

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES CON ÉNFASIS EN GESTIÓN AMBIENTAL

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR EN *Moringa oleifera* A
NIVEL DE LABORATORIO
TESIS DE GRADO

MARIO ALEJANDRO ALVAREZ SALAS
CARNET 11947-13

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2017
CAMPUS CENTRAL

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES CON ÉNFASIS EN GESTIÓN AMBIENTAL

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR EN *Moringa oleifera* A
NIVEL DE LABORATORIO
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR
MARIO ALEJANDRO ALVAREZ SALAS

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2017
CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.

VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO

VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS

SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

DECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ

SECRETARIO: MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN
ING. WALTHER DAVID MAYÉN CABRERA

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN
MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN
ING. LUIS FELIPE CALDERON BRAN

ING. PAMELA ANDREA ELIZABETH CAMARERO BARREDA DE QUIÑONEZ

Guatemala, 20 de noviembre del 2018

Honorable Consejo de
La Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Presente.

Distinguidos Miembros del Consejo:

Por este medio hago constar que he asesorado el trabajo de graduación del estudiante Mario Alejandro Alvarez Salas, carné 11947-13, "OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR EN *Moringa oleífera* A NIVEL DE LABORATORIO" El cual considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad, previo a su autorización de impresión.



Atentamente,

Ing. Walther David Mayen Cabrera

Colegiado No. 7653



Universidad
Rafael Landívar
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

No. 06846-2017

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante MARIO ALEJANDRO ALVAREZ SALAS, Carnet 11947-13 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES CON ÉNFASIS EN GESTIÓN AMBIENTAL, del Campus Central, que consta en el Acta No. 06205-2017 de fecha 20 de noviembre de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR EN *Moringa oleifera* A NIVEL DE LABORATORIO

Previo a conferírsele el título de INGENIERO AMBIENTAL en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 27 días del mes de noviembre del año 2017.



MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA, SECRETARIO
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
Universidad Rafael Landívar

AGRADECIMIENTOS

A:

Mis Padres, por su apoyo constante e incondicional.

Karen, por toda su ayuda y cariño.

La FCAA, por todas las oportunidades brindadas.

Mi Asesor, por su guía.

DEDICATORIA

Al desarrollo sostenible de Guatemala, y todos los que trabajan por él.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 CULTIVO DE LA MORINGA OLEÍFERA.....	2
2.2 LAS PROTEÍNAS COMO PARTE DE LA DIETA Y CONSTITUYENTE CELULAR.....	3
2.3 SOSTENIBILIDAD DEL CONSUMO DE PROTEÍNA VEGETAL	4
2.4 EXTRACCION DE PROTEÍNAS DE FUENTES VEGETALES	5
2.4.1 Obtención de concentrado mediante extracción en medio con pH controlado	6
2.4.2 Obtención de concentrado mediante extracción en medio con temperatura constante	7
2.5 PRECIPITACIÓN Y SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA EXTRAÍDA	7
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 OBJETIVO GENERAL	10
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
5. HIPÓTESIS	11
6. METODOLOGÍA.....	12
6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO.....	12
6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL.....	12
6.3 FACTORES A ESTUDIAR	12
Con ácido clorhídrico (HCl) al 18%	12
Térmico	12
Virabalin	12
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
6.6 MODELO ESTADÍSTICO	13
6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL.....	13
6.9 MANEJO DEL EXPERIMENTO	15
6.9.1 Preparación.....	15
6.9.2 Extracción	15
6.9.3 Precipitación	16
6.9.4 Determinación de la humedad	17

