha de explotación económica de este cultivo ya que puede agrupar dos industrias: la producción de aceites para pinturas y la industria alimenticia. En el lado de la industria alimenticia la producción de un aislado de proteína puede constituirse en un alimento alternativo a la proteína animal. La funcionalidad que pueda determinarse del aislado proteínico también podrá permitir que pueda emplearse probablemente como un texturizado de proteína o un aditivo para otras industrias alimenticias. Durante la extracción también surgen subproductos como los almidones, los cuales podrán caracterizarse en futuros estudios, y los desechos de la semilla que tal vez puedan ser una fuente para producción de energía.

Obteniendo un aislado proteínico de la semilla de hule se estará frente a una nueva fuente de explotación del hule que tiene un valor alimenticio y seguramente un costo bajo, una vez se desarrollen los procesos y estudios necesarios para su utilización. También es necesario tomar en cuenta que en países asiáticos tales como Malasia y Camboya, el cultivo de hule es intensivo y la semilla se emplea ya como alimento para animales, de lograr obtener alimento para consumo humano Guatemala podría obtener beneficios al dar los parámetros para el perfeccionamiento de la tecnología requerida para producir el aislado en estos países.

## B. Hipótesis

Es posible desarrollar un proceso de extracción mediante el cual pueda obtenerse un aislado proteínico de la semilla de hule (*Hevea brasiliensis*) que presente buena funcionalidad y la ausencia de glucósidos cianogénicos.

## C. Objetivos

### 1. General

Desarrollar un método práctico para la obtención de un aislado proteínico de la semilla de hule (*Hevea brasiliensis*).

### 2. Específicos

Determinar las variables de extracción de la proteína para la obtención del aislado: relación harina entre solvente, temperatura, tiempo de extracción y número de extracciones.

Caracterizar funcionalmente el aislado proteínico mediante la evaluación de: efecto del pH y del calor en la solubilidad de la proteína, estabilidad y capacidad de emulsión, porcentaje de actividad emulsificante, humectabilidad de la proteína, estabilidad de espuma e incremento de volumen de espuma, absorción de agua y absorción de aceite.

Evaluar la calidad nutricional del aislado proteínico empleando: test de lisina reactiva y determinación de glucósidos cianogénicos.

Establecer el peso molecular de las proteínas en el aislado proteínico de la semilla de hule utilizando electroforesis.

## D. Materiales y métodos

1. **Preparación de la almendra.** La almendra de semilla de hule se descascara manualmente, se eliminan las almendras en estado de composición y a las almendras en buen estado se separan en sus cotiledones para someterlas a un proceso de secado en horno de bandejas (Corbett Industries Inc., modelo EC-404-6) a 60 °C por 5 horas.

2. **Análisis proximal de la almendra descascarada.** Determinación de la humedad en la almendra (AOAC 27.005, 1975).

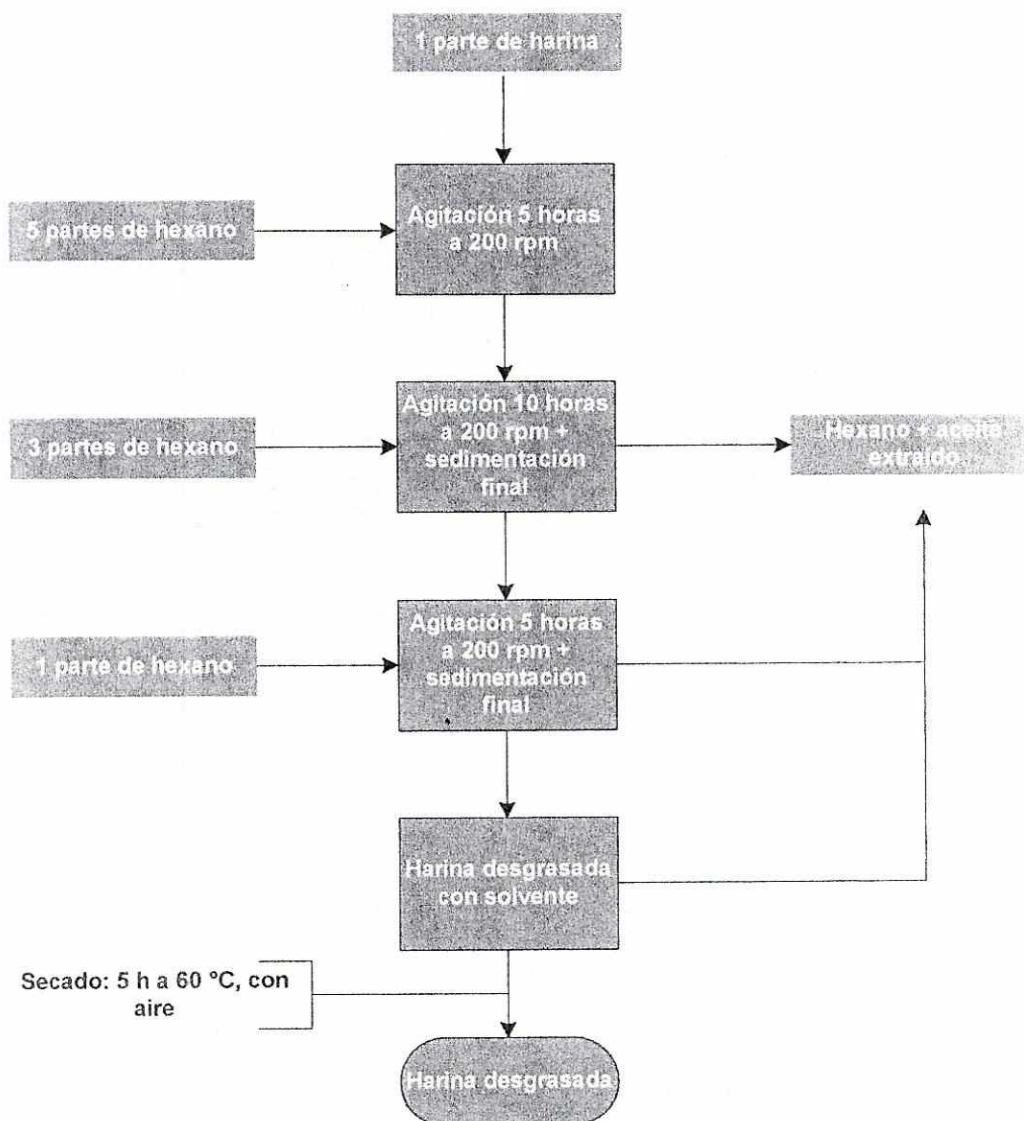
– Determinación de grasa en la almendra (AOAC 27.006, 1975).

– Determinación de proteína por método de Kjeldahl (AOAC 14.067,1975). El factor utilizado para convertir g de nitrógeno a g de proteína utilizado fue de 5.046 y no el valor usual de 6.25, pues el valor empleado es el recomendado por la AOAC para nueces del Brasil.

– Determinación de cenizas (AOAC 5.49,1975).

– Determinación de glucósidos cianogénicos (AOAC 26.151, 1975).

3. **Extracción del aceite de la semilla y obtención de la harina de semilla de hule desgrasada.** Se fragmenta manualmente la almendra de la semilla, se somete a una molienda gruesa para obtener una harina y finalmente por una extracción sólido líquido con hexano se extrae el aceite de la harina. La harina y el hexano se colocan en erlenmeyers sometidos a agitación continua en la incubadora Incubator Shaker, Series 25, New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos , de acuerdo al Diagrama No. 1.



**Diagrama No. 1. Esquema de extracción del aceite de la semilla de hule.**

El residuo obtenido de la extracción con hexano se somete a secado en horno (equipo de transferencia de calor del laboratorio de operaciones unitarias de la Universidad Del Valle de Guatemala, UVG, marca Electromotores WEG S.A., modelo A 560285) con aire a 60 °C durante cinco horas, tras las cuales se muele con licuadora y se guarda en bolsas de polietileno selladas y cubiertas con foil de aluminio.

4. Determinación de la relación harina y solvente, temperatura y tiempo óptimo de agitación para la extracción de proteína. Se trabaja según el diseño experimental presentado y en triplicado cada tratamiento.

**Tabla No. 1. Diseño experimental para el estudio de las variables de extracción de la proteína de semilla de hule**

Relación harina entre solvente (%p/v)	Proteína extraído (%)			Temperatura (°C)
	15 min	30 min	60 min	
15				25
				40
10				25
				40
5				25
				40

En primera instancia se determinó la curva de solubilidad de la proteína de la harina de semilla de hule en función del pH (entiéndase por pH la escala logarítmica entre 0 y 14 por la cual se caracteriza una sustancias como ácida o básica, siendo sustancias ácidas las que tienen el pH entre 0 y 7; mientras que las sustancias con pH arriba de 7 son básicas), para confirmar la determinación del punto isoeléctrico de esta proteína. Se empleó la metodología presentada por Samayoa (1998).

La harina se disuelve con hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 N (0.5 en la escala de normalidad) (Merck, Alemania, pureza 99% lote B 342698 327), se ajusta el pH (pH metro, ORION RESEARCH Analog pH meter/modelo 301) a 10 con ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N (EM Science, Alemania, pureza 36.5-38, lote K29648203) y se agita durante los tiempos dados a la temperatura indicada, se centrifugadora (Centrifugadora marca Garver electrifuge, modelo 208,  $836 \pm 25$  rpm) para separar el sobrenadante y éste se lleva a pH 4.0 con HCl 0.5 N. Del sobrenadante obtenido se analizó la proteína soluble remanente mediante el método de Bradford. Los resultados se graficaron para determinar el tiempo óptimo de agitación que brindaba la menor cantidad de proteína soluble remanente (más proteína precipitada).

Una vez establecido el tiempo óptimo de agitación para la extracción, se analizó el extracto de proteínas en NaOH 0.5N (obtenido tanto a 25 °C como a 40 °C) mediante el método de Kjeldahl (AOAC 14.067, 1975) para determinar qué relación de harina y solvente poseía la mejor capacidad de extracción de proteína. Las dos combinaciones de harina entre solvente y tiempos que presentaron la mayor cantidad de proteína solubilizada (en teoría mayor capacidad de precipitar proteína) se analizaron estadísticamente mediante una prueba t de Student para hallar si existía alguna diferencia aparente en la temperatura de extracción y así, encontrar la temperatura de extracción.

5. Determinación del número de extracciones. Bajo las condiciones de extracción establecidas, el residuo de la centrifugación de la harina se redisolvió en NaOH 0.5 N, esta operación se hizo por tres veces. El sobrenadante colectado en cada extracción se analizó según Kjeldahl (AOAC 14.067, 1975). Los resultados obtenidos se presentan como un Gráfico de

número de extracciones vrs. porcentaje de proteína extraída acumulada. El número escogido de extracciones se determinó haciendo un análisis costo y beneficio entre realizar una extracción más y el aumento en la cantidad de proteína acumulada.

Obtención del aislado proteínico. (confróntese Diagrama No. 1. Extracción de aceite; y Diagramas No. 2 y 3).

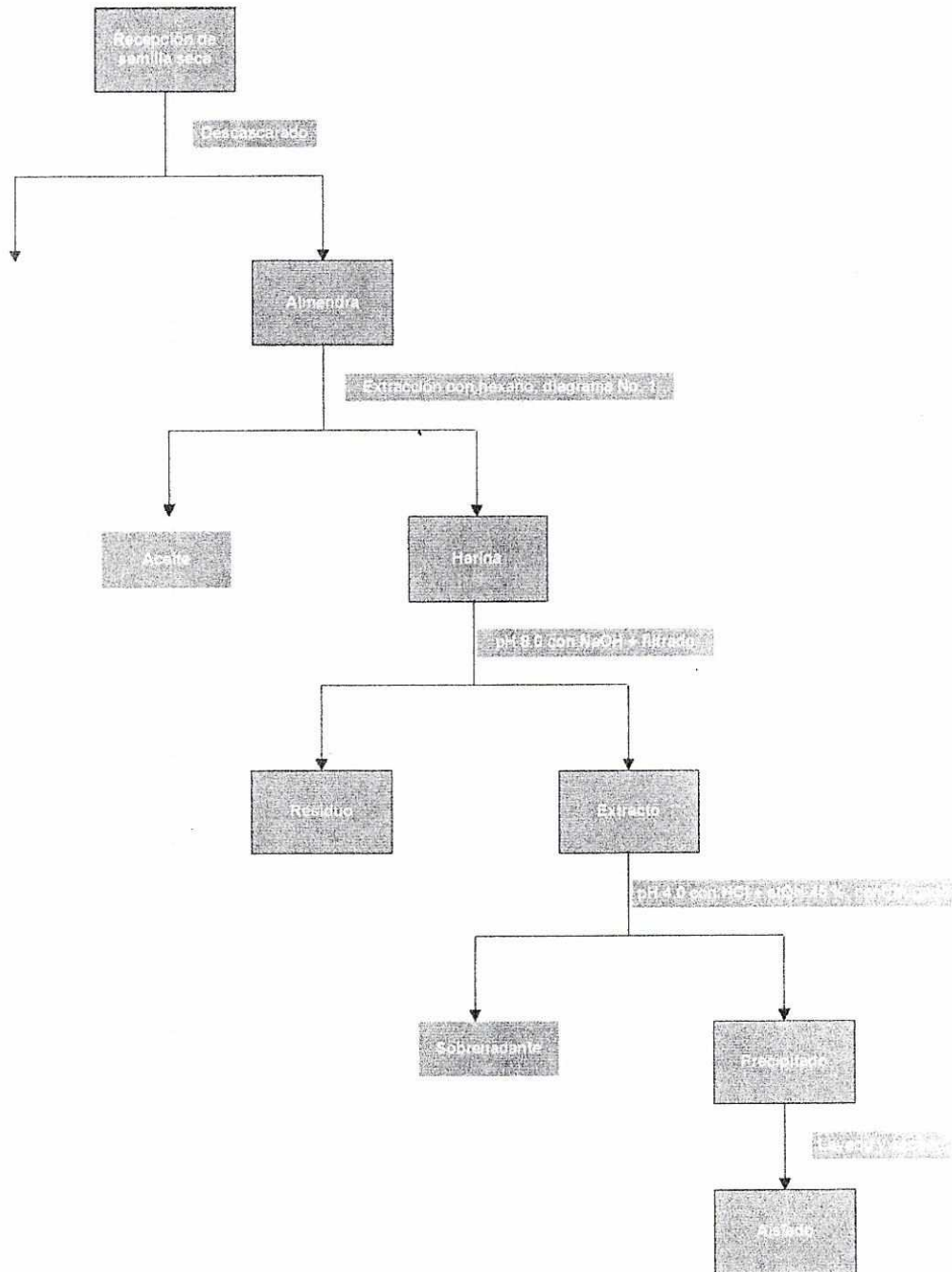


Diagrama No. 2. Operaciones generales para la preparación de un aislado de proteína de semilla de hule.

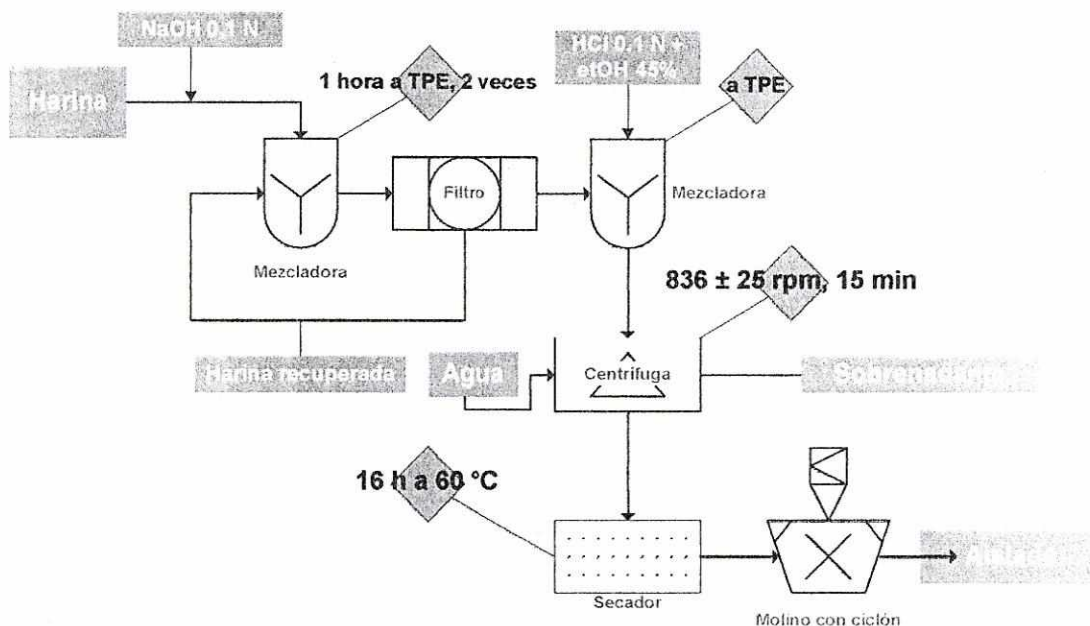


Diagrama No. 3. Esquema de extracción de la proteína de semilla de hule, a partir de la harina desgrasada<sup>1</sup>.

Se toma una porción de harina se disuelve en NaOH 0.5 N hasta llegar a una concentración del 5% de harina (porcentaje peso/volumen), se extrae durante 1 hora en el tanque de agitación (Cutler-Hamer WEG, modelo FV 22910, laboratorio de operaciones unitarias UVG), el sólido se recupera mediante un filtro con bomba de vacío (Nacional Filter Corp., modelo, C SSM-36, laboratorio de operaciones unitarias UVG) y el sobrenadante se aísla. El residuo sólido filtrado, se extrae de nuevo con NaOH 0.5 N manteniendo la concentración de sólidos en el 5%, se filtra y el sobrenadante se junta con el obtenido en la primera extracción. El pH del sobrenadante se cambia de 10.0 hasta 4.0 con HCl 0.5 N, como coadyuvante de precipitación se agrega etanol al 95% (Quim Ferkica, Guatemala, pureza 95%) hasta una concentración de 45% de etanol (% v/v), se centrifugadora y la pasta obtenida se seca con aire a 45 °C durante 15 horas. Las escamas de proteína se muelen en un molino con ciclón (marca Udy Corp., Cyclon sample mill, modelo 3010-D30, Instituto de Investigaciones en Ciencias de Alimentos UVG), se empaquetan en bolsas de polietileno, se sellan y se recubren con foil de aluminio.

$$r = \frac{\text{masa de CHON extraídas}}{\text{masa de CHON a extraer}}$$

Ecuación No. 1. Rendimiento de la extracción de proteínas.

<sup>1</sup> A TPE, se refiere a temperatura y presión estándar: 25 °C y 1 atm. Se utiliza como indicador de que la operación se ejecuta a temperatura ambiente y a la presión atmosférica, la cual en la Ciudad de Guatemala, es menor a 1 atm por el efecto de la altura sobre el nivel del mar (1500 m SNM, aprox.) de dicha ciudad.

6. **Análisis del aislado proteínico.** Determinación de la humedad (AOAC 27.005, 1975).

- Grasa residual según (AOAC 27.006, 1975).
- Determinación de proteína por método de Kjeldahl (AOAC 14.067, 1975).
- Determinación de cenizas (AOAC 5.49, 1975).

7. **Propiedades funcionales.** Según Food Laboratory Manual del Department of Food Science and Human Nutrition de la Iowa State University. Se evaluaron las siguientes propiedades (para las dos primeras en lugar de hacer las mediciones de proteína se utilizó el método de Bradford) Solubilidad e hidratación en función del pH, solubilidad e hidratación: efecto del calor, estabilidad de emulsión, capacidad de emulsión, humectabilidad, incremento de volumen de espuma, estabilidad de espuma, muestras en duplicado. Para determinar el incremento de volumen de espuma se empleó la Ecuación No. 2.

$$\text{Incremento de volumen(\%)} = \frac{\text{volumen post-batido} - \text{volumen pre-batido}}{\text{volumen pre-batido}} * 100$$

**Ecuación No. 2. Incremento de volumen de espuma**

Para evaluar la estabilidad de emulsión, capacidad de emulsión e incremento de volumen de espuma, se utilizó para la preparación de la emulsión o espuma una batidora manual (Black & Decker, Catálogo No. M-275, de 5 velocidades, trabajando a máxima velocidad). A continuación se detalla la metodología seguida para la determinación de la funcionalidad de las proteínas:

**a. Materiales**

- Proteína a analizar
- Coomasie blue
- Estándar de proteína Seroalbúmina bovina o BSA (por sus siglas en inglés, Bovinum Sero Albumin) (10 mg/mL)
- Bicloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- Aceite de girasol + soya (información nutricional: 126 kcal/14 g, ácidos grasos saturados 1.7 g/14g, ácidos grasos poliinsaturados 9.4 g/14 g, ácidos grasos monoinsaturados 2.9 g/14 g, vitamina "E" 8.4 mg.
- Tubos de centrifugadora
- Batidora (Black & Decker, catálogo No. M-275)

- Mezclador
- Baño de agua

#### b. Procedimiento

- A doce tubos añadir en duplicado: 0.0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 o 1 mL del estándar de BSA. Añadir agua a cada tubo hasta un volumen de 1 mL.
- Añadir 4 mL de Coomassie, método de Bradford.
- Hacer la curva: Absorbancia vrs. mg de CHON

##### i) Solubilidad e hidratación –Efecto del pH

- Disolver 1.0 g de proteína (CHON) en unos 80 mL de agua. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH o HCl (0.1 N) y llevar a un volumen final de 100 mL (Soln. CHON 1%).
- Tarar cinco tubos de centrifugadora. Transferir 10 mL de la solución de CHON en el primer tubo de centrifugadora. Ajustar el pH de la solución remanente de CHON a 6.5 y transferir 10 mL al siguiente tubo de centrifugadora. Continuar así hasta tener tubos a pH 6.0, 5.5 y 5.0. Anotar el volumen de HCl añadido a cada tubo. Mezclar fuertemente y dejar reposar cinco minutos. Agitar los tubos para re-mezclar por cinco minutos.
- Centrifugar los tubos a velocidad máxima por cinco minutos. Medir el volumen de sobrenadante y precipitado. El volumen de precipitado es una medida del agua ligada a la proteína, la cantidad de proteína en el sobrenadante es una medida de la solubilidad de la proteína.
- Medir la concentración de CHON con en el sobrenadante con el método de Bradford.
- Decantar el remanente de sobrenadante y pesar los tubos de centrifugadora para determinar la masa del precipitado de proteína.
- Resultados: en una gráfica concentración de CHON (en mg) vrs. pH, masa de precipitado (en g) vrs. pH.
- Tomar decisión de a qué pH se hacen los siguientes ensayos.

##### ii) Solubilidad e hidratación, Efecto de Calor

- Preparar 100 mL de solución de CHON al 1% en el pH deseado.
- Tarar seis tubos de centrifugadora y colocar 10 mL de solución de CHON en cada tubo.
- Poner los tubos en baños a temperatura de 65, 80 y 95 °C. Dejar un tubo por diez minutos a T° ambiente. Observar la apariencia de cada tubo.
- Centrifugar los tubos cinco minutos a velocidad máxima. Medir volumen de sobrenadante y precipitado. El volumen de precipitado es una medida del agua ligada a la proteína y la cantidad de proteína en el sobrenadante es una medida de la solubilidad de la proteína.

- Medir la proteína en el sobrenadante con Bradford.
- Determinar la masa de la proteína hidratada, removiendo el sobrenadante y pesando los tubos de centrifugadora.
- Gráficar: concentración de CHON (en mg) vrs. temperatura y masa de precipitado (g) vrs. temperatura.

#### iii) Estabilidad de emulsión

- Tomar 25 mL de solución de CHON 1% al pH requerido y colocarlo en una batidora.
- Añadir 75 mL de aceite de soya. Batir a máxima velocidad por 3 minutos.
- Transferir una porción de la emulsión a un beaker (3/4 lleno). Guardar la emulsión en frío y observar la estabilidad.

#### iv) Capacidad de emulsión

- Preparar una segunda emulsión con 50 mL de la solución de CHON y 25 mL del aceite. Batir por dos minutos a máxima velocidad.
- Con la batidora funcionando añadir aceite hasta romper la emulsión. El volumen total de aceite por gramo de proteína es la capacidad de emulsión.

#### v) Humectabilidad

- Tomar 1 g de la proteína. Echar la proteína en un beaker de 100 mL con 80 mL de agua al pH escogido.
- Medir el tiempo que toma la proteína en absorber agua o humectarse. Este tiempo se llama la humectabilidad.

#### vi) Expansión y estabilidad de espuma

- Tomar 100 mL de la solución de proteína al 1% al pH escogido y batir por cinco minutos a máxima velocidad.
- Transferir la espuma a una probeta y medir inmediatamente el volumen de líquido y de espuma luego de batido (cero minutos). Dejar la espuma en la probeta y tomar el volumen de espuma a quince, treinta, cuarenta y cinco y sesenta minutos.
- Calcular la estabilidad y expansión de espuma.
- Gráfica: volumen de espuma vrs. tiempo y volumen de líquido vrs tiempo.

#### vii) Capacidad para formar gel (gelificación)

- Preparar solución a 15% de CHON a pH escogido.

- Tomar 50 mL de la solución en un beaker de 100 mL. Cubrir el beaker con aluminio y colocar en un baño a 80 °C por diez minutos, enfriar.
- Tomar una segunda porción de 50 mL de la solución en un beaker y añadir 45 mg de CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O. Colocar en un baño a 80 °C por 10 minutos y enfriar.
- Comparar ambos geles según características:
  - Adhesividad: propiedad de adherirse a otros materiales.
  - Cohesividad: propiedad de pegarse entre sí mismo.
  - Elasticidad: propiedad de la masa de tomar su forma natural luego de una presión blanda.
  - Gel suave o de baja cohesividad: superficie granular o lisa.
  - Dureza: resistencia a la compresión. Un buen gel tiene cierto grado de dureza, cohesividad, elasticidad y superficie lisa. Malos geles son blandos y poco duros. Los geles con alta dureza y baja cohesividad también se consideran malos.

8. Absorción de agua y aceite. Se realizó utilizando el método de Okezie y Bello, utilizando centrifugadora (Centrifugadora marca Garver electrifuge, modelo 208, 836 ± 25 rpm) por quince minutos, muestras en duplicado.

9. Actividad emulsificante. Según método de Yasumatsu, utilizando centrifugadora (Centrifugadora marca Garver electrifuge, modelo 208, 836 ± 25 rpm), durante 15 minutos y en lugar de tubos de centrifugadora de 12 mL, se emplearon tubos de 50 mL y las muestras se analizaron en duplicado. La actividad emulsificante se determinó según Ecuación No. 3:

$$\text{Actividad emulsificante (\%AI)} = \frac{\text{volumen capa emulsificada}}{\text{volumen total}} * 100$$

Ecuación No. 3. Actividad emulsificante

10. Evaluación nutricional del aislado. Test de lisina reactiva (De acuerdo a R. Hurrell et al., 1979)

- Determinación de glucósidos cianogénicos (AOAC 26.151, 1975).
- Determinación del peso molecular del aislado de proteína. Electroforésis con Gel de Poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio o SDS-PAGE (por sus siglas en inglés, Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel), según protocolo de Laemmli. Se empleó un gel de separación con acrilamida al 10%, preparado según:

4.1 mL de agua doble destilada

3.3 mL de acrilamida/bis acrilamida al 30%

2.5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.8

90  $\mu$ L de APS 10%

10  $\mu$ L de Temed

El gel de concentración utilizado se preparó según:

2.95 mL de agua doble destilada

0.75 mL de acrilamida/bis acrilamida al 30%

2.5 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

90  $\mu$ L de APS 10%

10  $\mu$ L de Temed

Para determinar la cantidad de muestra a utilizar en la electroforesis se hizo una curva de calibración de la proteína con albúmina bovina (Gráfico No. 15) y se midió según método de Bradford a 595 nm. Se emplearon las siguientes cantidades de reactivos:

800  $\mu$ L de agua doble destilada

200  $\mu$ L de Biorad Protein Assay

10  $\mu$ L de muestra o estándar.

Dado el análisis con el método de Bradford se estableció preparar una solución de muestra de 5 mg aislado/500  $\mu$ L de PBS (fosfato bufferado salino, pH 7.4 a 25 °C, SIGMA, lote 033K8201). De dicha solución se tomaron 100  $\mu$ L y se diluyeron en 100  $\mu$ L de buffer de Laemmli SB2X, finalmente, de esta solución se tomaron 10, 20 y 30  $\mu$ L de muestra los cuales se colocaron en la placa de electroforesis. Se colocaron 2, 5 y 10  $\mu$ L de los estándares de seroalbúmina bovina (BSA) en la placa de electroforesis, a modo de que en los pozos correspondientes hubieran 0.5, 1.25 y 2.5  $\mu$ g de BSA. Antes de colocar la muestra en los pozos correspondientes, la misma se calentó por 3 min a 100 °C y se centrifugó brevemente.

Se empleó el marcador de masa molecular de BIORAD estándar para electroforesis se rango amplio con las siguientes unidades proteínicas: aprotinina, lisozima, inhibidor de tripsina de soya, anhidrasa carbónica, ovalbúmina, BSA,  $\beta$ -galactosidasa y miosina, con masas moleculares de 7.10, 20.7, 29.9, 36.2, 52.5, 81, 118 y 207 kD, respectivamente.

La electroforesis se corrió con un buffer de migración de 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS durante 1 hora a 100 V.

## II. Marco Teórico

El árbol de hule (*Hevea brasiliensis*), pertenece al orden de las Euphorbiaceae. Este tipo de hule se conoce como hule del Pará y es cultivado en Guatemala desde 1940 para la obtención de látex, materia prima en la producción del caucho. De acuerdo a los datos del 2003 de la Gremial de Huleros de Guatemala hacia finales del año 2002 existían en Guatemala 23,920 hectáreas sembradas con árboles de hule en producción, esta extensión corresponde a 8,784,094 árboles de hule produciendo.

Se estima que un árbol de hule produce entre 650 a 850 frutos por temporada durante una vida de 30 años, cada fruto contiene 3 semillas (Fetuga et al. 1977). Esto se traduce en un potencial de producción de hasta 2550 semillas por árbol. Si este potencial se proyecta con los árboles en producción actualmente en Guatemala, generaría 22,399,439,700 de semillas. De acuerdo a Lottman (1981) cada semilla pesa en promedio unos 5 g, de los cuales alrededor del 50% están constituidos por la cáscara que representa desecho; por lo tanto, virtualmente pueden aprovecharse en Guatemala hasta 56,000 toneladas métricas de semilla para preparar algún tipo de alimento para consumo humano. En Guatemala, la semilla de hule se recoge manualmente pagando jornales por quintal; se utiliza como comida para ganado vacuno y algunos clones como el IA873, MDF, GT1, GB17 se emplean como almácigos para siembra (Gremial de Huleros de Guatemala 2003).

El hule es un cultivo importante en regiones del planeta tales como Malasia y Brasil. Dada su importancia se han realizado varios estudios en estas regiones con el fin de estudiar parte del árbol de hule que pueden ser explotables, buscando la posibilidad de descubrir nuevas fuentes que hagan del cultivo del hule una agroindustria integral. En virtud de dichos estudios, se encontró como fuente potencial de alimento la semilla del hule dado su contenido de proteínas (Sovanno et al., 2002) (Samayoa, 1998) (Bressani et al., 1983) (Selle, 1982) (Lottman, 1981) (Giok et al., 1967).

Los estudios realizados sobre la semilla de hule han encontrado como factor tóxico la presencia de linamarina, un glucósido cianogénico que libera cianuro e inhibe la cadena respiratoria. Sin embargo, dado el procesamiento requerido para obtener algún subproducto alimenticio de la almendra la linamarina se destruye. Según Devendra (2003), basta con decorticar la semilla, cortarlas en pequeños trozos y poner a secar al sol los trozos de semilla para lograr niveles seguros del glucósido en la semilla, de tal manera que el producto producido de la semilla sea seguro para consumo humano.

La semilla cruda sin tratar de la semilla de hule presenta un índice de eficiencia proteínica o PER (por sus siglas en inglés: protein efficiency ratio), de 0.66 comparado con la PER de un patrón de caseína 2.54, la proteína de la semilla de hule apenas cubre un 26% de la que cubre la caseína (Bressani et al. 1983). No obstante al someter la semilla a procesamiento, las proteínas se desdobl原因 y en algunos casos llegan a

desnaturalizarse. Este hecho ocasiona una mayor disponibilidad proteínica y por lo tanto un aumento en la PER (Baduí, 1999) (Damodaran, 1996) (Pomeranz, 1991).

Lottman (1981) logró determinar que el aceite de la semilla de hule es un aceite secante, útil para la producción de pinturas. El aceite se obtiene por extracción con solventes: hexano, éter de petróleo o isopropanol. El solvente más ventajoso en la reducción de los glucósidos cianogenéticos es el isopropanol, dejando un contenido de 89 µg de linamarina/g de muestra en la torta residual de la extracción del aceite; no obstante, presenta el problema que también arrastra componentes acuosos. El éter de petróleo es menos efectivo que el n-hexano en la reducción de linamarina (196 µg de linamarina/g de muestra contra 128 µg de linamarina/g de muestra con la extracción del n-hexano) (Lottman, 1981). Según los resultados del estudio de aceite, se considera que la mejor alternativa para el procesado integrado de la semilla de hule es la extracción del aceite con n-hexano, extrayéndose un 36% de aceite, según Lottman (1981).

La torta residual de la extracción del aceite se hace una harina. Los estudios de Bressani et al. (1983), hallaron que la proteína de la harina es deficiente en el contenido de lisina, aminoácidos azufrados y triptófano. Este análisis de aminoácidos difiere entre distintos autores (Giok et al., 1967) (Bressani et al., 1983), sin embargo, como lo explica Selle (1981) las diferencias entre autores pueden deberse a factores naturales en la composición de las muestras analizadas.

Samayoa (1998) caracterizó la proteína de la harina de semilla de hule fraccionándola según solubilidad. Las proteínas de acuerdo a la solubilidad pueden clasificarse en: albúminas, globulinas, histonas, glutelinas, prolaminas y escleroproteínas. Las albúminas son solubles en agua y soluciones salinas diluidas; las globulinas son solubles en soluciones salinas diluidas; las histonas son ricas en aminoácidos básicos, son solubles en agua, pero tienen poca importancia a nivel tecnológico; las glutelinas que son solubles en pH ácidos o básicos (2 y 12, respectivamente); las prolaminas solubles en etanol entre 50-80%; por último, las escleroproteínas son proteínas prácticamente insolubles (Baduí, 1999). Siendo las albúminas las de mejor valor biológico por su solubilidad en agua.

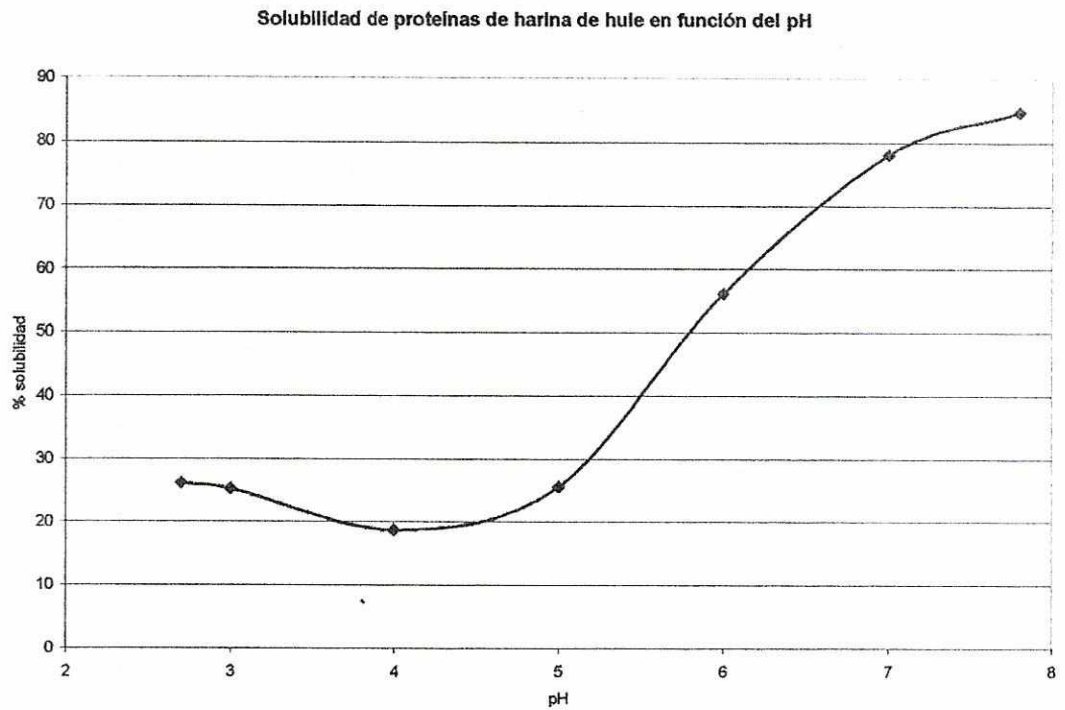
**Tabla No. 2. Contenido de proteínas de la semilla de hule según su solubilidad**

<b>Fración proteínica</b>	<b>% (p/v)</b>	<b>Solubles en</b>
Albúminas	31.8	Agua
Globulinas	16.0	Soluciones de NaCl
Glutelinas	41.6	Soluciones de NaOH
Prolaminas	2.20	Etanol al 70%
Residuales	8.40	Insolubles.

Fuente: Samayoa, 1998.

El contenido de proteína en la harina de hule desgrasada es de un 20.75 %, la proteína presenta una curva de solubilidad en función del pH similar a la de la soya, con un pH isoelectrico (pI) de 4.0 en el cual sólo un 18.72% del total de proteína está solubilizada (Samayoa 1998).

**Gráfico No. 1. "Solubilidad de proteínas de la semilla de hule según su pH"**



Fuente: Samayoa, 1998.

Las proteínas de las harinas son importantes para la tecnología de alimentos por las características especiales que brindan a las matrices alimenticias en donde estén presentes. Estas características son las propiedades funcionales; de acuerdo a Pomeranz (1991) las propiedades funcionales denotan características que gobiernan el comportamiento de las proteínas durante el procesamiento, almacenamiento y preparación de alimentos que las contengan, afectando directamente la calidad de los alimentos y su aceptación. De acuerdo a Hermansson (1979), las propiedades funcionales son producto de un mosaico de diferentes factores que pueden representarse gráficamente mediante un Diagrama de Venn.