6.10 VARIABLES DE RESPUESTA.....	17
6.10.1 Determinación de la cantidad de proteína extraída.....	17
6.10.2 Determinación del Rendimiento	17
6.11 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	18
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
7.1 CANTIDAD DE PROTEÍNA OBTENIDA	19
7.2 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.....	24
10. BIBLIOGRAFÍA.....	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de la moringa	2
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos	12
Cuadro 3: Media, Rendimiento y Desviación Estándar de los 6 métodos de obtención de concentrado protéico foliar.....	19
Cuadro 4: Análisis de Varianza de las hipótesis formuladas	20
Cuadro 5: Prueba de DGC (diferencia estadística) para los métodos de extracción.....	21
Cuadro 6: Prueba DGC (diferencia estadística) para los métodos de precipitación	21
Cuadro 7: Comparativa entre métodos con extracción isoelectrica y control de pH, con métodos con calentamiento, y mixtos	23
Cuadro 8. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con Calor.....	33
Cuadro 9. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con Calor.....	33
Cuadro 10. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con HCL 10%	34
Cuadro 11. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con HCL 10%	34
Cuadro 12. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con método mixto de Virabalin	35
Cuadro 13. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con método mixto de Virabalin.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción de Lang.....	14
Figura 2. Extracción de García.....	14
Figura 3. Diagrama experimental	15
Figura 4. Rendimiento según método de extracción y precipitación.....	24
Figura 5. Informe de Análisis 1403-17.....	32
Figura 6. División de la hoja molida de moringa en 10 unidades de 50 g cada una.....	36
Figura 7. Molido de la moringa en licuadora, dependiendo del método en una solución alcalina o en agua destilada a 0°C. Monitoreo de ph/temperatura cada 3 minutos.	37
Figura 8. Transvasado del molido a un beaker de 600 ml.....	38
Figura 9. Filtrado del molido a través de una tela de algodón, para la obtención de un jugo protéico	39
Figura 10. Obtención del jugo protéico, dependiendo del método, será acidificado o calentado.	40
Figura 11. Agitación de las muestras a 1000 rpm , para virabalin y pres. térmica, también calentamiento durante 5 min a 84°C	41
Figura 12. Filtrado del coagulado	42
Figura 13. Numeración de las muestras, y transferencia a un crisol para su secado....	43
Figura 14. Pesaje	44

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR EN *Moringa oleífera* A NIVEL DE LABORATORIO

RESUMEN

El presente trabajo desarrolló un método de extracción de proteína foliar de moringa (*Moringa oleífera*) para la fabricación de un concentrado, a nivel de laboratorio. El procedimiento propuesto parte de métodos ya elaborados para otras plantas, entre los que demostraron ser más viables y sostenibles los métodos con control de pH, alteración y control de la temperatura, y sus combinaciones. Se diseñaron 6 combinaciones de procesos de extracción y precipitación de proteína, combinando un método de extracción mediante lisis y uno de precipitación de la proteína extraída mediante calentamiento, acidificación mediante HCL, o una combinación de ambos. Mostraron un mejor resultado los métodos con lisis en pH alcalino y coagulación mediante desnaturalización en medio ácido, dando una media de 6.13 gramos, mientras que un método de extracción y desnaturalización solo mediante control de la temperatura logró un rendimiento de 5.11 gramos. Por lo que se propone un método en donde se haga una lisis mediante licuado en solución extractora a pH 10.5 y una precipitación mediante disminución del pH a 4, y calentamiento para mejorar el proceso de filtrado.

1. INTRODUCCIÓN

La *Moringa oleífera*, conocida por el nombre común de moringa, es una planta de extraordinarias cualidades. Es de rápido crecimiento, y un alto valor nutricional. Sin embargo, a pesar de sus cualidades, no había despertado -hasta ahora- el interés por estudiar y extraer sus nutrientes para el aprovechamiento humano y animal.

Diversos autores citan las excepcionales propiedades nutricionales de la *Moringa oleífera* (Olson, Sankaran, Fahey, Odee & Nouman 2016) mencionan además que se han estimado altos niveles de proteína en sus hojas, y, en comparación con otras plantas, una diversidad importante de aminoácidos, así como de macro y micro nutrientes.

Uno de los problemas importantes en cuanto a la dieta basada principalmente en fuentes vegetales, es la abundancia de carbohidratos, pero la falta de aminoácidos esenciales, sobre todo en el maíz (Diamond, 1999), esto supone un reto adicional para la alimentación en países cuyo sustento depende de éste, y donde la malnutrición es un problema endémico, como en el caso de Guatemala, y en muchos otros países.

Las proteínas son biomoléculas estructurales y esenciales para las células en todos los seres vivos, y se requiere una ingesta de manera regular y variada, para el buen funcionamiento de los organismos animales. Los humanos, al igual que los otros animales, no son capaces de producir toda la gama de aminoácidos requerida para su funcionamiento, y en este caso, la moringa provee la variedad suficiente, como para ser considerada un suplemento nutricional adecuado (Olson *et al*, 2016).