Figura No. 1. Factores que influyen las propiedades funcionales de proteínas en alimentos

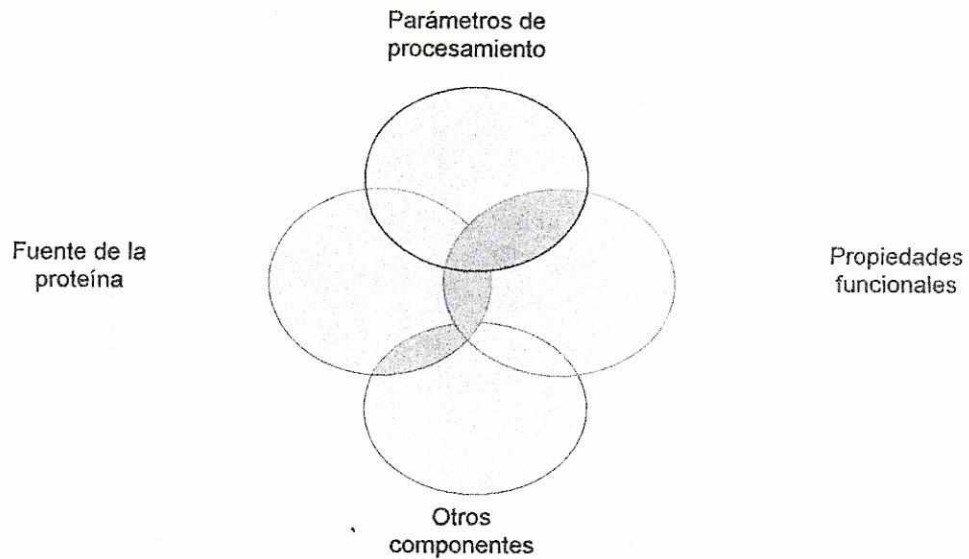


Tabla No. 3. Reseña de las propiedades funcionales de las proteínas alimenticias

<b>Función</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Alimento</b>	<b>Tipo de proteína</b>
<b>Solubilidad</b>	Hidrofilia	Bebidas	Proteínas del suero lácteo
<b>Viscosidad</b>	Fijación de agua	Sopas, caldos, aderezos, postres	Gelatina
<b>Fijación de agua</b>	Puentes de hidrógeno, hidratación iónica	Salchichas, bizcochos y pan	Proteínas del músculo y del huevo
<b>Gelificación</b>	Inmovilización de agua	Carnes, geles, bizcochos y queso	Proteínas musculares, proteínas del huevo y lácteas
<b>Cohesión-adhesión</b>	Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno	Carnes, salchichas, pastas, productos horneados	Proteínas musculares y del suero lácteo
<b>Elasticidad</b>	Interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro	Carnes, productos horneados	Proteína musculares y de cereales
<b>Emulsión</b>	Adsorción y formación de película en la interfase	Salchichas, sopas, bizcochos, aderezos	Proteínas del músculo, la leche y huevos
<b>Formación de espuma</b>	Adsorción en la interfase y formación de película	Batidos ornamentales, helados, bizcochos y postres	Proteínas lácteas y del huevo
<b>Fijación de grasa y sabores</b>	Interacciones hidrofóbicas	Productos horneados pobres en grasa, buñuelos	Proteínas lácteas, del huevo y de los cereales

Fuente: Damodaran, 1996.

Las proteínas poseen un valor nutricional es función de su contenido de aminoácidos esenciales y su digestibilidad. La digestibilidad de una proteína se ve afectada por presencia de factores antinutricionales, tratamientos térmicos que desencadenan modificaciones en los aminoácidos y cambios en la composición de la proteína producidos durante su extracción y fraccionamiento (Damodaran, 1996). No obstante, con la

combinación adecuada de variables de procesamiento es posible la extracción de proteínas que mantengan una buena funcionalidad y un buen valor nutricional. La extracción de proteínas se hace principalmente con varios fines:

- La mejora del valor nutricional mediante la eliminación de sustancias tóxicas o poco digeribles.
- Mejora de características organolépticas separando sabores y olores indeseables.
- Obtención de nuevas fuentes de alimento alternas a la proteína animal.
- Valorización de subproductos que maximicen la rentabilidad de una industria, a través de un manejo global (Linden y Lorient 1994).

La aptitud de una proteína para ser extraída depende de factores tales como: la heterogeneidad de la materia prima, es decir, el contenido de diversas proteínas y de estructuras polisacáridas, pigmentos, etc.; su desnaturalización, provocada por pH, temperatura o fuerza iónica; tamaño y forma de las moléculas, en especial cuando se emplean tecnologías de filtración para la purificación; finalmente, la polaridad y el poder de fijación sobre lugares cargados de polímeros sólidos, factores importantes cuando la purificación también requiere de un fraccionamiento proteínico (Linden y Lorient, 1994).

Los métodos de extracción proteínica son diversos y en general adaptables a diferentes materias primas (Ohren, 1981; Rivas et al., 1981; Rao et al., 2002). Los extractos proteínicos se clasifican en función del contenido de proteína en el producto final, de tal manera que se puede tener: harinas con <70% de proteína, concentrados con 70 a 85% de proteína y aislados con > 85% de proteína. Los aislados provienen de un proceso específico, el cual consiste en poner en solución la proteína y luego extraerla, bien sea por precipitación, lixiviación, filtración o fijación en soporte activo y una elución posterior. Una vez obtenido el extracto este se purifica por un método como la centrifugación y se seca para obtener finalmente el aislado. Cuando la materia prima proteínica es una semilla oleaginosa se extrae primero el aceite bien sea mediante el uso de solvente o por un proceso de prensado (Linden y Lorient, 1994; Hoare et al., 1983). Los métodos de aislamiento proteínico presentan una gran selectividad y son poco desnaturalizantes, de acuerdo a Linden y Lorient (1994) pueden evaluarse mediante los siguientes parámetros:

- El rendimiento definido por la Ecuación No. 1:

$$r = \frac{\text{masa de CHON extraídas}}{\text{masa de CHON a extraer}}$$

Ecuación No. 1. Rendimiento de la extracción de proteínas.

- La selectividad del proceso, parámetro que no se estudia en la industria alimenticia.
- El coste de la extracción: velocidad de extracción (masa de CHON/unidad de tiempo) y concentración del producto.

### III. Resultados y Discusión

Algunos años atrás, el descubrimiento científico más importante fue la clonación de la oveja Dolly. Recientemente, científicos brasileños anunciaron haber descubierto el genoma del café. Los horizontes de la ciencia crecen a un ritmo vertiginoso en el que las acciones de investigación se van transformando en reacciones y en el cual se vive en un constante llamado a ser partícipes de dichos movimientos. Además, estos movimientos avistan una economía globalizada en la que el poder sea de quienes pueden desarrollar cosas nuevas. En aras de este desarrollo, Guatemala debería trabajar en la explotación de recursos naturales que hoy en día son desaprovechados; por ello la producción de cosas útiles a partir de los recursos naturales mal utilizados o que han dejado de ser una fuente económica fuerte tal y como se explotan actualmente, se convierte en una alternativa viable para el desarrollo del país.

Las estadísticas de la Gremial de Huleros de Guatemala muestran que para el año 2001 existían 546 fincas en Guatemala con una extensión sembrada con hule de 54,222 ha, en las cuales se hallaban 8,075,556 árboles de hule produciendo y 652,872 árboles en proceso de desarrollo. Para el año 2002 las mismas 546 fincas contaban con una extensión sembrada de 60,782 ha, de continuar con esta tendencia de crecimiento podría estimarse que para 2004 estarían produciendo aproximadamente unos 9,000,000 de árboles de hule, si cada árbol tiene una producción de unas 2,550 semilla por temporada se estaría pudiendo aprovechar 22,950,000,000 de semillas, que tal como se expone en los resultados de Lottman 1981 (una semilla pesa aproximadamente 5 g, de los cuales 2.5 g son de almendra aprovechable) generarían 57,375 toneladas métricas de semilla para explotar y producir el aislado proteínico. Así, considerando lograr un proceso con un 90% de rendimiento en la extracción de proteína, es decir, extrayendo un 23.70 % del 26.33% de proteína total en la harina desgrasada de semilla de hule, en teoría, se extraerían alrededor de unas 13,600 toneladas métricas de aislado de proteína de hule.

Si a estos datos de estadística agronómica se añaden los de estadística económica, en los cuales la Gremial de Huleros de Guatemala informa que las ventas locales y exportaciones del hule como sólido y látex entre los años 2001-2002 sufrieron un retroceso marcado, puesto que únicamente aumentaron las exportaciones a Colombia, Chile y Venezuela (aunque el máximo aumento apenas fue un 5.42% en las exportaciones a Colombia), mientras que tanto las ventas locales, como las externas (México, Costa Rica, El Salvador, Inglaterra y la República Dominicana) bajaron incluso hasta un 55%. Agrupando los informes de venta de hule sólido y látex entre 1981 a 2001 han tenido un decrecimiento paulatino desde 1998, tendencia marcada y continua, a la cual se le añade el hecho que la única manera de cotizar el hule para su venta mundial es la bolsa de hule de Singapur en la que el precio del hule según el tipo clonal y el mes osciló entre un mínimo de 0.11517 \$/lb y un máximo de 0.32528 \$/lb.

Por lo tanto, los factores económicos y agrícolas presentados aunque son meras estimaciones, motivan la búsqueda de nuevas fuentes de explotación del hule y por ende el presente trabajo es un afán de exploración con vistas al hallazgo de nuevas formas de explotación del hule.

## A. Composición de la semilla de hule

Estudios anteriores respecto a la semilla de hule han iniciado con el análisis de la materia prima en su estado natural, sin embargo, el presente estudio parte desde el análisis de la materia prima previo secado al sol. El contenido de grasa o extracto etéreo encontrado (refiérase Tabla No. 4) encaja perfectamente con lo reportado por Giok et al. 1967, aunque difiere de los datos de Selle et al. 1983; en el caso de la proteína, el primer estudio citado reporta un contenido mayor de proteína en la almendra de semilla de hule, mientras que, el del segundo, informa un valor equiparable al hallado en el presente estudio. Estas diferencias, al igual que las observados en el contenido de carbohidratos, humedad y cenizas se deben en gran medida, por no decir que totalmente, a la diferencia en la fuente de obtención de las semillas puesto que al ser de diferente fuente, seguramente también son de distinta variedad (distintos clones). Para fines comparativos, el dato más importante de resaltar es el contenido de glucósidos cianogénéticos (como mg HCN/g muestra), el hecho de utilizar semillas secadas al sol disminuye aproximadamente el contenido de dicho factor tóxico unas 10 veces respecto al de semilla cruda estudiado anteriormente (Giok et al., 1967 y Selle et al., 1983).

Económicamente hablando, la disminución de los glucósidos cianogénéticos mediante un proceso gratuito, la luz solar, abre la posibilidad a que la explotación de los materiales de la semilla de hule sea interesante en términos productivos.

Tabla No. 4. Composición proximal de la semilla de hule (*Hevea brasiliensis*)

	Presente estudio	Giok et al. 1967 <sup>b</sup>	Selle et al. 1983
Grasa (%)	32.35 ± 2.22	32.3	48.0 ± 0.5
Proteína (%)	14.84 ± 0.16	27.0	18.5 ± 1.0
Carbohidratos (%)	42.98 ± 2.23	34.7	ND
Humedad (%)	6.08 ± 0.07	3.6	33
Cenizas (%)	3.72 ± 0.24	2.4	3.4 ± 0.1
Glucósidos cianogénéticos (mg HCN/100g) <sup>a</sup>	34.4 ± 0.313	330	315.2

a: Base húmeda, expresados en función.

b: Giok et al. 1967. ND: No hay datos disponibles.

Finalmente, en la Tabla No. 4, la diferencia primordial se observa en el contenido de carbohidratos. La cantidad de carbohidratos reportada en el presente estudio, se determinó por diferencia, luego del análisis proximal, sin embargo, en dicho análisis no se incluyó el contenido de fibra cruda, razón por la cual el valor de  $42.98 \pm 2.23$  % de carbohidratos, no representa un valor real. No obstante, la presencia de carbohidratos en la semilla de hule es un indicador de que probablemente sea posible el aislamiento de almidones que tengan un valor importante para la tecnología de alimentos, cuya extracción podría integrarse eventualmente en la separación del aceite y las proteínas de la semilla de hule.

## B. Extracción del aceite de la semilla de hule

Lottman en 1981 fue el pionero en la investigación y caracterización del aceite de la semilla de hule. Su estudio evaluó tres métodos de extracción del aceite y concluyó que dicho aceite podría tener una relevancia en la producción de pinturas debido a las propiedades secantes. En los métodos empleados por Lottman se incluía el uso de una prensa hidráulica utilizando calor y extracción tipo Soxhlet con solventes.

Dado que el presente estudio es precursor en la caracterización de la proteína de semilla de hule se decidió diseñar un proceso que no incluyera calor para la extracción del aceite, razón por la cual se descartaron los métodos de Lottman, aunque dichos estudios sí sirvieron para determinar el solvente de extracción: hexano; pudo haberse utilizado iso-propanol o éter de petróleo como solventes de extracción, pero el primero de acuerdo a la caracterización del aceite de Lottman presentaba el problema de la extracción de componentes hidrosolubles, mientras que el segundo no es un solvente común de uso industrial debido a su alta inflamabilidad.

En vista de los antecedentes se optó por hacer la extracción mediante una lixiviación. Esta como operación de transferencia de masa de tipo contacto, según McCabe, Smith y Harriot 1999, se ve limitada por la difusividad de las moléculas del aceite en el hexano. En un equipo de contacto continuo la Ecuación general de transferencia de masa puede describirse mediante la expresión:

$$F = \frac{\Delta * A_{cl} * \theta_{res}}{R * D}$$

**Ecuación No. 4. Expresión de la cantidad de masa transferida: "F", Ecuación general de transferencia de masa.**

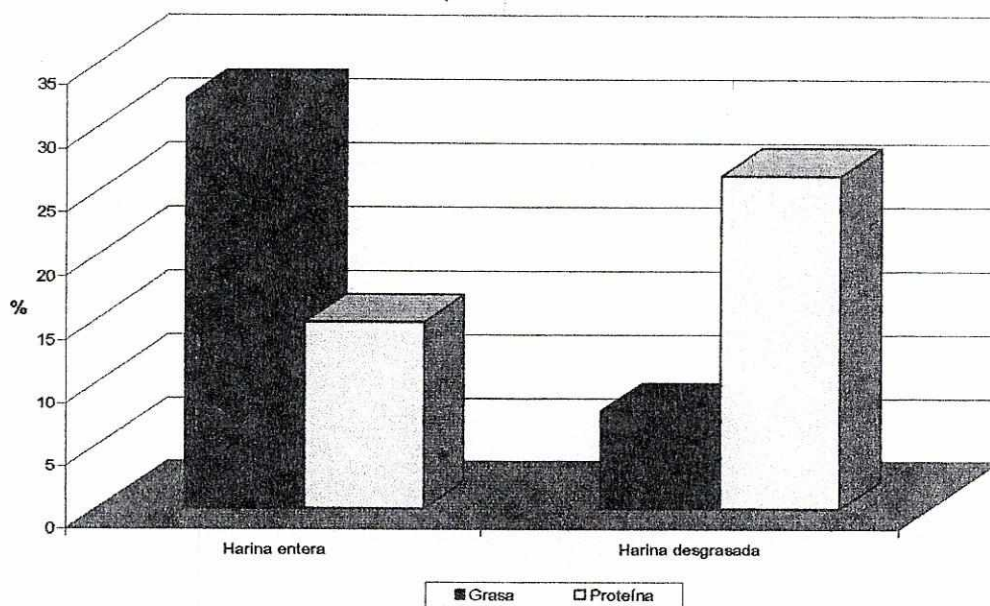
**$\Delta$  = gradiente, bien sea de concentración, eléctrico, presión u otro tipo;  $A_{cl}$  = área de contacto interfacial,  $\theta_{res}$  = tiempo de residencia en el área de contacto interfacial;  $R$  = resistencia y  $D$  = difusividad molecular.**

El proceso de extracción del aceite se diseñó manipulando las variables de la Ecuación No. 4 que fueran posibles de modificar, en primera instancia, se hizo una harina de semilla de hule seca, esto con dos fines fundamentales: aumentar la difusividad de las moléculas de aceite en el solvente puesto que con una

menor cantidad de agua existirían menos moléculas de agua que interfiriesen con la difusión de las moléculas de aceite chocando con las mismas; el otro fin era crear la mayor área posible para la transferencia de masa. Los largos tiempos de extracción se pusieron así para aumentar el tiempo de residencia; la manipulación de las cantidades de solvente y harina, junto a la agitación, tenían como fin crear gradientes de velocidad y concentración para aumentar la transferencia de masa; de tal forma que se siguió el proceso mostrado en el Diagrama No. 1.

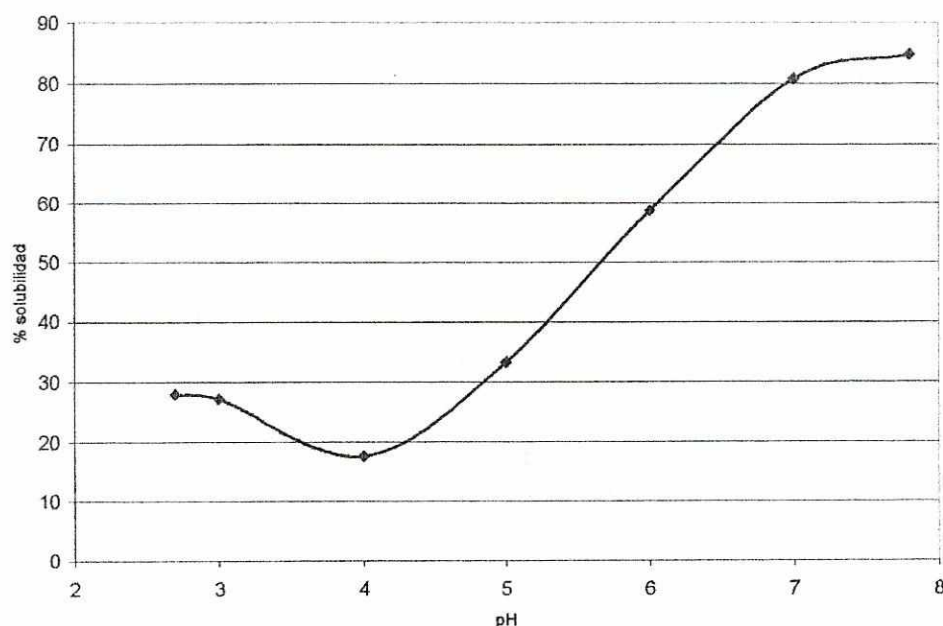
En el Gráfico No. 2, se observa como se modificó el contenido de proteína y extracto etéreo (grasa) en la harina de semilla de hule luego del proceso de extracción, el contenido de grasa bajó de un 32.35% a un 7.82%, mientras que la proteína se concentró de un 14.84% a un 26.33 %.

**Gráfico No. 2. Variación del contenido de proteína y grasa en la harina de semilla de hule entera y la harina desgrasada**



El rendimiento de extracción de aceite bien podría medirse utilizando un análogo de la Ecuación No. 1 y sustituyendo los valores de proteína por los de grasa. De esta manera se tiene un rendimiento de extracción de grasa de un 75.83%, este porcentaje se podría mejorar haciendo un proceso combinado de prensa hidráulica utilizando calor (a una temperatura que garantice que la proteína no se dañe, tema discutido más adelante en esta sección) y completando el proceso con una lixiviación. Además, dado la crisis energética mundial, podría evaluarse la posibilidad de la utilización de este aceite como fuente de ácidos grasos para la producción de ésteres de etilo utilizados actualmente como biocombustibles sustitutos

**Gráfico No. 3. Solubilidad de proteínas de la semilla de hule según su pH**



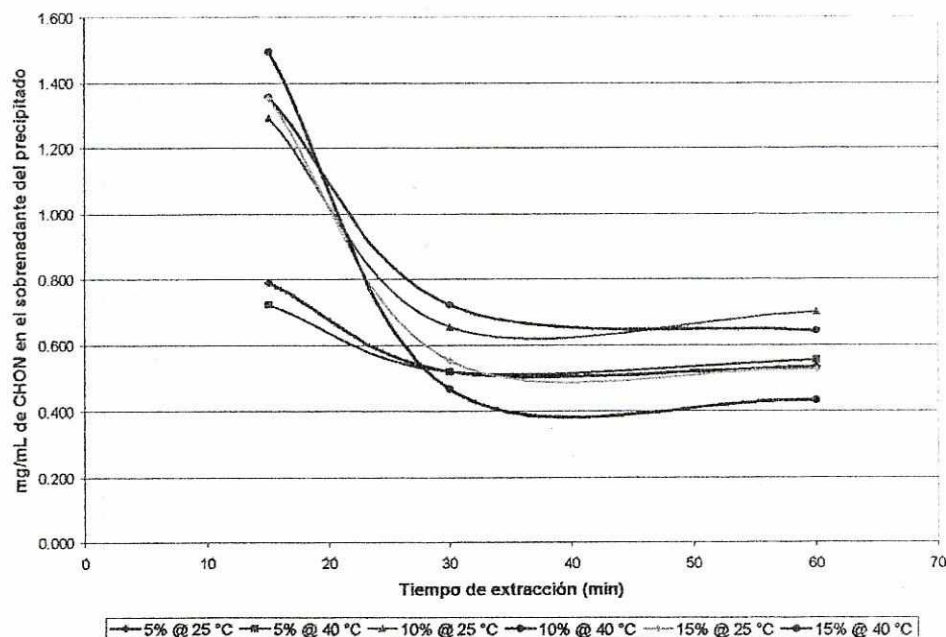
De acuerdo a las características de solubilidad de la proteína de semilla de hule (Gráfico No. 3) se escogió un aislamiento por precipitación isoelectrica, como solvente, se eligió el hidróxido de sodio (NaOH), porque este permite la solubilización de la mayor cantidad de proteína posible a un pH básico (alrededor de 9 o 10). Damodaran (1996) establece que a pH demasiado básico, por encima de 10.0, se promueve la racemización de aminoácidos incluso a bajas temperaturas, reacción que puede extenderse debido a la agitación requerida para la solubilización de la proteína durante un tiempo dado, por lo que es importante tener en cuenta no solubilizar la proteína a pH demasiado básico porque de inicio se estaría dañando tanto su funcionalidad, como su calidad nutricional, factores que deben mantenerse a lo largo del proceso de extracción.

Al igual que la extracción del aceite, el estudio de variables de extracción se diseñó tomando en cuenta los parámetros de transferencia de masa de la Ecuación No. 4 posibles de manipular. Dentro de los parámetros de la Ecuación No. 4, se tuvieron en cuenta los siguientes puntos directrices para el diseño experimental: escogencia del solvente; tipo de proceso: según Stavrinides et al. (1993) se obtienen precipitados de proteína con partículas más compactas utilizando procesos por lotes en lugar de procesos continuos; se desconocía el efecto de la temperatura en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas de la semilla de hule, por ende en vista a no dañar la proteína se utilizaron temperaturas de extracción que garantizaran la no desnaturalización de las proteínas (25 °C y 40 °C); mantener de trasfondo del diseño del proceso el tiempo, pues este es sin duda alguna uno de los principales factores económicos que más adelante determinarán la viabilidad del proceso.

1. Determinación de la relación harina y solvente para la extracción. Por determinarse que el proceso sería por lotes y según la Ecuación No. 4 el gradiente de concentración para un proceso por lotes debe ser fijo, razón por la cual, la extracción debía llevarse a cabo a una relación de concentración establecida. Se escogieron como relaciones de harina entre solvente de estudio 15, 10 y 5% (porcentaje p/v), porque como los demuestran los resultados de otras publicaciones de extracción de proteínas (Beauchat et al., 1975, Rivas et al., 1981) a relaciones más altas de harina entre solvente el solvente tiende a saturarse de soluto y tal como lo explica Stavrinides et al. (1993) y McCabe et al. (1999), esto resulta en que el soluto que ya se había disuelto comience a insolubilizarse.

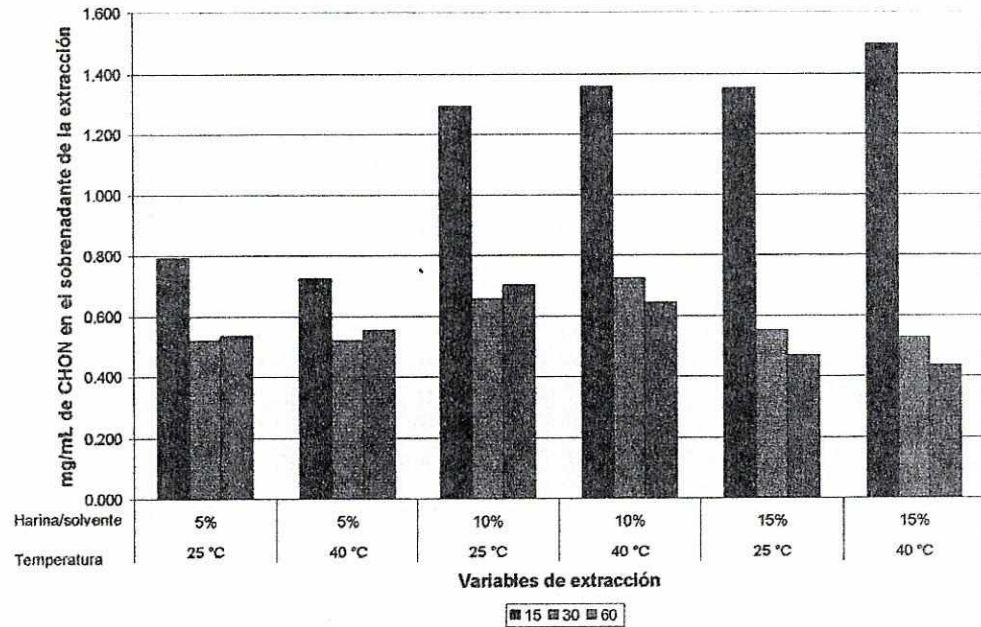
Para esta parte del experimento se produjo el aislado bajo las condiciones establecidas en la Tabla No. 3. En el sobrenadante del precipitado se determinó la cantidad de proteínas solubles mediante el método de Bradford; este método se utilizó dada su rapidez y su especificidad sobre proteínas solubles a pH ácido, tal como era el caso del sobrenadante de la precipitación (pH = 4.0). Para determinar que relación harina entre solvente era la ideal para la extracción se halló bajo que condición (15, 10 o 5%) quedaba menos proteína solubilizada en el sobrenadante de la precipitación, porque menos proteína soluble era un indicador de más proteína precipitada y por lo tanto, más proteína solubilizada inicialmente en el solvente de extracción. Los resultados del Gráfico No. 4 y la comparación del Gráfico No. 5, muestran que la extracción de proteína a diferentes relaciones harina entre solvente, difiere considerablemente con 15 minutos de extracción (en los que la mayor cantidad de proteína precipitada se dio al 5% harina entre solvente), sin embargo, a los 30 y a los 60 minutos no se logra establecer una diferencia marcada.

**Gráfico No. 4. Comparación de tratamientos para la extracción de la proteína de semilla de hule (*Hevea brasiliensis*)**



Por ello, para lograr establecer la diferencia entre estos tratamientos se estableció mediante un análisis de proteína total por el método de Kjeldahl, evaluando los extractos en las tres relaciones harina entre solvente, a las dos temperaturas y a los sesenta minutos, determinándose finalmente que la relación harina entre solvente a utilizar debía ser el 5% (Tabla No. 5). En dicha Tabla se observa que utilizando la harina entre solvente en una relación al 5% tanto a 40°C como a 25 °C se extrae un mayor porcentaje de proteína que en los casos de la relación harina entre solvente 10 y 15%.

**Gráfico No. 5. Comparación entre diversos tratamientos de extracción**



**Tabla No. 5. Porcentaje de proteína de semilla de hule extraída durante 60 minutos a diferentes relaciones harina entre solvente y a 25 °C y 40 °C**

Harina entre solvente (% p/v)	% Proteína extraída	
	@ 25 °C	@ 40 °C
5%	71.67	80.61
10%	60.34	73.72
15%	55.16	73.04

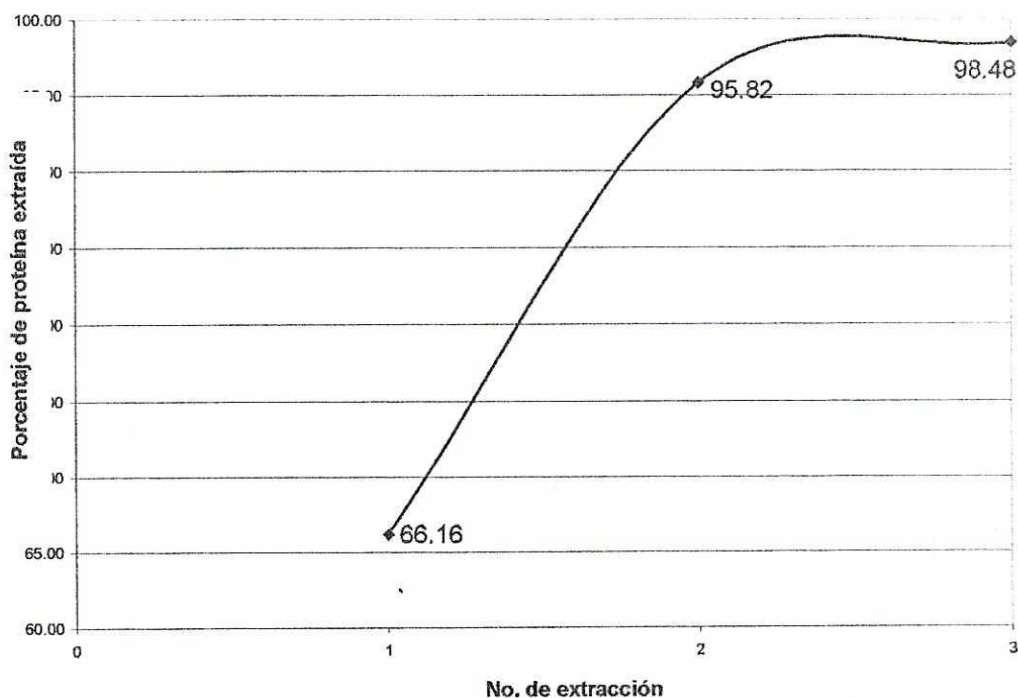
Adicionalmente, en el Apéndice (Gráfico No. 17, Tabla No. 11) se hace un análisis matemático de extrapolación para determinar qué hubiese sucedido de utilizar relaciones harina entre solvente menores al 5 %. Se aprecia una tendencia a un aumento en la cantidad de proteína extraída al disminuir la relación harina con solvente, esto seguramente como consecuencia del aumento en el gradiente de concentración. Bajar la relación harina y solvente aparentemente sería beneficioso, por lo cual, probablemente es recomendable que más adelante se hagan estudios usando relaciones entre harina y solvente menores que la utilizada en el presente, estableciendo un balance económico: determinar qué tanto mejora el proceso, el costo del solvente ahorrado, costos de equipo para bombeo, etc.

2. Efecto del tiempo de extracción. En el Gráfico No. 4 no se marca una clara diferencia entre la extracción por 30 minutos y la de 60 minutos. Se escogió como tiempo de extracción 1 hora sobre la  $\frac{1}{2}$  hora como factor de seguridad tomando en cuenta la Ecuación No. 4. Empero, se considera recomendable hacer un estudio más detallado de qué pasaría si la extracción se hiciera durante un tiempo intermedio entre los 30 y los 60 minutos, pues esto tendría beneficios económicos para el proceso a escala industrial.

3. Efecto de la temperatura en la extracción. En la Tabla No. 10 del apéndice se muestran los % de proteína extraídos a 25 °C y 40 °C. Para hallar evidencia de si la diferencia entre los datos experimentales en cuestión tenía un peso fuerte en la ponderación de los resultados finales se utilizó un “test de student (confróntese Apéndice). A través de este análisis se confirmó el siguiente enunciado: *El porcentaje de proteína de semilla de hule extraída con una relación harina entre solvente al 5%, extraída durante 1 hora y a 25 °C no es diferente del porcentaje de proteína extraída por 1 hora, en relación harina entre solvente al 5% a 40 °C con una significancia del 95% (corresponden a la misma población).* Dado la anterior comprobación, se optó por realizar el proceso a temperatura ambiente (25 °C) principalmente por economía, ya que el no requerimiento de temperatura implica un ahorro en el uso de energía para el calentamiento.

4. Número de extracciones. La termodinámica, conceptualiza el término eficiencia, la cual limita los procesos reales a un intervalo de acercamiento infinito a la idealidad (100% de eficiencia, que no se puede alcanzar jamás). Sin embargo, un proceso puede aumentar su eficiencia utilizando caminos alternos a la idealidad, generalmente, aumentando sus etapas; por ello para aumentar la cantidad de proteína extraída se estudió cuántas etapas era posible aplicar para obtener una concentración de la proteína que generase un interés para la tecnología de alimentos. Los resultados se muestran en el Gráfico No. 6.

**Gráfico No. 6. Determinación del número de extracciones necesarias para producir un aislado de proteína de semilla de hule (*Hevea brasiliensis*)**



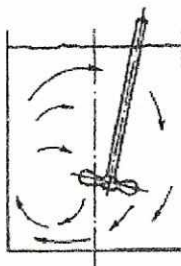
Analizando el Gráfico mencionado, se observa que luego de tres etapas la extracción de la proteína es casi total. Para la producción del aislado de proteína se estableció la necesidad de aplicar dos veces el proceso de extracción, esta escogencia se hizo fundamentalmente por consideraciones económicas: entre la segunda y la tercera extracción apenas se concentra un 3% la proteína, este 3% tendría un costo muy grande porque implica 1 hora más de proceso, más solvente, más costos de bombeo, etc. Por ende, para mantener el proceso atractivo para la industria se fijaron dos extracciones. En futuros estudios, podrían aplicarse las sugerencias en cuanto a tiempo de extracción, relación harina entre solvente más baja que la utilizada en el actual estudio y así, quizá, pueda hacerse el proceso con dos extracciones, en menos de dos horas y gastando una menor cantidad de solvente y minimizando el consumo de energía.

#### D. Obtención del aislado de proteína de la semilla de hule.

En la producción del aislado de proteína el factor limitante fue el equipo con el que se contaba. Las condiciones experimentales eran bastante controlables por ser a microescala y con instrumental de laboratorio; sin embargo, en la planta piloto debe ponerse especial atención varios factores que aseguren la obtención del producto deseado y el equipo utilizado no necesariamente tendrá los mismos efectos sobre el producto que los factores de proceso en laboratorio. Inicialmente debe tenerse en cuenta que, para la

producción del aislado de proteína de semilla de hule, debe utilizarse equipo especial, los líquidos que se manejan son altamente corrosivos por lo cual es recomendable la utilización de tuberías de polipropileno, equipo de acero inoxidable, vidriado de aspas de agitación, etc. Conjuntamente, con la corrosividad del líquido (ácido y base) el extracto de proteínas tiende a ser altamente viscoso, razón por la que en un momento dado ya no podrá tratarse como fluido newtoniano, consecuentemente requerirá de otras cargas de potencia para su transporte; este aparente problema se puede evitar siempre que se minimice o se haga nulo el transporte de fluido altamente viscoso (v.g. utilizar el mismo reactor para la disolución de la proteína y su posterior precipitación).

La extracción de la proteína se realizó en un tanque de agitación con capacidad de 40 L, la capacidad utilizada del tanque fue de 9 L y el agitador era un agitador no centrado (ver Figura No. 3). Según las condiciones experimentales determinadas, se debió extraer alrededor de un 90% de proteína, sin embargo, en la Tabla No. 6 se observa que únicamente se extrajo un 64.23% de proteína. Este hecho puede explicarse probablemente por varias consideraciones teóricas; según Dahlstrohm et al. (1999) y McCabe (1999) el flujo dentro de un tanque de agitación es de tres clases: radial, tangencial y longitudinal. Los primeros dos flujos se generan alrededor de la hélice, mientras que el flujo longitudinal es el que transporta masa a través de todo el tanque, ayudando a mantener en suspensión las partículas, por lo tanto, el no utilizar el tanque a su capacidad total provocó el corte del flujo longitudinal razón por la cual probablemente no se pudo suspender adecuadamente las partículas de proteína y por ende no se extrajeron como se esperaba.



**Figura No. 2. Patrón de flujo en un tanque con agitación con el agitador no centrado.**

El estudio de las variables de extracción mediante precipitación isoeléctrica de la proteína de semilla de hule se realizó en un laboratorio. Durante esta fase del proyecto fue notoria la formación automática con la caída del pH hasta 4.0 de un precipitado con partículas cohesionadas y de color similar a la harina de la que se obtuvo.

En la planta piloto, la precipitación isoeléctrica de las proteínas se hizo mediante una agitación manual mientras se agregaba el ácido clorhídrico para llegar al punto isoeléctrico. El precipitado formado mediante este proceso no presentó formación de agregados de partículas, la proteína precipitada más bien era una suspensión que no tenía la suficiente compactación de partículas para separarse mediante centrifugación.

Probablemente, de nuevo los resultados puedan explicarse mediante consideraciones teóricas. Las siguientes consideraciones teóricas se basan en el trabajo de Stavrinides et al. (1993) respecto de los parámetros ingenieriles para la precipitación y purificación de proteínas; en una precipitación proteínica influyen varios parámetros: la nucleación, el crecimiento y ruptura de los agregados de partículas, y en general, la cinética de contacto entre el agente precipitante y el ente a precipitar. La nucleación o formación de los primeros agregados de partículas se induce mediante energía, es decir, agitación; esta operación también marca el radio de acción de los otros dos parámetros, una agitación fuerte, rondando en el régimen de flujo turbulento, promueve una alta tasa de choque entre agente precipitante y ente a precipitar, por lo tanto, la formación de partículas compactas que precipiten y sean separables por otra operación unitaria subsiguiente. No obstante, estas condiciones no se vieron favorecidas por la agitación manual y seguramente esto explique el porqué la proteína no precipitó de manera que fuera separable. Además, Damodaran (1996) recomienda como agente precipitante el ácido sulfúrico, que a diferencia del ácido clorhídrico presenta una mayor extensión de choque con las partículas a precipitar y es menos desnaturizante.

Para lograr la formación de agregados proteínicos compactos se utilizó etanol al 45%. Este solvente, de acuerdo a la teoría de solubilidad de proteínas, tal como lo explica Li Chan (1996), tiene el efecto de cambiar la fuerza iónica del medio, provocando la precipitación de una pasta proteínica. Dicha pasta se secó y se molió para obtener finalmente el aislado proteínico.