Dada la riqueza nutritiva de las hojas de moringa, es importante, elaborar un método de extracción de proteínas de moringa efectivo, con el que se pueda obtener rendimientos económicamente viables lo que a su vez podría incrementar el interés de agricultores para su siembra, y abaratar el precio de suplementos alimenticios.

No se ha encontrado un método estandarizado de extracción de proteína de moringa, ni adaptado al ámbito nacional. Por lo que se pretende evaluar diferentes procedimientos e identificar y proponer un método estándar para la extracción, que presente los mejores rendimientos de proteína procedentes de los folíolos de la moringa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CULTIVO DE LA MORINGA OLEÍFERA

La moringa (*Moringa oleífera Lam*) es una planta originaria del norte de la India, cuyo cultivo ha ido en aumento en las regiones tropicales. En Guatemala, la siembra extensiva es reciente, y está creciendo rápidamente en Chimaltenango y en regiones de la costa sur (Folkard y Sutherland, 1996; Durán, 2013).

Esta planta pertenece a la familia de las moringáceas, que comprende a otras 13 especies (ver cuadro 1). La moringa oleífera, es caducifolia, y presenta un rápido crecimiento. Dependiendo de las condiciones puede llegar a crecer más de 4 metros anuales hasta su edad adulta. La moringa puede propagarse por medio de semillas, o por la vía asexual, utilizando estacas, teniendo la peculiaridad que es resistente y crece bien aún en condiciones áridas y semiáridas (Price, 2007; Folkard y Sutherland, 1996).

Cuadro 1. Taxonomía de la moringa (Lamarck, 1783)

Taxonomía
Reino: Plantae
Orden: Brassicales
Familia: Moringaceae
Género: <i>Moringa</i>
Especie: <i>M. oleífera</i>

En general, requiere poca atención hortícola. La planta, crece de manera óptima en tierras bajas tropicales, con temperaturas entre los 25 y 35°C, precipitación baja a moderada de manera esporádica, y suelos con buen drenaje (de Saint Sauveur y Broin, 2010; Olson *et al*, 2016). Debido a su facilidad de manejo, y a su valor nutricional, la moringa está utilizada extensamente como cultivo de subsistencia (Olson *et al*, 2016).

Se utiliza también como forraje, como fuente de grasa vegetal, para aceites, combustibles y jabones, gracias a la materia grasa en su semilla, y, actualmente se estudia su uso como coagulante en el tratamiento de aguas (Folkard y Sutherland, 1996).

Todas las partes de la moringa, tango las hojas, como las semillas, raíces y flores, son aprovechables en las dietas humanas y animales (Leone, Spada, Schiraldi, Aristil, y Bertoli, 2016).

En el caso de las hojas, tienen una alta concentración de materia orgánica seca, de hasta el 25%, mientras la mayoría de plantas no superan el 10%. Por ello, cuentan con más del doble de la cantidad de nutrientes que otras hojas, lo cual es comparable con el amaranto y la casaba (de Saint Sauveur y Broin, 2010). En cuanto a proteínas, diversos autores estiman, que el contenido de proteína foliar de la moringa comprende de 25 a 28 gramos, por cada 100 gramos de hoja seca (Olson *et al*, 2016).

2.2 LAS PROTEÍNAS COMO PARTE DE LA DIETA Y CONSTITUYENTE CELULAR

Las proteínas representan al menos 50% del peso seco de todas las células, pues son biomoléculas esenciales, y constituyentes celulares de todos los organismos, que desempeñan una gran diversidad de funciones, desde estructurales, hasta tareas de regulación metabólica, de transporte de nutrientes, e incluso de defensa ante amenazas externas al organismo (McKee y McKee, 2009).

Es posible dividir cada proteína en fracciones más pequeñas. En realidad, éstas son polímeros conformados por distintos aminoácidos, conformados en diferentes combinaciones y estructuras.

Los aminoácidos son moléculas orgánicas compuestas por un grupo amino, y un grupo carboxilo, y se conocen miles de combinaciones posibles, aunque únicamente 22 son los que se agrupan para formar proteínas (Bischoff y Schlüter, 2012).

La secuencia, el número, y la estructura que forman los aminoácidos, son los elementos que diferencian a los péptidos entre sí, y que les otorgan funciones diferentes. Un polipéptido, con peso molecular mayor a 10 000 D es regularmente llamado proteína, sin embargo, frecuentemente en la literatura son utilizados como equivalentes (McKee y McKee, 2009).