1. **Composición del aislado de proteína.** La Tabla No. 6 indica la composición proximal del aislado de proteína de semilla de hule. Comparado con el aislado de frijol fresco y el de soya, el aislado obtenido tiene menor cantidad de grasa, probablemente porque los dos aislados con que se compara fueron obtenidos mediante una precipitación isoelectrica, mientras que el aislado de proteína de semilla de hule además de la precipitación isoelectrica se le agregó etanol que pudo haber acarreado grasa y en consecuencia su menor contenido de grasa.

La proteína está en mayor concentración en el aislado de frijol fresco y de soya que en el aislado de semilla de hule, mientras que los carbohidratos en el aislado de semilla de hule prácticamente doblan el contenido de estos en el aislado de frijol fresco y el de soya. Podría pensarse que esto es consecuencia que dentro de los carbohidratos del aislado de semilla de hule se incluye también la fibra cruda, lo cual no es cierto para sus contrapartes comparativas. Sin embargo, esto puede estar dando indicios de que la adición de etanol en el sistema de precipitación fue perjudicial, en el sentido de que también precipitó algunos carbohidratos.

Tabla No. 6. Composición del aislado de proteína de semilla de hule (*Hevea brasiliensis*) obtenido mediante precipitación isoelectrica

	Presente estudio	Aislado de frijol fresco <sup>a</sup>	Aislado de soya <sup>b</sup>
Grasa (%)	1.08 ± 0.04	3.9	4.35
Proteína (%)	64.23 ± 1.32	75.6	73.77
Carbohidratos (%)	17.38 ± 2.01	8.2	8.33
Humedad (%)	13.64 ± 0.06	6.6	7.59
Cenizas (%)	3.66 ± 0.21	2.4	3.98

Fuente a y b: Vásquez Mata 2004.

Adicionalmente a la probable coprecipitación de carbohidratos por la adición de etanol la baja tasa de extracción de proteínas (rendimiento según Ecuación No. 1 de 65.10%), también debe considerarse las operaciones de proceso entre la primera y la segunda extracción. Entre estas dos operaciones existe un paso de filtración para recuperar la harina que se sometió a una primera extracción y redisolverla en el hidróxido de sodio; no se realizó un rendimiento de la filtración por tal razón, existe la posibilidad de que este filtro utilizado no haya sido adecuado para los propósitos del proceso, porque no recuperó convenientemente la harina, así, en la segunda extracción había menor cantidad de harina, y por lo tanto, menor cantidad de proteína a extraer (nótese en el Gráfico No. 6 que durante la primera extracción se extrae un 65% de la proteína y dicho porcentaje aumenta por encima del 90% con la segunda filtración). Como alternativas debiera estudiarse esta etapa de filtrado de acuerdo a lo establecido por McCabe (1999) para evaluar las características de compresibilidad de la torta de harina formada durante la filtración y así, determinar las condiciones operativas del filtro o bien, considerar en esta etapa la utilización de un filtro centrífugo.

De acuerdo a lo establecido por Linden y Lorient (1994) el aislado de semilla de hule obtenido en el presente trabajo no puede considerarse un aislado proteínico porque no contiene un porcentaje mayor al 85% de proteína, debiera considerarse una harina de semilla de hule. La norma CODEX STAN 174-1989 (ver Apéndice B.) clasificaría la harina obtenida como un producto proteínico de origen vegetal pues tiene un 40% o más de proteína, esto deja abierto el debate para definir como llamar finalmente al producto: ¿harina o aislado?, para fines del presente estudio se llamará aislado de proteína.

Li Chan (1996), expone que la superficie de las proteínas interactúa con el medio del solvente, mediante las cadenas de aminoácidos polares y las cadenas que contienen residuos iónicos; agregado a estas interacciones, cuando pequeños conglomerados de grupos hidrofóbicos están en la superficie de las

proteínas, se forman complejos de moléculas de agua alrededor de ellos, promoviendo la absorción de agua en la superficie. Tal vez estos factores expliquen el por qué del alto contenido de agua (porcentaje de humedad) del aislado de semilla de hule comparado con el aislado de frijol y el de soya, es decir, quizá existan grupos hidrofóbicos en la superficie de las proteínas de semilla de hule que ligen el agua con la suficiente fuerza como para que esta no pueda ser eliminada mediante un proceso de secado.

2. Evaluación nutricional del aislado. La Tabla No. 7 muestra la comparación del contenido de lisina de la proteína de semilla de hule en comparación con el patrón FAO (1985) para diversos regímenes de alimentación.

**Tabla No. 7. Contenido de lisina en el aislado de proteína de semilla de hule**

Proteína de semilla de hule (mg lisina/g proteína)	Patrón FAO (1985) (mg lisina/g proteína) <sup>a</sup>		
	Infantes	Preescolar	Adulto
23.5	66	58	16

a: FAO/WHO/ONU. Expert Consultation World Health Organization. Energy and protein requirements Report of a joint meeting. Technical report series No. 274. Génova, Italia, 1985.

Los resultados al igual que los de Selle et al. (1983) (250 mg lisina/g N, mientras que en el presente estudio los 23.5 mg lisina/g de proteína corresponden a aproximadamente 150 mg/g N), muestran una deficiencia de lisina (alrededor de 1/3 del contenido de lisina en la ingesta de lisina recomendada en el patrón FAO 1985 para un infantes).

Esta discrepancia puede ser porque los resultados de Selle et al. (1983) presentan lisina total (por el método de la AOAC con dinitrofenilbenceno, DNFB), mientras el resultado del presente estudio corresponde a la lisina reactiva. Adicionalmente, existen diferencias intrínsecas entre las variedades clonales de semilla de hule empleadas en ambos estudios y en esta investigación la semilla fue sometida a tratamientos para aislar la proteína, los cuales pudieron degradar en cierta medida la lisina presente. Los resultados de Selle et al. (1983) también refieren una deficiencia de treonina en la semilla de hule. En general, otros autores tales como Fetuga et al. (1977), Giok et al. (1967) han reportado un contenido de entre 254 a 338 mg lisina/g N y 151 a 238 mg treonina/g N, así que, tal parece ser que los bajos contenidos de lisina encontrados en el aislado de proteína apuntan a que la proteína no es de buena calidad.

Sin embargo, no se puede descartar totalmente la proteína de la semilla de hule como fuente de proteína de buena calidad nutricional porque los resultados aquí presentados no son definitivos; se sugiere que sean complementados con estudios nutricionales del aislado de proteína obtenido a partir del proceso de

extracción de extracción acá presentado y siguiendo las mejoras mencionadas para afinar el proceso. Por ejemplo, se podrá realizar un análisis de digestibilidad proteínica, bien sea mediante experimentos in vivo o in vitro, a través de los mismos podrá establecerse y evaluarse qué tan bueno o malo es utilizar el aislado de semilla de hule en la alimentación. Simultáneamente a los estudios de digestibilidad se propone realizar un análisis del perfil de aminoácidos para establecer si al igual que reportó Selle et al. (1983), existe deficiencia de treonina en el aislado proteínico. El trabajo de Giok et al. (1967) y el de Selle et al. (1983) mencionan igualmente la deficiencia del contenido de aminoácidos azufrados en la semilla de hule; con el análisis de aminoácidos insinuado se logrará zanjar las discordancias en cuestión y así finiquitar qué aminoácido es el deficiente en el aislado de la semilla de hule.

El otro factor preocupante a nivel nutricional era el contenido del factor tóxico linamarina porque produce cianuro a través del ácido cianhídrico o HCN. Los resultados del presente estudio (Tabla No. 8) muestran que mediante el procesamiento de la semilla de hule se hace prácticamente inocuo el alimento, ya que seguramente, el mismo se consumirá combinado con otras harinas o alimentos, sumado a esto es prácticamente imposible que una persona coma en una sola ración casi 2 kg del aislado.

**Tabla No. 8. Contenido de glucósidos cianogenéticos (como ácido cianhídrico HCN) en el aislado de proteína de semilla de hule**

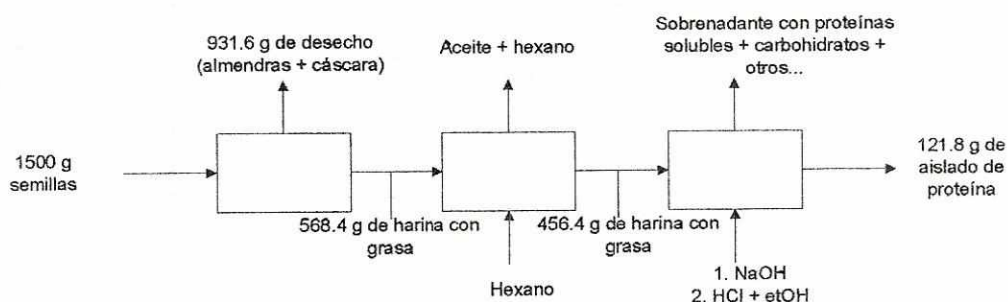
Contenido inicial de HCN (mg HCN/g producto)	HCN en el aislado proteínico (mg HCN/g producto)	Dosis letal media (DL <sub>50</sub> en mg HCN/kg de peso corporal)	Cantidad ingerida del aislado proteínico que pondría en riesgo la salud <sup>a</sup>
0.0344 ± 0.00313	0.0163 ± 0.00543	0.5 a 3.5	1.84 kg

**a:** Valor estimado para una persona de 60 kg de peso corporal, que consuma un alimento cuyo glucósido tenga la DL<sub>50</sub> menor (0.5 mg/kg peso corporal).

Los resultados de Giok et al. (1967) muestran una disminución en el contenido de HCN de la semilla de hule al someterla a un proceso de cocción y extracción (de 330 mg HCN/100 g semilla se disminuye a 8.9 mg HCN/100 g semilla), dicha disminución se acentúa al extraer el aceite mediante prensado (el contenido de HCN baja hasta 3.4 mg HCN/100 g de producto). Este comportamiento también va en concordancia con lo hallado por Lottman (1981), pues al extraer con solventes o por prensado o combinando ambos procesos el aceite también disminuyó el contenido de HCN en la torta residual de la semilla de hule; a esto se suman los reportes de Selle et al. (1983) que refieren una disminución en el contenido de ácido cianhídrico (HCN) en la semilla de hule, como consecuencia de procesos de cocción, remojo y extracción con hexano. Por lo tanto, los resultados del presente estudio sumados a los de investigaciones previas, respaldan concluyentemente que tal como lo afirmara Devendra (2003), el

contenido de HCN de la semilla de hule se minimiza mediante un tratamiento de disrupción celular sumado a un secado, que incluso, podría ser solar con lo cual se economizarían recursos en el procesamiento de la semilla de hule.

3. Rendimiento del aislado. El Diagrama No. 4 muestra el balance de masa para la extracción de proteínas de semilla de hule, respecto al rendimiento de 65.10%, este seguramente pueda mejorarse conforme se vaya afinando el proceso. En principio, se tendrá que diseñar un proceso para la extracción del aceite más eficiente, pero más que la eficiencia misma un proceso en vistas de explotar industrialmente el aceite. El proceso de extracción de proteínas tal vez pueda conjuntarse con uno de extracción de almidones y así, el procesamiento integral de la semilla de hule pueda llegar a tener un interés económico para la inversión.



En los 121.8 g de aislado se hallaron 78.2 g de proteína, de 120.2 g de proteína que se podían extraer en los 456.4 g de harina, por lo tanto según la ecuación No. 1, se tiene un  $r = 65.10\%$

Diagrama No. 4. Balance de masa para la determinación del rendimiento de extracción de proteínas de semilla de hule.

4. Masa molecular de las proteínas de semilla de hule según electroforesis SDS-PAGE. La Figura No. 3, muestra los resultados de la electroforesis en SDS-PAGE del aislado de proteínas de semilla de hule. Se utilizó este tipo de electroforesis pues provee una caracterización en función del tamaño molecular de las proteínas porque funciona desnaturalizando estructuralmente a las proteínas, de tal manera, que la separación en la poliacrilamida se realice por interacciones estéricas consecuencia del tamaño molecular. No existen estudios que hablen acerca del tamaño de las proteínas de semilla de hule, razón por la cual, los resultados acá presentados buscan ser guías para futuros estudios. La acrilamida utilizada en la separación fue al 10%, se recomienda que en futuras repeticiones se utilice acrilamida a un mayor porcentaje, quizá un 12.5% para aumentar la interacción polímero proteínico con polímero de separación. El voltaje fue de 100 V aplicado durante una hora, quizá en futuras repeticiones se aconsejable

ajustar el voltaje a un valor menor. El marcador de masa molecular utilizado era de amplio espectro, es decir, incluía una gama de proteínas de varios pesos moleculares.

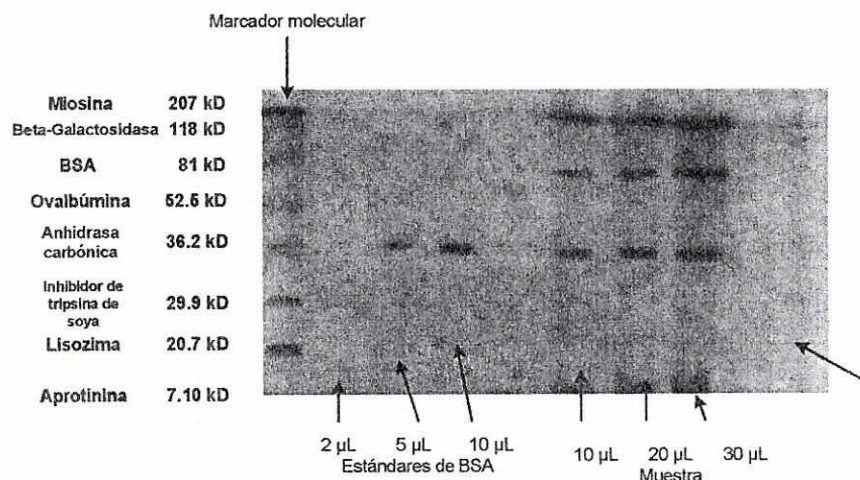


Figura No. 3. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de semilla de hule.

La foto de la electroforesis fue analizada trabajando con el negativo para localizar las bandas de proteína. En la figura No. 3, observando el pozo en donde se depositaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra se localizan cuatro bandas de proteínas. Las bandas aparecen borrosas y anchas, seguramente incluyen varios grupos de proteína, es decir, las cuatro bandas representan a varias proteínas. Así, se encontró un grupo de proteína de masa molecular alrededor de 7 a 10 kD, otro grupo alrededor de 30 a 36 kD, un tercero aproximadamente de 75 kD y finalmente, un cuarto grupo de unos 118 kD. El trabajo a realizar en futuros estudios será describir estas cuatro fracciones de proteínas, describir su naturaleza y de ser posible su masa molecular exacta, para ello deberán utilizarse marcadores de masa molecular de mayor especificidad.

Las proteínas encontradas en el SDS-PAGE, corresponden a las proteínas solubles en el extracto preparado con buffer tipo PBS a pH de 7.4, por lo tanto, estas cuatro fracciones de grupos de proteínas no corresponden necesariamente a la totalidad de las proteínas de semilla de hule. De acuerdo a estimaciones a partir del Gráfico No. 15 (ver Apéndice), el extracto analizado de proteínas contenía una concentración proteínica de uno 0.15 mg/mL, es decir alrededor de un 23% del total de proteínas en el aislado proteínico.

## E. Funcionalidad del aislado de proteína

La funcionalidad de las proteínas es uno de los diversos factores que interaccionan para generar los atributos sensoriales de los alimentos. La producción de un aislado de proteína de semilla de hule con su relativamente pobre valor nutricional va encaminado a establecer qué tan bueno o malo sería aprovechar la

funcionalidad del aislado en formulaciones alimenticias, o sea, más que utilizar el aislado como alimento mismo, emplearlo como aditivo alimentario.

En virtud de lo anterior, se muestra el perfil de funcionalidad de las proteínas de semilla de hule con lo cual se espera generar un panorama de aplicabilidad según lo establecido en la Tabla No. 2. La siguiente Tabla es una reseña de las propiedades funcionales de la semilla de hule medidas en el presente trabajo, además muestra una comparación con propiedades funcionales de otros aislados de semillas y granos de los cuales se conoce su funcionalidad para así por comparación dar principios de utilización de la proteína de la semilla de hule en alimentos.

**Tabla No. 9. Propiedades funcionales del aislado de proteína de semilla de hule**

Propiedad funcional	Valor	Valores comparativos
Estabilidad de emulsión (min)	15	
Capacidad de emulsión (mL aceite)	40.8 ± 1.77	
Actividad emulsificante (%)	12.5 ± 3.54	
Humectabilidad (g muestra/s)	0.0127 ± 0.000909	
Estabilidad de espuma (min)	15	60 <sup>a</sup>
Incremento de volumen de espuma (%)	3.50 ± 0.707	6 <sup>a</sup> , 18.81 <sup>b</sup> , 41.56 <sup>c</sup>
Absorción de agua (g agua/g muestra)	2.98 ± 0.0380	2.21 <sup>a</sup> , 2.63 <sup>b</sup> , 2.22 <sup>c</sup>
Absorción de aceite (g aceite/g muestra)	1.94 ± 0.0629	1.46 <sup>a</sup> , 2.86 <sup>b</sup> , 1.07 <sup>c</sup>

Fuente a: Samayoa 1998.

Fuentes b y c: Vásquez Mata 2004; b: aislado de frijol, c: aislado de soya.

1. Solubilidad e hidratación: efecto del pH y del calor. Damodaran (1996) define la solubilidad de una proteína como un prerrequisito para su utilización en matrices alimenticias. La hidratación define la capacidad de una proteína para absorber agua bajo ciertas condiciones, por lo tanto, solubilidad e hidratación van ligadas. En el Gráfico No. 7 se muestra el efecto del pH sobre estas propiedades funcionales en cuestión.

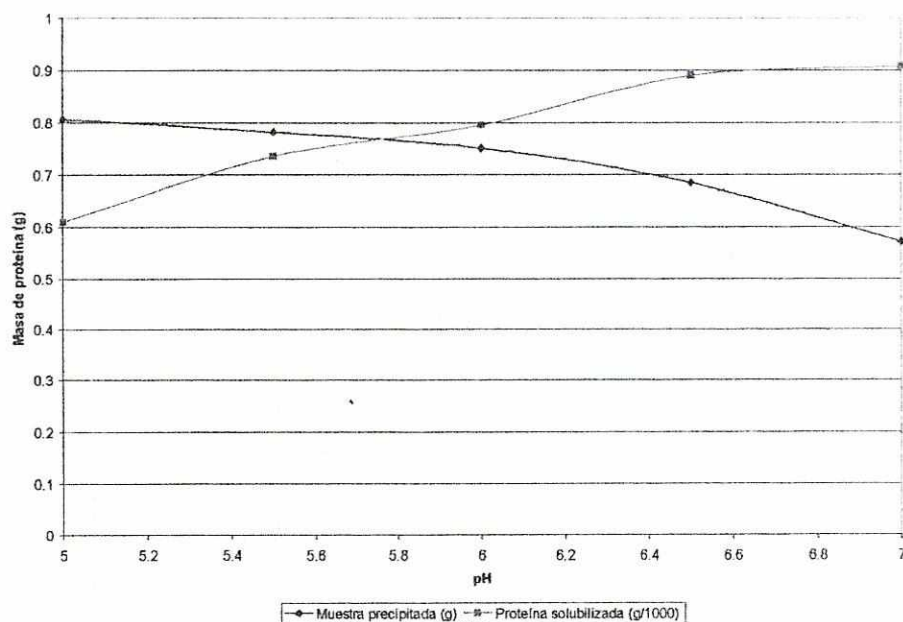
La curva de muestra precipitada en el Gráfico No. 7, indica que la capacidad de hidratación de la proteína de semilla de hule aumenta a pH ácidos, mientras que la proteína es bastante soluble a pH básicos.