Si bien, las proteínas son necesarias para el funcionamiento celular, el organismo humano no es capaz de sintetizar todos sus aminoácidos, por lo que ha de ingerirlos directamente (Beyer, Bickel, Gropengiesser, Kluge, Knauer, Kronberg, 2005).

Para el ser humano, se requiere de la ingesta de 9 aminoácidos esenciales: La fenilalanina, la valina, treonina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, lisina e histidina. En la moringa cultivada en Guatemala, se ha comprobado la presencia de al menos 8 aminoácidos esenciales en las hojas (Sanchinelli, 2004).

En la dieta humana, es necesaria una ingesta regular de aminoácidos esenciales. Regularmente, éstos se encuentran en la leche, los huevos y la carne. Es importante mencionar, que éstas fuentes son caras, comparadas con fuente no animales. Sin embargo, combinaciones de productos vegetales pueden proveer los aminoácidos restantes. Por ejemplo, la combinación de frijol negro y arroz, provee los 9 aminoácidos necesarios en cantidad suficiente. En el caso de la moringa, todos los aminoácidos, a excepción de la lisina, se encuentran en cantidades muy superiores al de la combinación ya mencionada (Sanchinelli, 2004).

2.3 SOSTENIBILIDAD DEL CONSUMO DE PROTEÍNA VEGETAL

Es importante la reducción de la alimentación proveniente de fuentes animales, en favor de alimentos de origen vegetal, pues no solo requiere de menos inversión, sino son regularmente más sostenibles que los productos pecuarios. La alimentación a base de plantas requiere 800% menos energía fósil que una con un fuerte componente animal (Savon y Idania, 1999).

La dieta primordialmente vegetariana por necesidad, que tiene como base el maíz, como en el caso de Guatemala y México, ha sido objeto de refuerzos nutricionales por parte de diversos programas para reducir la malnutrición, pues el maíz es naturalmente deficiente en lisina y triptófano (Diamond, 1999; Pérez y Bertsch, 2016).

Algunos programas de harinas enriquecidas con concentrados proteicos, han sido útiles en el mejoramiento de la calidad de vida de poblaciones humanas en precariedad. Una de las técnicas de enriquecimiento más utilizada, es el reforzamiento nutricional con concentrado proteico (Carrasco-Quintero, 2013; Pérez y Bertsch, 2016).

Los concentrados proteínicos son el resultado del procesamiento de alimentos tanto animales, como vegetales, ricos en proteínas, a los cuales se les reduce y elimina, por diversas técnicas físicas y químicas, el resto de constituyentes no peptídicos, como la humedad, los lípidos, los carbohidratos y fibras, dejando únicamente un desecado rico en proteína (Vioque, Sánchez-Vioque, Pedroche, 2001).

Es posible la obtención de concentrados de proteína foliar, con gran eficiencia y sostenibilidad. Una hectárea produce hasta tres veces más proteína foliar, que la que obtendría de estar cultivada con granos, y hasta diez veces más del rendimiento que obtendría si sostuviera ganado (Bifani, 1999).

2.4 EXTRACCION DE PROTEÍNAS DE FUENTES VEGETALES

Para realizar la extracción de la proteína de los folíolos, se han desarrollado varios métodos, que toman en cuenta las dos fuentes de proteína en las hojas: las presentes en el citoplasma, y las que proveen los cloroplastos (García y Sánchez-Rojas, 1984).

Un método optimizado para la extracción de proteína foliar en plantas tropicales, menciona, que son candidatas para una extracción, aquellas plantas con alto contenido de materia seca y proteína, además de un buen potencial de regeneración. Criterios que se cumplen en el caso de la *Moringa oleífera* (Telek, 1978; Olson, *et al*, 2016).

En general, los métodos investigados coinciden en los pasos que deben seguirse, variando únicamente en las técnicas. La literatura coincide, en que primero debe llevarse a cabo un método de ruptura celular, para separar la proteína citoplasmática. Los métodos más utilizados son la homogenización mecánica, ultrasónica, a presión, osmótica y por tratamiento térmico (García y Sánchez-Rojas, 1984). Cualquiera de estos métodos comienza siempre por la ruptura celular y la destrucción de los tejidos por procedimientos químicos o físicos, o bien, una combinación de éstos.

La proteína del cloroplasto, requiere, además, un tratamiento con un extractante, que puede ser una solución con enzimas, soluciones acuosas, o solventes orgánicos, que deben proveer un medio isotónico con respecto al del cloroplasto, para que éste no se dañe (Martínez-Maqueda, Hernández-Ledesma, Amigo, Miralles, Gómez-Ruiz, 2013).

La literatura sugiere, que los métodos de homogenización mecánica si bien son los más sencillos, son también los más eficientes en extracción de proteína foliar, pues las paredes celulares requieren éste tipo de métodos violentos para romperse y liberar su contenido (van het Hof, 2000). Puede haber una combinación entre métodos químicos y físicos, como la realización de disrupción con algún método físico como molienda o presión, en una solución con un reactivo extractante.

Asimismo, dependiendo de la finalidad del extracto protéico, será el buffer y el método de extracción a utilizar. En el caso de un proceso para la obtención de un concentrado protéico para el consumo humano, es importante no utilizar reactivos tóxicos o procedimientos fuera de las prácticas adecuadas para la alimentación humana. (Vioque, Sánchez-Vioque, & Pedroche, 2001)

Los métodos mecánicos se dan en medio acuoso, y en pH generalmente alcalino, para evitar una desnaturalización prematura, que impida que la proteína sea soluble en el agua. La literatura recomienda una proporción 10 a 1, respecto al medio de extracción líquida, y la muestra vegetal cuya proteína se pretende extraer (Laing & Christefeller, 2004).

2.4.1 Obtención de concentrado mediante extracción en medio con pH controlado

García y Sánchez-Rojas (1984), sugieren un método en donde la proteína foliar sea extraída cuantitativamente al medio extractante, sufriendo el menor deterioro posible. Ellos proponen un método de extracción en el cual se toma en cuenta el pH, como factor determinante para la lisis protéica. Ambas fracciones proteicas, tanto la citoplasmática como la cloroplástica, se extraen utilizando soluciones tampón, al pH 8,5 y al 7,8, respectivamente. Este método se optimizó para hojas de *Citrus limonia*. Para la moringa, se ha recomendado que el pH de extracción sea tan alto como 10,5 en ambas fases, para una mejor extracción de la proteína. (Quintana & Alvarado, 2013)

2.4.2 Obtención de concentrado mediante extracción en medio con temperatura constante

Telek, (1984), ofrece un método de extracción optimizado para especies tropicales. Las hojas frescas, son extraídas con el doble de cantidad de agua a 1°C, en un extractor eléctrico durante 10 minutos. La fase líquida es separada de la fase sólida pasando el extracto por tela de algodón. Ésta extracción se da en un ambiente de temperatura controlada, sin tener que recurrir a soluciones buffer alcalinas, así se evita la utilización de potenciales contaminantes del agua. Debe monitorearse que la temperatura del agua no sobrepase los 4°C para evitar así, una prematura desnaturalización de la proteína.

2.5 PRECIPITACIÓN Y SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA EXTRAÍDA

Posterior a la extracción, nombrada anteriormente, debe realizarse un método de precipitación de la proteína extraída. Para realizar esto, se han desarrollado distintos métodos de extracción acuosa y con solventes orgánicos, para precipitar la proteína acumulada en el líquido extraído (Martínez-Maqueda *et al.* 2013).

Recientemente, y debido a la preocupación del uso de solventes orgánicos y su efecto dañino en el medio ambiente, sobre todo en las aguas superficiales, el uso de éstos está en declive en favor a métodos de extracción acuosa. (Tan, Mailer, Blanchard, Agboola, 2011).

Se ha demostrado la efectividad de los métodos de extracción acuosa, basados en el método de Osborne (Osborne, 1924). Las principales proteínas vegetales, las globulinas albúminas y proteosomas, son solubles en agua, y precipitan cuando alcanzan su punto isoeléctrico, el cual depende de cada proteína en cada especie. El medio acuoso en el que se encuentren, puede ser acidificado, para alcanzar su punto isoeléctrico, y de ésta manera desnaturalizar y precipitar la proteína.

El punto isoeléctrico es el pH, al cual un poliantófito – una molécula muy grande- como por ejemplo una proteína tiene carga cero. Esto se da cuando los iones de hidrógeno sueltos, se combinan con la estructura protéica, dando lugar a cambios en la estructura protéica que conllevan a su precipitación, debido a que pierden solubilidad.