Considerando el comportamiento del aislado de semilla de hule en función del pH, eventualmente la misma pueda aplicarse en formulaciones de alimentos de baja acidez, casi neutros.

Para evaluar la funcionalidad del aislado se escogió un pH de 6.0. Este es un pH en el que podría emplearse esta proteína en alimentos casi básicos y en el cual la proteína presenta un buen balance entre proteína soluble/insoluble, pues tal como lo muestra el Gráfico No. 7 la proteína soluble está aproximadamente en la misma proporción que la proteína insoluble a este pH. Dado el pH experimental,

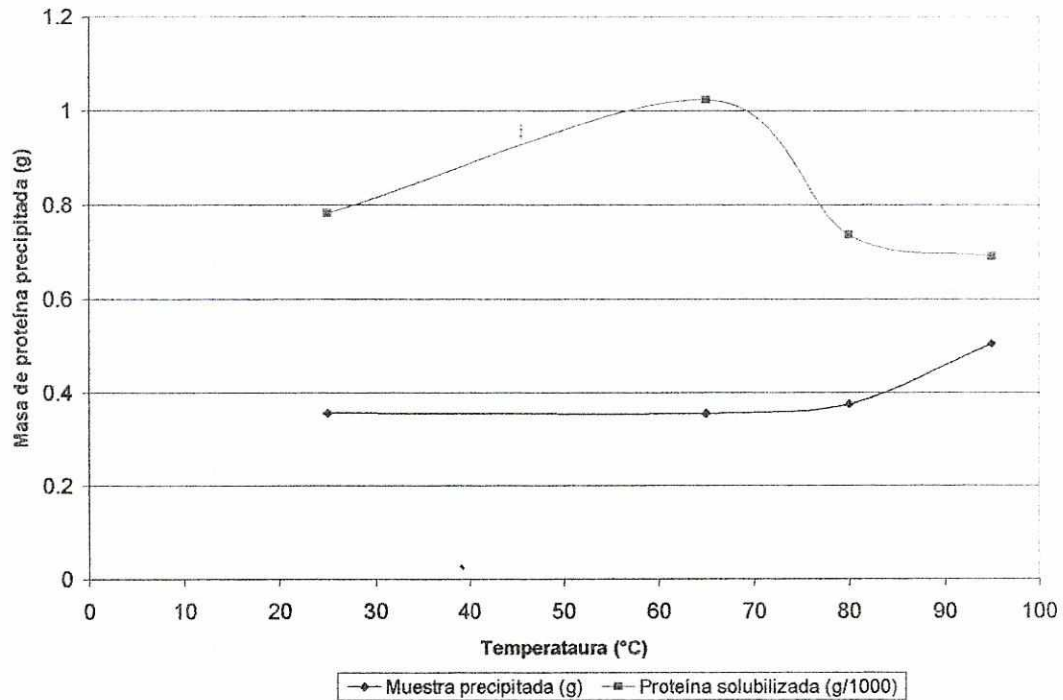
deberá tenerse en mente que los resultados mostrados son válidos a ese pH a otros valores de pH los resultados no necesariamente serán iguales.

**Gráfico No. 7. Efecto del pH en la solubilidad e hidratación de la proteína de semilla de hule**



En el Gráfico No. 8 se estudia el efecto del calor en las propiedades de solubilidad e hidratación de la proteína. La curva de muestra precipitada presenta un aumento arriba de los 80 °C, probablemente esto sea indicador de que arriba de esa temperatura la proteína se esté precipitando como consecuencia de una desnaturalización por el calor. Sin embargo, esta afirmación no es concluyente, se aconseja que la desnaturalización se estudie posteriormente mediante alguna técnica específica quizá un análisis por calorimetría diferencial. En cuanto a la solubilidad se observa que la temperatura favorece la solubilización hasta unos 65 °C, tal vez como consecuencia del aumento de entropía en solución lo cual facilite la solvatación de las moléculas proteínicas, sin embargo, por encima de los 65 °C, esta proteína se insolubilice, quizá al igual que en el caso de la hidratación como efecto de cierto grado de desnaturalización térmica.

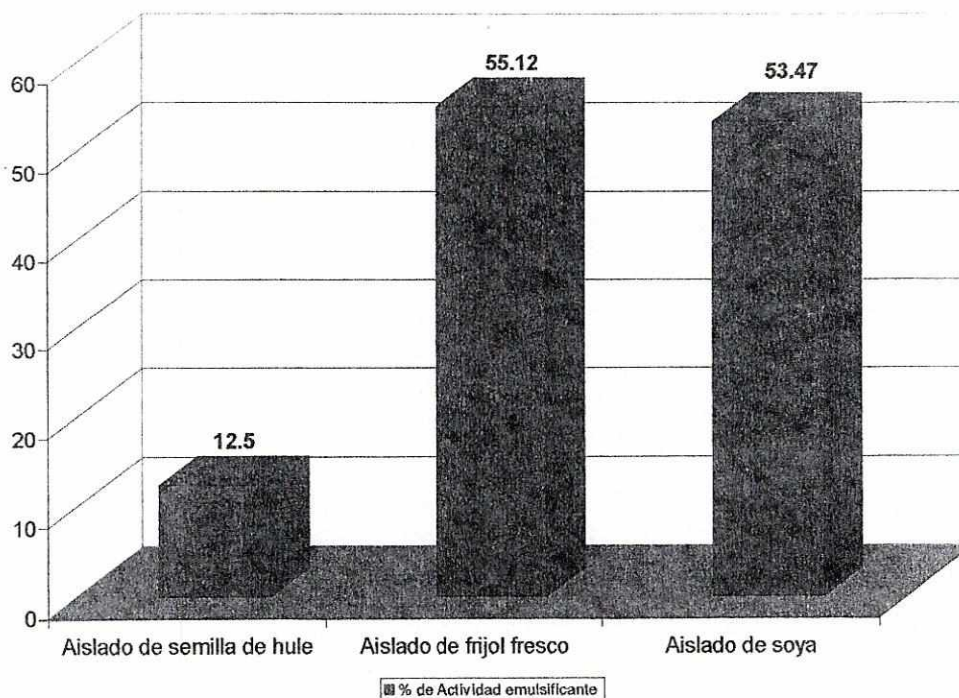
Gráfico No. 8. Efecto del calor en la solubilidad e hidratación de la proteína de semilla de harina de hule



2. Actividad emulsificante. Las propiedades emulsificantes de una proteína son consecuencia de su acción como agentes minimizadores de la tensión superficial (Damodaran, 1996). Se midió la actividad emulsificante de la proteína de semilla de hule, los resultados se muestran en el Gráfico No. 9, comparado con el aislado de frijol y de soya las propiedades de actividad emulsificante de la proteína de semilla de hule son bastante pobres.

La actividad emulsificante de las proteínas de semilla de hule es apenas alrededor de  $\frac{1}{4}$  del de las proteínas con que se compara. Esto indica que no existe una buena estructura conformacional en la interfase de la emulsión, quizá esto sea consecuencia de cierta desnaturalización de la proteína provocada por la precipitación con alcohol.

**Gráfico No. 9. Comparación del porcentaje de actividad emulsificante del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos**



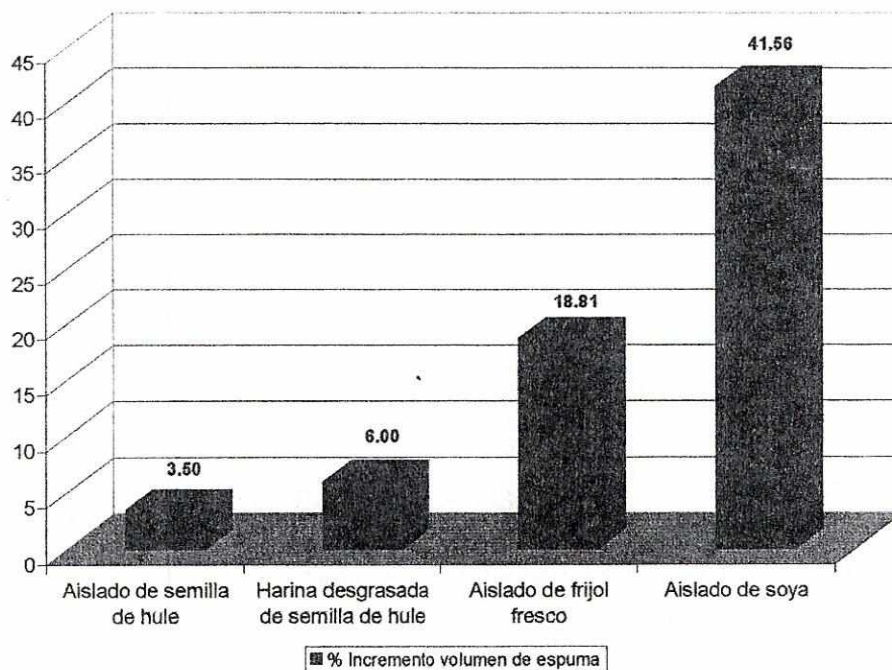
3. Estabilidad y capacidad de emulsión. Como era de esperarse debido a la pobre actividad emulsificante, la proteína de semilla de hule tampoco cuenta con buenas características de estabilidad y capacidad de emulsión: la emulsión formada con una solución de proteína al 1 % apenas resiste 15 minutos y la proteína no puede emulsionar tan siquiera su mismo volumen<sup>2</sup> (ver Tabla No. 9). Quizá empleando la proteína en mayor concentración, tal como lo sugiere la metodología de Yasumatsu (1993), se obtengan mejores resultados respecto a las propiedades emulsificantes de la proteína de semilla de hule, aunque los resultados preliminares del presente estudio no genere buenas expectativas de ser buen emulsionante.

4. Expansión y estabilidad de espuma. Samayoa (1998) reportó un 6.0% de incremento de volumen de espuma luego de 60 minutos de formación de la espuma, en el presente estudio se encontró un 3.50% de incremento de volumen de espuma 15 minutos después de la formación de la misma, a los 60 minutos ya no existía espuma. Además, se espera que exista alrededor de un 30% de albúminas en la proteína de semilla de hule (Samayoa, 1998), lo cual insinúa que aparentemente se debieran de tener buenas características espumantes con un aislado de proteína de semilla de hule. Sin embargo, los resultados (Tabla No. 9 y Gráfico No. 10), demuestran todo lo contrario, posiblemente la pérdida de capacidad de espumeo de las proteínas se deba a cierto grado de desnaturalización por el procesamiento con etanol, puesto que la

<sup>2</sup> Se emplearon 50 mL de solución proteínica al 1% para emulsionar unos 40 mL de aceite.

evidencia visual (ver Apéndice, el proceso en fotografías) demuestra que si existían buenas propiedades de espumeo de la proteína de semilla de hule, sin embargo, para afirmar categóricamente la suposición debiera de completarse con un estudio de desnaturalización de la proteína, tal como se mencionó anteriormente.

**Gráfico No. 10. Comparación del % de incremento de volumen de espuma del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos**



De nuevo se obtienen resultados pobres en una propiedad en la que intervienen interacciones interfaciales. En este caso la proteína en lugar de interactuar con una fase oleosa, debe formar una interfaz resistente a esfuerzos externos, específicamente como lo afirma Damodaran (1996) los esfuerzos provocados por el aire en la superficie aire-agua, a los cuales se añaden propiedades reológicas: las proteínas que forman un gel viscoso, cohesivo y con cierta elasticidad generalmente producen espumas estables; como se verá más adelante, las proteínas de semilla de hule obtenidas en el presente estudio no fueron capaces de gelificar, lo cual acentúa la hipótesis de la desnaturalización proteínica.

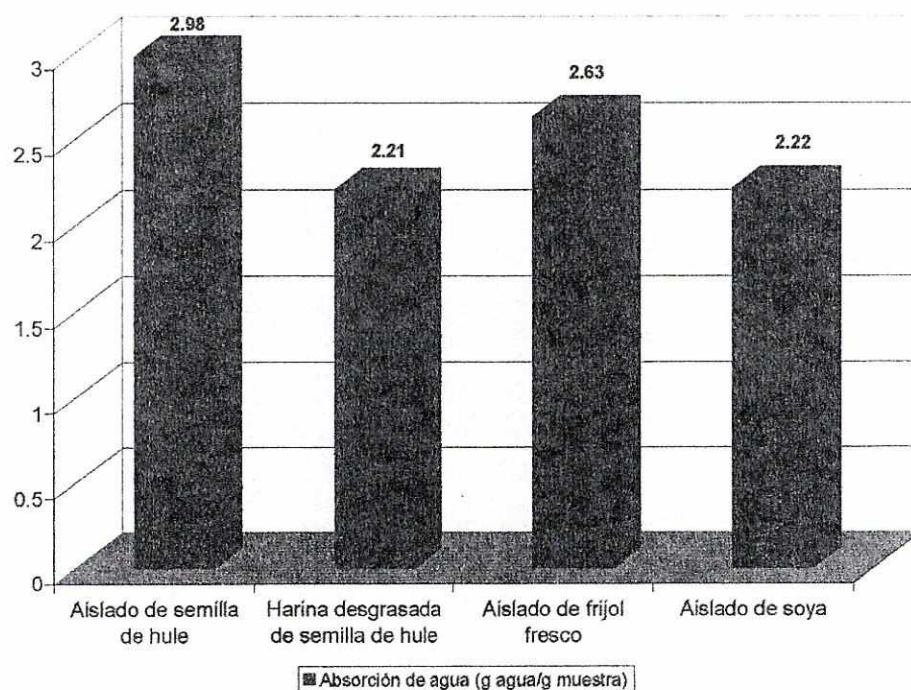
5. Capacidad de absorción de agua y aceite. Nótese en el Gráfico No. 11 el alto poder de absorción de agua mucho más alto incluso que del aislado de proteína de soya. Según la Tabla No. 1, esto sugiere un gran poder de acción de los residuos hidrófilos de la proteína de semilla de hule, es decir, existen

bastantes residuos de aminoácidos con cargas en la superficie de la proteína, lo que le confiere la interacción con el agua que quizá se vea acentuada mediante la formación de puentes de hidrógeno.

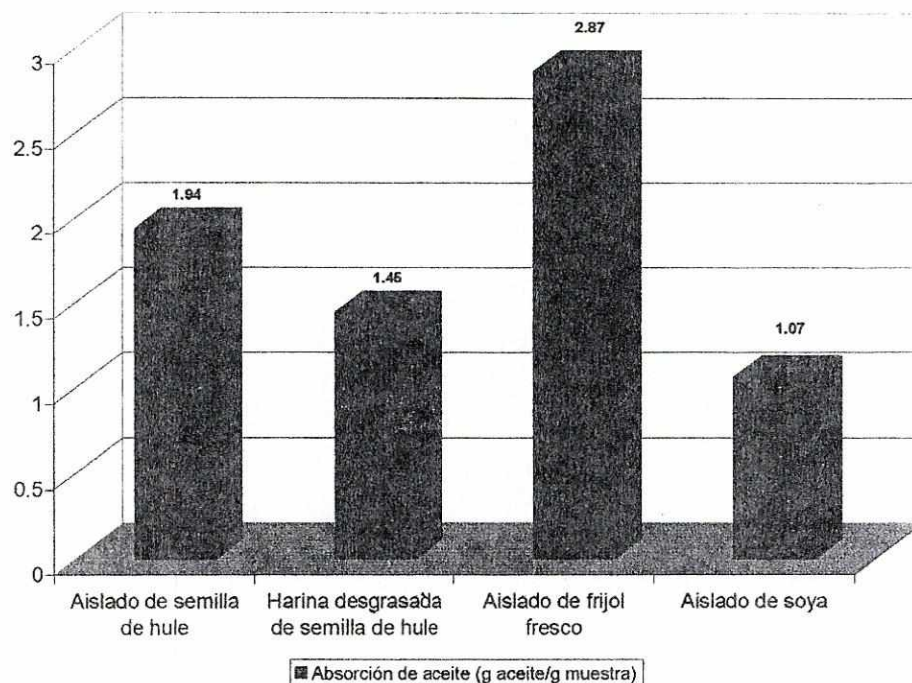
Según el análisis anterior, eventualmente, esta proteína podría utilizarse como aditivo para la formulación de pan, bizcochos y salchichas. Sin embargo, esta afirmación deberá complementarse con un análisis del comportamiento de la proteína de semilla de hule interactuando con otros componentes de la matriz en los alimentos propuestos.

En cuanto a la absorción de aceite, los resultados (Gráfico No. 12) indican una mayor capacidad de absorción de aceite que el aislado de soya y que de la misma harina de semilla de hule, pero menores que a la capacidad de absorción de aceite del aislado de frijol. En primera instancia, entonces el aislado de proteína de semilla de hule puede considerarse como aditivo para la fijación de grasas, sabores, y sustancias dentro de los alimentos que participen como sustancias liposolubles.

**Gráfico No. 11. Comparación de la absorción de agua del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos**



**Gráfico No. 12. Comparación de la absorción de aceite del aislado de proteína de semilla de hule con otros aislados proteínicos**



Esto apunta a los residuos hidrófobos o no cargados de la proteína. Si se compara el valor de absorción de agua con el de absorción de aceite, se puede analizar que el primer valor es aproximadamente unas 1.6 veces más grande que el segundo (2.98 vs 1.84), lo cual en principio podría indicar que existe una proporción mayor de registros con carga que de registros apolares en las moléculas de proteína de semilla de hule.

Cabe señalar que tanto la absorción de agua como la de aceite es mayor para el aislado de proteína de semilla de hule preparado en el presente estudio que para la harina desgrasada de semilla de hule hecha por Samayoa (1998), este hecho gira la atención hacia la posibilidad de que el aumento en la capacidad de absorción de agua y aceite se deba a interacciones proteínicas, ya que lo que se concentró entre la harina y el aislado es principalmente la proteína de la semilla de hule. Este carácter hidrofóbico de la proteína de semilla de hule hace que la misma tal vez puede utilizarse en productos horneados pobres en grasa, por ejemplo, como se sugiere en la Tabla No. 1: buñuelos.

6. Humectabilidad. No existe parámetro para comparar el resultado de la Tabla No. 9, sin embargo, si se puede describir el significado e implicaciones de ésta propiedad. La humectabilidad es una medida de la velocidad con la cual se hidrata la proteína, así una proteína que se hidrate rápidamente será buen canal de funcionalidad para bebidas por su fácil dispersión y también para sistemas viscosos. Sin

embargo, dado que la proteína de semilla de hule no es capaz de gelificar, entonces, su uso como agente para aumento de viscosidad no tendría mucho sentido. En términos prácticos el resultado de la Tabla No. 9 indica que para hidratar 1 g del aislado proteínico se requiere de un tiempo de 83 s, sin agitación o ayuda mecánica, obviamente, este tiempo podrá disminuirse a tan sólo unos cuantos segundos con agitación, por lo que posiblemente esta proteína tenga uso en formulación de bebidas, tal y como lo indica la Tabla No. 1.

7. Gelificación. Acorde a Damodaran (1996) un gel es un sistema intermedio entre líquido y sólido, formado por un complejo polimérico de moléculas entrelazadas de forma cruzada. Existen dos tipos de redes de gel: los formados por proteínas con alto contenido de aminoácidos apolares que forman agregados mediante interacciones hidrofóbicas y geles tipo coágulo, una vez que la concentración de proteína alcanza un nivel crítico; geles formados por proteínas con pocos residuos apolares que generan geles transparentes. Las proteínas fibrosas forman geles incluso a concentraciones tan bajas como un 0.1%, sin embargo, las proteínas globulares requieren una concentración mínima mayor que la de las proteínas fibrosas para gelificar, por lo tanto, aunque se intentó hacer un gel solo y con cloruro de calcio a partir de una solución al 15% de proteína a un pH 6.0, es probable que el hecho de que la proteína de semilla de hule no formara un gel sea consecuencia de que a lo mejor esta proteína sea de tipo globular y por ende requiera una concentración mayor para formar un gel. Para estudios posteriores se recomienda se mida la concentración real de proteína en solución y determinar a partir de qué concentración comienza a formarse un gel.

## IV. Conclusiones

- Fue posible desarrollar un proceso de extracción de la proteína de semilla de hule (*Hevea brasiliensis*), bajo el cual se conservó la funcionalidad de la proteína y además presentó un contenido de glucósidos cianogénicos seguro para el consumo humano.
- Se determinaron que las variables de extracción para la obtención de un aislado de proteína de semilla de hule son: relación harina entre solvente al 5%, dos extracciones, temperatura 25 °C y tiempo de extracción 60 minutos. Además se requiere la adición de etanol al 45% en la precipitación isoelectrica del aislado.
- Se estableció que el pH influencia la solubilidad e hidratación de la proteína bajando la solubilidad al volver más ácido el pH y aumentando la hidratación también a pH más ácido.
- Las propiedades funcionales de superficie se vieron afectadas por el procesamiento; el aislado de proteína de semilla de hule no presentó buena funcionalidad en emulsión, espuma y gel.
- El aislado de proteína de semilla de hule presenta buenas características de humectabilidad y de absorción de agua y aceite, estas dos últimas sugieren que el mismo podría utilizarse en formulaciones alimenticias para salchichas, bizcochos, pan y productos horneados pobres en absorción de grasa, por ejemplo: buñuelos.
- El aislado de proteína de semilla de hule no cumple con los requerimientos diarios de lisina dictados por el patrón proteínico de la FAO (1985), razón por la cual su consumo no debe ser como fuente principal de alimentación, más bien como un aditivo alimenticio, aprovechando su funcionalidad.
- El contenido de glucósidos cianogénicos de la semilla de hule se redujo mediante el procesamiento a niveles seguros para consumo humano en el aislado. Para provocar intoxicación en un hombre adulto de unos 60 kg, este debiera consumir 1.84 kg de aislado en una sola ración alimenticia.
- Se lograron encontrar 4 grupos de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE, los grupos hallados presentaban las siguientes masas moleculares: grupo de masa alrededor de 7-10 kD, grupo dos alrededor de 30-36 kD, un tercero aproximadamente de 75 kD y finalmente, un cuarto grupo de unos 118 kD.

## V. Recomendaciones

- Establecer un análisis de solubilidad del aceite de semilla de hule en hexano a diversas condiciones con el fin de determinar un proceso que permita la extracción del aceite con la eficiencia máxima posible. Se recomienda que se combine un sistema de prensado-lixiviación.
- Hacer pruebas que sustenten la utilización del aceite de semilla de hule como fuente de bio-combustible.
- Evaluar métodos alternativos para la producción de un aislado de proteína de semilla de hule, bien sea, precipitación con calor a con otros solutos: cloruro de sodio, cloruro de amonio, etc.
- Probar el proceso de precipitación isoelectrica empleando como precipitante ácido sulfúrico, probar relaciones harina entre solvente por debajo del 5% siempre y cuando mantengan principios económicos y finalmente, ajustar el tiempo de extracción a un valor intermedio entre 30 a 60 minutos.
- Para el dimensionamiento a gran escala se recomienda utilizar un reactor con agitación por lotes, de acero inoxidable. Respecto a la tubería que deberá emplearse en el proceso industrial esta tendrá que ser de polipropileno para que resista la acción de bases y ácidos.
- Hacer un análisis de distribución de partículas para establecer las características microscópicas de las partículas de proteína y con ello seleccionar adecuadamente el equipo de separación: filtración y centrifugación.
- Complementar la información nutricional del aislado con datos de digestibilidad proteínica, establecer el perfil de aminoácidos esenciales del aislado, puntaje de aminoácidos y otras pruebas que logren generar un panorama concluyente del valor nutricional de la proteína de semilla de hule. A esta información nutricional se le podría añadir un examen del valor calórico de la proteína en cuestión.
- Realizar una electroforesis SDS-PAGE utilizando marcadores de masa molecular más específicos, acrilamida a un mayor porcentaje y un voltaje más suave por un mayor tiempo de tal forma que estos parámetros permitan una mejor resolución que permita establecer los pesos moleculares de las diferentes proteínas que se hallaron en las cuatro fracciones encontradas.
- Hacer una electroforesis SDS-PAGE a la harina de semilla de hule antes de someterse al proceso de aislado de proteínas y compararla con una realizada en el aislado para establecer si existen proteína que se dañen por el procesamiento.
- Utilizar el aislado en formulaciones de salchichas, bizcochos, buñuelos ya alimentos en los cuales se pudiera utilizar de acuerdo a la funcionalidad hallada para lograr determinar como interactúa en una matriz real de alimento.

- Elaborar el análisis de costos y factibilidad del proceso acá presentado para su explotación industrial.

## VI. Bibliografía

- AOAC Official methods of analysis. 1975. 12 Edición. Washington D. C., Estados Unidos.
- Badui, S. 1999. *Química de los alimentos*. Addison Wesley Logran de México, S.A. de C.V., Tercera edición. México.
- Beauchat, L. R. J. P. Cherry y R. Michael. 1975. *Physicochemical properties of peanut flour as affected by proteolysis*. Journal Agriculture and Food Chemistry. 23: 616-620.
- Bera, M. B. y R. K. Mukherjee. 1989. Solubility, emulsifying and foam properties of rice bran proteins concentrates. Journal of Food Science: 50: 142-145.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Bressani, R., J. E. Braham, J. Zúñiga, L. G. Elías, O. Rosal y T. Ayuso. 1983. *Nutricional value of protein and oil in rubber seed (Hevea brasiliensis)*. Turrialba. 33:61-66.
- Bressani, R., M. Selle, E. González de Mejía, y L. G. Elías. 1983. *Evaluación de algunas características químico-nutricionales de la semilla del árbol de hule (Hevea brasiliensis)*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 33: 884-901.
- Dahlstrom, D., R. Bennett, R. Emmett, P. Harriot, T. Laros, W. Leung, S. Miller, B. Moorey, J. Oldshue, G. Priday, C. Silverblatt, J. Stephen, J. C. Smith y D. Todd. 1999. *Liquid-solid operations and equipment. Perry's chemical engineering manual*. Cap. 18. R. Perry y G. G. Green. McGraw-Hill Companies, Inc. 7ma edición. Estados Unidos.
- Damodaran, S. 1996. *Aminoácidos, péptidos y proteínas*. Capítulo 6. O. R. Fennema (Director y editor). Editorial Acribia, S.A. 3era edición. Zaragoza, España.
- Damodaran, S. 1996. *Functional properties*. Food Proteins: Properties and characterization. Cap. 4. S. Nakai y H. W. Moller (Editores). VCH Publishers, Inc., Estados Unidos.
- Department of Food Science and Human Nutrition, Iowa State University. 2000. Food Chemistry Laboratory Manual. Práctica: *Protein Functionality*.

- Food Agriculture Organization of United Nations, FAO. 1996. Codex Alimentarius, Volumen 7, *Norma CODEX STAN 174-1989: Norma General del Codex para los Productos Proteínicos Vegetales (PPV)*. Roma, Italia.
- Fetuga, B. L., A. Olaniyan, G. M. Babantude, M.A. Balogun V. A. Oyenuga y T. O. Ayeni. 1977. *Biological evaluation of Para rubber seeds (Hevea brasiliensis)*. Nutrition Reports International. 15:497-510.
- Giok, L.T., Husaini, Samsudin y Tarwotjo. 1967. *Nutritional value of rubber-seed protein*. The American Journal of Clinical Nutrition. 20: 1300-1303.
- Harwalkar, R. y A. Kilara. 1996. *Denaturation*. Food Proteins: Properties and characterization. Cap. 3. S. Nakai y H. W. Moller (Editores). VCH Publishers, Inc., Estados Unidos.
- Hermansson, A. M. 1979. *Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins*. Journal of American Chemists' Oil Society. 56: 272-278.
- Hoare, M., D. J. Bell y P. Dunill. 1983. *Process design for the recovery of food proteins by precipitation and centrifugation*. Engineering and Food: Engineering Sciences in the Food Industry, Vol. 1, Cap. 14. McKenna, B. (Editor). Elsevier Applied Science Publishers, Estados Unidos.
- Huffman, V. L., C. K. Lee y E. F. Burns. 1975. *Selected functional properties of sunflower meal (Helianthus annuus)*. Food Science. 40: 70-74.
- Hurrel, R. F., P. Lehman y K. J. Carpenter. 1979. *Reactive lysine in foodstuffs as measure by rapid dye-binding procedure*. Journal of Food Science. 44:1221-1231.
- Li Chan, E. 1996. *Separation and purification*. Food Proteins: Properties and characterization. Cap. 9. S. Nakai y H. W. Moller (Editores). VCH Publishers, Inc., Estados Unidos
- Linden, G. y D. Lorient. 1994. Bioquímica Agroindustrial, revalorización alimentaria de la producción agrícola. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Lottman, G. 1981. *Extracción y caracterización del aceite de semilla de hule (Hevea brasiliensis)*. Tesis de la Universidad del Valle de Guatemala, Departamento de Química. Guatemala.
- McCabe, W., J. Smith. y P. Harriot. 1999. *Operaciones unitarias en ingeniería química*. Editorial McGraw Hill, Interamericana, 4ta edición. México.
- Ohren, J. A. 1981. *Process and product characteristics for soya concentrates and isolates*. Journal of American Chemists' Oil Society. 58: 333-335.

- Okezie, B. y A. B. Bello. 1993. *Physicochemical and functional properties of winged beans, a review*. C.R.C. Critical reviews in food science and nutrition. 2:227-234.
- Pomeranz, Y. 1991. *Functional properties of food components*. Academic Press, Inc. 2da edición, Estados Unidos.
- Rao, A., A. P. Ericson, H. E. Shallo y R. L. Thomas. 2002. *Characterization of soy protein concentrate produced by membrane ultrafiltration*. Journal of food science. 67: 1412-1417.
- Rivas, N., E. Dench y J. C. Caygill. 1981. Nitrogen extractability of sesame (*Sesamun indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. Journal of Science of Food and Agriculture. 32: 565-571.
- Samayoa, J. 1998. Caracterización fisicoquímica y propiedades funcionales de la harina desgrasada y la proteína de la semilla de hule (*Hevea brasiliensis*). Tesis de la Universidad del Valle de Guatemala, Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos. Guatemala.
- Selle, M. 1982. *Evaluación Química y Nutricional de la almendra de semilla de hule (Hevea brasiliensis)*. Tesis de la Universidad del Valle de Guatemala, Departamento de Química. Guatemala.
- Shamlou, P., S. Stavrinides y M. Hoare. 1993. Effects of engineering parameters on the precipitation, recovery and purification of proteins. Processing of solid-liquid suspensions. Cap. 5. P. Ayazi Shamlou (Editor). Butterworth Heinemann, Estados Unidos.
- Skoog, D., D. West y F. Holler. 1999. *Química analítica*. Editorial McGraw Hill Interamericana, 6ta edición. México.
- Sovanno, P. P Samkol, J. Ly y T. R. Preston. 2002. *Digestibility studies in growing pigs fed diets based on full-fat rubber seeds or soya beans supplemented with water spinach*. Livestock research for rural development 14. Recuperado de internet el 25 de septiembre de 2003: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd14/6/ly146b.htm>
- Vásquez, N. 2004. Obtención de proteína aislada de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Jamapa: evaluación química, fisicoquímica y funcional. Tesis del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Vaitilingom G. y A. Liennard. 1997. *Various vegetables oils as fuel for diesel and burners: J. curcas particularities*. Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*. Gübitz, G., M. Mittelbach y M. Trabi (Editores).Dbv-Verlag für Technische Universität Graz, Austria.

Yada, R., R. Jackman, J. Smith y A. Marangoni. 1996. *Análisis: quantitation and physical characterization*. Food Proteins: Properties and characterization. Cap. 7. S. Nakai y H. W. Moller (Editores). VCH Publishers, Inc., Estados Unidos.

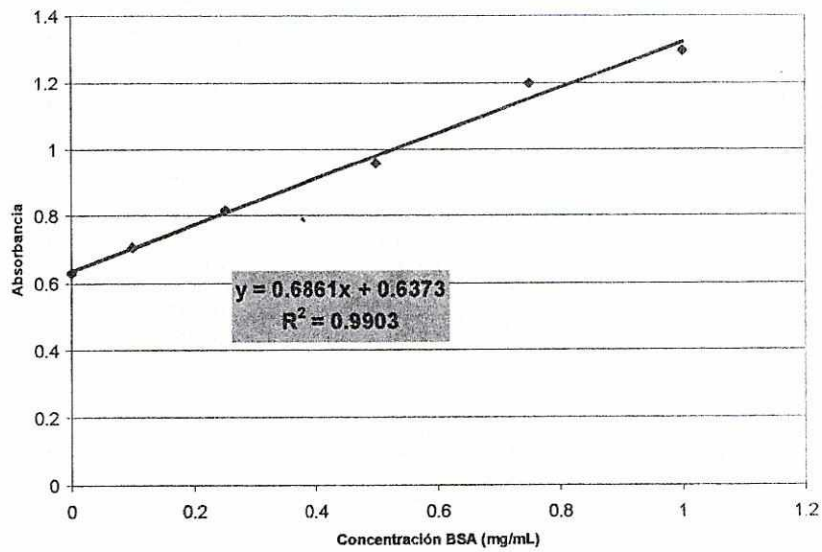
Yasamatsu, K. et al. 1992. *Whipping and emulsifying properties of soy bean products*. Journal of agriculture and biological chemistry. 36 (4): 719-728.

2003. "Censo Agronómico del año 2002, del Sector de Caucho Natural de Guatemala". Gremial de Huleros de Guatemala.

## VII. Apéndice

### A. Gráficos, tablas y cálculos

Gráfico No. 13. Curva de Calibración con Seroalbúmina Bovina (BSA) para la determinación de los factores óptimos de extracción de la proteína se semilla de hule, mediante método de Bradford



Cálculo realizado para evaluar las diferencias significativas entre la extracción de la proteína de semilla de hule en una relación harina entre solvente al 5%, durante 60 min, variando las temperaturas: a 25 °C y 40 °C

Tabla No. 10. Porcentaje de proteína de semilla de hule extraída a 25 °C y 40 °C

% de proteína extraída	
@ 25 °C	@ 40 °C
80.61	80.61
67.11	80.61
67.11	80.61

Se determinaron los promedios de los valores dados en la Tabla No. 10.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Ecuación No. 5. Media aritmética

Para comparar las dos medias por el "t" student se plantearon las siguientes hipótesis.

*Ho: El porcentaje de proteína de semilla de hule extraída con una relación harina entre solvente al 5%, extraída durante una hora y a 25 °C no es diferente del porcentaje de proteína extraída por una hora, en relación harina entre solvente al 5% a 40 °C con una significancia al 95% (corresponden a la misma población).*

*Ha: El porcentaje de proteína de semilla de hule extraída con una relación harina entre solvente al 5%, extraída durante una hora y a 25 °C sí es diferente del porcentaje de proteína extraída por una hora, en relación harina entre solvente al 5% a 40 °C con una significancia al 95% (no corresponden a la misma población).*

El test t de student se aplicó de acuerdo a la siguiente relación:

$$x_1 - x_2 = \pm t_{s_{ponderada}} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$$

Ecuación No. 6. Expresión para la evaluación de diferencias entre dos poblaciones, mediante el test "t" de student.

El valor de t se determinó de Tablas para  $N_1 + N_2 - 2 = 4$  grados de libertad,  $t_{95\%} = 2.78$ . Las  $N_i$  son el tamaño equivalente de cada población (3) y las  $x_i$  corresponden a las medias para la extracción a 25 °C ( $T_{25}$ ) y a 40 °C ( $T_{40}$ ). Se determinó la desviación estándar ponderada ( $s_{ponderada}$ )

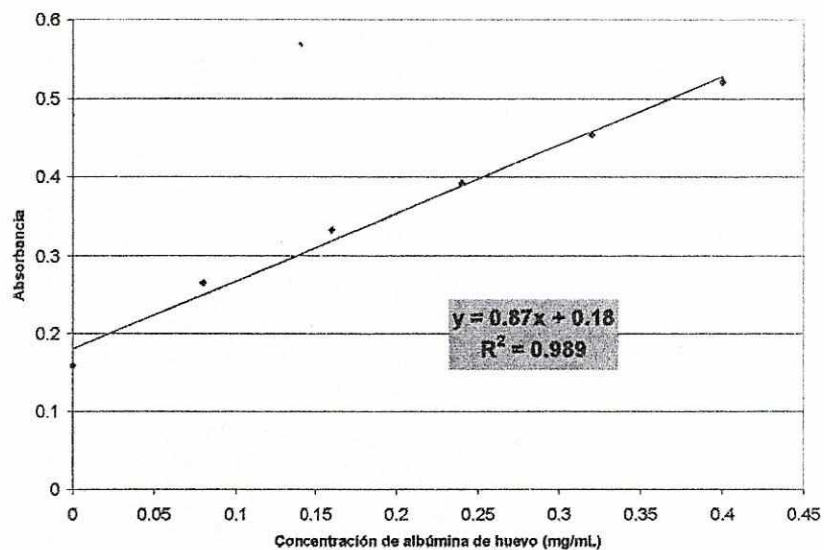
$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (T_{25} - \bar{T}_{25})^2 + \sum_{i=1}^3 (T_{40} - \bar{T}_{40})^2}{N_1 + N_2 - N_s}}$$

Ecuación No. 7. Desviación estándar ponderada<sup>3</sup>

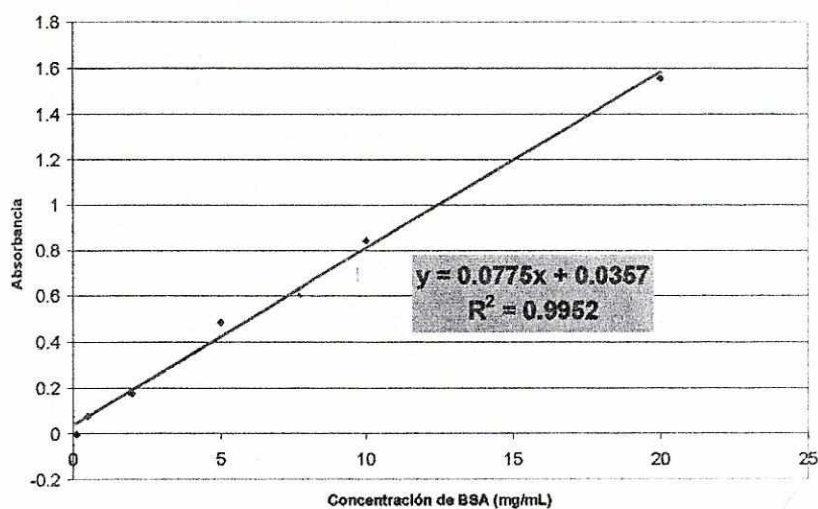
<sup>3</sup> En la Ecuación 7, el  $N_s$  corresponde al número de series de datos utilizadas en el análisis (2)

El valor  $x_1-x_2$  de la Ecuación No. 6 (lado izquierdo de la expresión) corresponde a  $x_1-x_2 = \pm 9.00$ , mientras que el valor calculado con la Ecuación No. 6 (lado izquierdo de la Ecuación) para  $t$ ,  $S_{ponderada}$  y la relación de las poblaciones es  $\pm 12.51$ . Por lo tanto, se concluyó que la hipótesis nula ( $H_0$ ) era válida y por ende no existe diferencia significativa al 95% entre las dos poblaciones, por lo tanto, no influye el extraer la proteína bien sea a 25 °C o a 40 °C durante el proceso.

**Gráfico No. 14. Curva de calibración con albúmina de huevo para la evaluación del efecto del calor y el pH en la solubilidad e hidratación del aislado de proteína de semilla de hule, mediante método de Bradford**



**Gráfico No. 15. Curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) por método de Bradford, para la determinación de las concentraciones de aislado de semilla de hule a utilizar en electroforésis SDS-PAGE**



**Gráfico No. 16. Curva de calibración con colorante naranja 12 para la determinación de lisina reactiva en el aislado de proteína de semilla de hule**

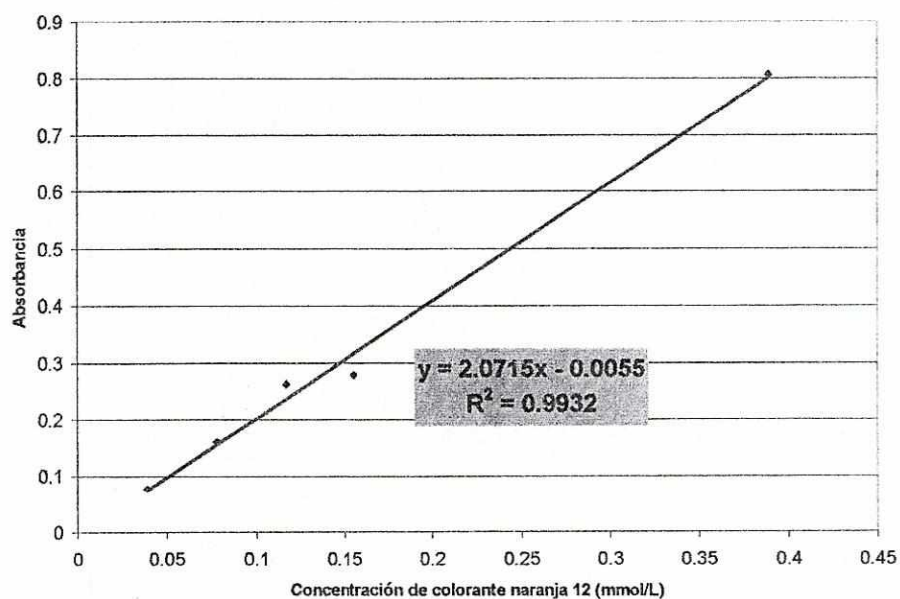


Gráfico No. 17. ¿Qué pudo haber sucedido de utilizar distintas relaciones harina entre solvente?... un modelo de acercamiento

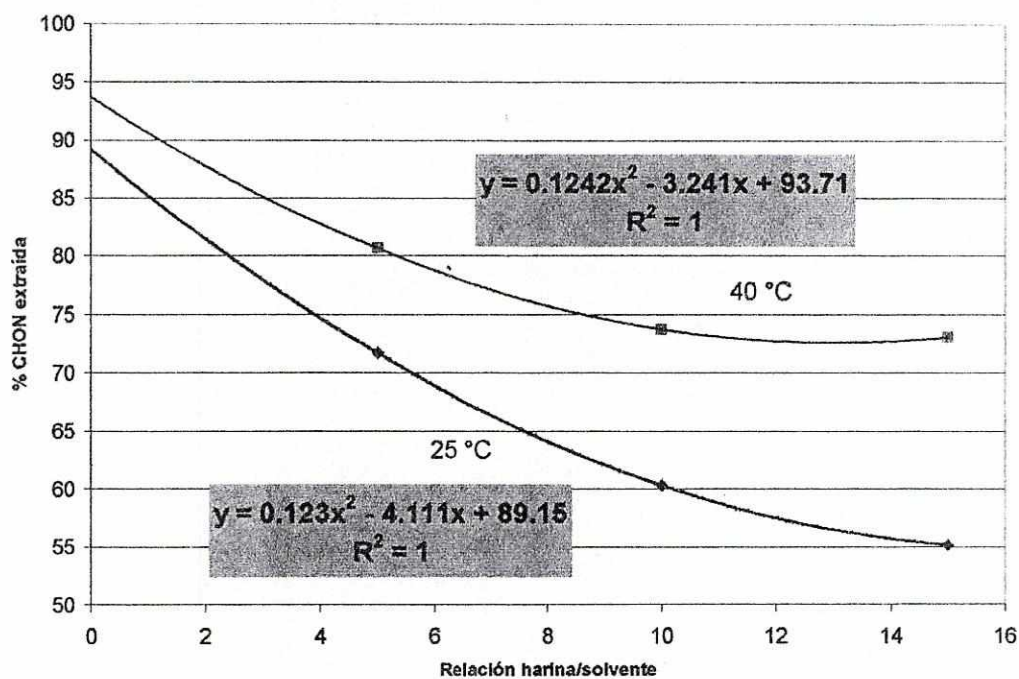


Tabla No. 11. Valores de proteína extraídos en porcentaje predichos por los modelos de regresión del Gráfico No. 13

Relación harina entre solvente	Porcentaje de proteína extraída	
	25 °C	40 °C
15	55.16	73.04
10	60.34	73.72
5	71.67	80.61
4	74.67	82.73
3	77.92	85.10
2	81.42	87.72
1	85.16	90.59

## B. Normas Adjuntas

### CODEX STAN 174-1989

#### **Norma General del Codex para los Productos Proteínicos Vegetales (PPV)**

##### **1. Ámbito de Aplicación**

La presente norma se aplica a los productos proteínicos vegetales (PPV, por sus siglas) destinados a utilizarse en alimentos y que se preparan mediante diversos procesos de separación y extracción de proteínas unicelulares. Los PPV se fabrican para utilizarlos en alimentos que requieren ulterior preparación, y en la industria de elaboración de alimentos. La presente norma no se aplica a ningún producto proteínico vegetal regulado por una determinada norma del Codex para productos en la que se haya establecido un nombre específico.

##### **2. Descripción**

Los PPV a que se aplica esta norma son productos alimenticios obtenidos de materias vegetales mediante la reducción o eliminación de algunos de los principales constituyentes no proteínicos (agua, aceite, almidón, otros carbohidratos), de manera que se obtiene un contenido en proteína ( $N \times 6,25$ ) del 40 por ciento o más. El contenido de proteínas se calcula sobre la base del peso en seco, con exclusión de vitaminas y minerales añadidos.

##### **3. Factores Esenciales de Composición y Calidad y Nutricionales**

###### **1.1 Materias primas**

Semillas limpias, en buen estado, maduras, secas, y esencialmente exentas de materias extrañas de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación, o PPV de menor contenido proteínico pero que satisfagan las especificaciones contenidas en esta norma.

## **3.2 Composición**

Los PPV se ajustarán a los requisitos de composición que se indican a continuación salvo en lo que respecta a determinados requisitos, que podrán variar en tipos específicos de PPV.

### **3.2.1 Contenido de humedad**

El contenido de humedad será suficientemente bajo como para asegurar la estabilidad microbiológica de conformidad con las condiciones de almacenamiento recomendadas.

### **3.2.2 Proteínas crudas (N × 6,25)**

No deberán ser menos del 40 por ciento sobre la base del peso en seco, excluidas las vitaminas, minerales, aminoácidos y aditivos alimentarios.

### **3.2.3 Ceniza**

La cantidad de ceniza que se obtenga mediante incineración no deberá exceder del 10 por ciento referido al peso en seco.

### **3.2.4 Grasa**

El contenido de grasa residual deberá ser compatible con las buenas prácticas de fabricación.

### **3.2.5 Fibra cruda**

Cuando se trata de productos no regulados por una norma específica para el producto, el contenido de fibra cruda no deberá exceder del 10 por ciento referido al peso en seco.

### **3.3 Ingredientes facultativos**

- Carbohidratos, incluidos los azúcares
- grasas y aceites comestibles
- otros productos proteínicos
- vitaminas y minerales
- sal
- hierbas aromáticas y especias.

### **3.4 Factores nutricionales**

La elaboración deberá controlarse cuidadosamente y ser suficientemente minuciosa para garantizar un aroma y sabor agradable óptimos, así como para controlar factores antinutricionales tales como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, glucosinolatos, etc., de acuerdo con el uso a que se destinan. Cuando sea necesario controlar la actividad de los inhibidores de tripsina en un alimento, se deberá definir el máximo nivel permisible tomando como base el estado del producto terminado. Algunos PPV se elaboran en condiciones de baja temperatura para evitar la pérdida de solubilidad proteínica o de actividad enzimática. Estos PPV para fines especiales deberán ser analizados para estimar el valor nutritivo de las proteínas después de someterlos a un tratamiento térmico apropiado. La elaboración no debe ser tan intensa que menoscabe notablemente el valor nutritivo.

## **4. Aditivos Alimentarios**

Durante la manufactura de los PPV se podrán utilizar las siguientes clases de coadyuvantes de elaboración, según aparecen registrados en el inventario consultivo de la Comisión del Codex Alimentarius:

- Reguladores de la acidez
- Agentes antiespumantes

- Agentes solidificantes
- Preparaciones de enzima
- Disolventes para extracción
- Agentes antiestáticos
- Agentes para el tratamiento de harinas
- Agentes para el control de la viscosidad

## **5. Contaminantes**

Los PPV no deberán contener metales pesados en cantidades que puedan representar un peligro para la salud.

## **6. Higiene**

Se recomienda que los productos regulados por las disposiciones de esta Norma se preparen de conformidad con las secciones pertinentes del Código Internacional Recomendado de Prácticas de Higiene - Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 2 (1985), Volumen 1 del Codex Alimentarius).

En la medida compatible con las buenas prácticas de fabricación, el producto deberá estar exento de materias objetables.

Cuando se analice el producto con métodos adecuados de muestreo y examen, dicho producto:

- deberá estar exento de microorganismos en cantidades que puedan representar un peligro para la salud;
- no deberá contener sustancias que procedan de microorganismos en cantidades que puedan representar un peligro para la salud;
- no deberá contener otras sustancias tóxicas en cantidades que puedan representar un peligro para la salud.

## **7. Envasado**

Los PPV se envasarán en recipientes higiénicos apropiados que mantengan el producto en condiciones higiénicas y al abrigo de la humedad durante su almacenamiento y transporte.

## **8. Etiquetado**

Además de las disposiciones de la Norma General para el Etiquetado de Alimentos Preenvasados (CODEX STAN 1-1985 (Rev. 1-1991), Volumen 1 del Codex Alimentarius), se aplicarán las siguientes disposiciones específicas:

### **8.1 Nombre del alimento**

El nombre del alimento a declararse en la etiqueta deberá ser: "Producto proteínico de ...", llenando el espacio en blanco con el nombre de la fuente específica de las proteínas vegetales, v. gr. maní, semilla de algodón, colza.

El contenido proteínico del PPV deberá declararse por referencia al peso en seco.

El nombre podrá incluir un término que describa con precisión la forma física del producto, v. gr. "gránulos" o "fragmentos".

Cuando se someta el PPV a un proceso de texturización, el nombre del producto podrá incluir un calificativo apropiado, como "texturizado" o "estructurado".

### **8.2 Lista de ingredientes**

En la etiqueta se declarará la lista completa de los ingredientes en orden decreciente de proporciones, excepto que, cuando se hayan añadido vitaminas y minerales, estos ingredientes se indicarán como grupos separados de vitaminas y minerales, respectivamente, sin que dentro de tales grupos sea necesaria su enumeración en orden decreciente de proporciones.

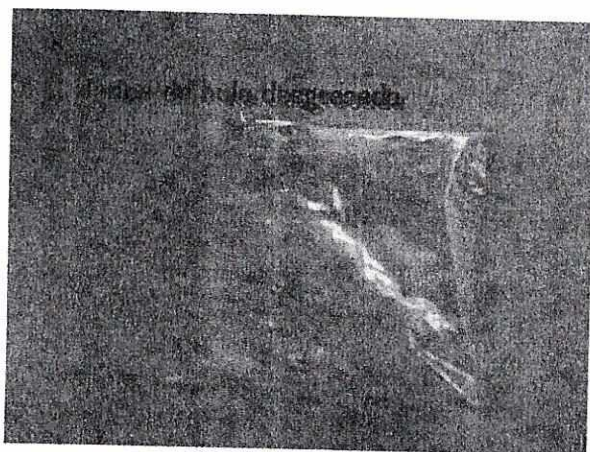
### **8.3 Etiquetado de envases no destinados a la venta al por menor**

La información sobre los envases no destinados a la venta al por menor figurará o bien en los envases o en los documentos que los acompañan, salvo que el nombre del producto, el marcado de la fecha y las instrucciones para la conservación, la identificación del lote y el nombre y la dirección del fabricante o del envasador deberán aparecer en el envase. No obstante, la identificación del lote y el nombre y la dirección del fabricante o del envasador podrán ser sustituidos por una señal de identificación, siempre que tal señal sea claramente identificable con los documentos que lo acompañen.

#### **9. Métodos de Muestreo y Análisis**

Véase Volumen 13 del Codex.

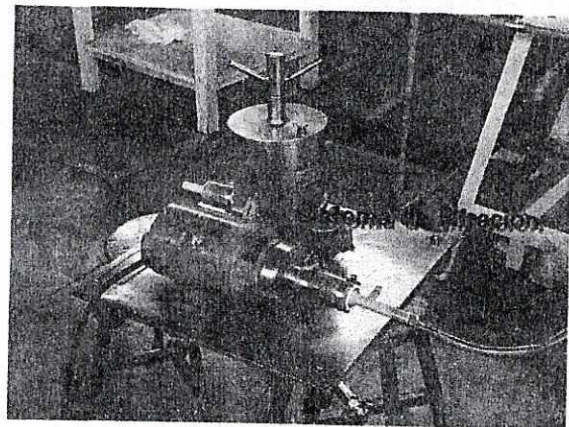
### C. El proceso en fotos



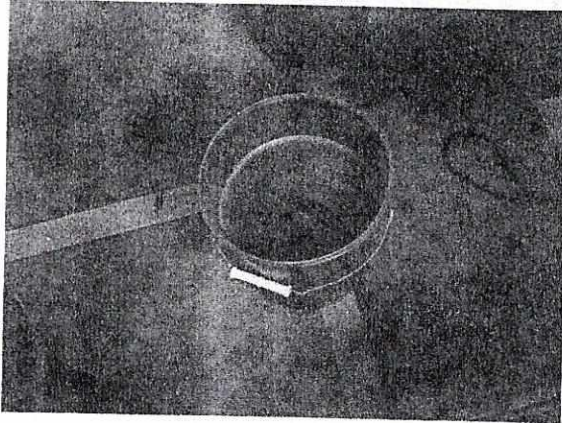
Harina de hule  
desgrasada



Sistema montado  
para la extracción,  
harina + NaOH

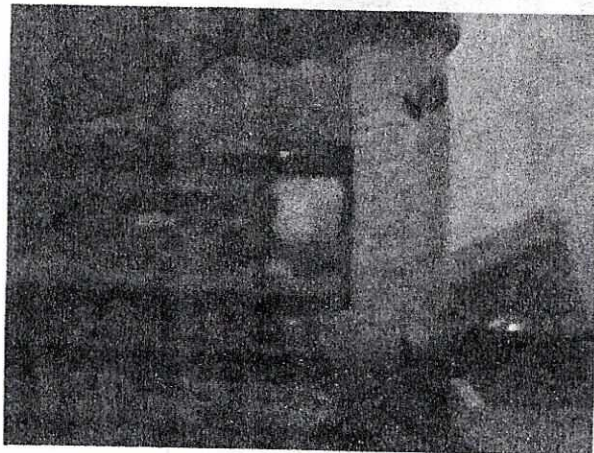
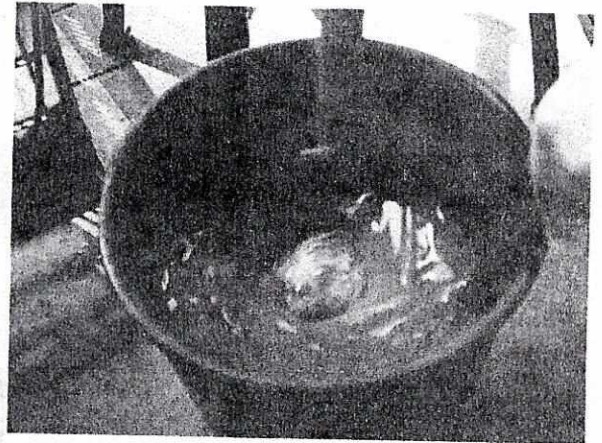


Filtración para la  
recuperación de la harina  
re-utilizada en la segunda  
extracción



Extracto proteínico a pH básico

Precipitación isoelectrica



Adición de etanol



ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	May 2004													
					3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	Preparación del aislado proteico	03/05/2004	07/05/2004	5d	[Barra de progreso]													
2	Análisis para la sedimentación del aislado proteico	10/05/2004	14/05/2004	5d	[Barra de progreso]													

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	May 2004													
					17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	Análisis para la separación del aislado proteico	17/05/2004	21/05/2004	5d	[Barra de progreso]													
2	Separación del aislado proteico	24/05/2004	28/05/2004	5d	[Barra de progreso]													

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	Jun 2004										
					31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Separación del aislado proteico	31/05/2004	04/06/2004	5d	[Barra de progreso]										
2	Secado del aislado proteico	07/06/2004	11/06/2004	5d	[Barra de progreso]										

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	Jun 2004										
					14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Molienda y preparación del aislado proteico	14/06/2004	18/06/2004	5d	[Barra de progreso]										
2	Análisis proximal del aislado proteico	21/06/2004	25/06/2004	5d	[Barra de progreso]										

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	Jun 2004			Jul 2004								
					28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Evaluación de propiedades funcionales	28/06/2004	02/07/2004	5d	[Barra de progreso]											
2	Preparación electroforesis SDS-PAGE	05/07/2004	09/07/2004	5d	[Barra de progreso]											

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	Jul 2004									
					12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Electroforesis SDS-PAGE	12/07/2004	16/07/2004	5d	[Barra de progreso]									
2	Revisión de resultados	19/07/2004	23/07/2004	5d	[Barra de progreso]									

ID	Tarea	Inicio	Fin	Duración	Jul 2004						Aug 2004					
					26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6
1	Redacción de informe final	26/07/2004	30/07/2004	5d	████████████████████											
2	Redacción de informe final	02/08/2004	06/08/2004	5d							████████████████████					