El calentamiento, además, provoca cambios en la estructura proteínica, que causa también la desnaturalización y la posterior precipitación de las proteínas (McKee & McKee, 2009).

Para llegar al punto isoeléctrico y obtener un coagulado proteínico de grado alimenticio, es necesario utilizar un ácido, no tóxico, que acidifique la solución a pH 4, a cuya acidez casi todas las proteínas presentes habrán precipitado (Martínez-Maqueda *et al*, 2013) o bien, puede calentarse el líquido extraído hasta los 84°C, lo que provocará igualmente la formación de un coágulo de proteína (Telek, 1978).

Según Virabalin *et al* (1993) el zumo obtenido de la extracción, y ya filtrado se centrifuga a 1465 G durante 3 minutos, y se elimina la fracción transparente. El método requiere que el jugo obtenido se acidifique a pH 4.0 y se caliente a 82°C durante 5 minutos.

En ambos casos, el concentrado proteínico foliar, es el resultado del precipitado luego de haber sido secado. Para realizar el secado, Telek (1978) y otros autores, concuerdan en el secado introduciendo la muestra en un horno especial de laboratorio a 50-60°C para eliminar el exceso de humedad, durante un máximo de 24 horas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La desnutrición humana es un flagelo que está presente en la mayoría de localidades de Guatemala; y aunque se han realizado esfuerzos gubernamentales y por otras entidades humanitarias, los logros han sido poco relevantes. Por ello, es necesaria la fortificación de la dieta nacional, ya que esta se basa primordialmente en el consumo de maíz, el cual no provee de todos los aminoácidos necesarios para el funcionamiento corporal adecuado. Una de las alternativas para la fortificación de las harinas de maíz, es la adición de concentrado proteínico de *Moringa oleífera* (Diamond, 1999).

En esta propuesta de investigación, se pretenden evaluar diversos métodos de extracción de proteínas foliares de Planta *Moringa Oleífera Lam*, ya que no existe un método estandarizado de extracción en dicha planta, por lo que se busca evaluar la efectividad de distintos procedimientos de extracción en tejidos vegetales, con el fin de proponer un método estándar para la extracción a nivel laboratorio. El presente trabajo buscará desarrollar un método a partir de los métodos existentes mencionados ya en el marco teórico, dependiendo de los resultados que se obtengan con el desarrollo experimental, las observaciones realizadas, y el grado de viabilidad experimental y ambiental, por lo cual se hizo una preselección de los métodos cuyos reactivos y desechos no fueran nocivos para el medio ambiente.

La planta *Moringa Oleífera* fue seleccionada para esta investigación, ya que se cuenta con antecedentes de que es un vegetal que contiene características importantes como: altas concentraciones de aminoácidos y proteínas, pocos cuidados y gran capacidad de regeneración, lo cual hace que pueda considerarse como una alternativa para mejorar la nutrición de la población afectada, que se da en el marco de una coyuntura nacional, en pro de la seguridad alimentaria. Debe tomarse en cuenta, que la seguridad alimentaria y el bienestar humano, también es una responsabilidad a tomar dentro de las ciencias ambientales.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar métodos de extracción de proteína foliar de *Moringa oleífera*, a nivel de laboratorio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer y comparar la cantidad de proteína obtenida por cada método de extracción y precipitación de proteína foliar.
- Comparar el efecto de los métodos de extracción y precipitación en el rendimiento de los mismos.
- Proponer un método standard para la extracción de proteína de hoja de moringa.

5. HIPÓTESIS

HA:

Al menos un método de extracción de proteína tendrá una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de proteína obtenida y el rendimiento del proceso.

Al menos un método de precipitación de proteína tendrá una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de proteína obtenida y el rendimiento del proceso

Existe una interacción entre al menos un método de extracción junto con al menos un método de precipitación sobre la cantidad de proteína y el rendimiento de extracción.

6. METODOLOGÍA

6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO

El desarrollo experimental se llevó a cabo en los laboratorios de química de la Universidad Rafael Landívar, Campus Central.

6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

La materia prima para los experimentos, es la hoja madura de *Moringa oleífera*, secada al sol y molida, que proviene de la costa sur guatemalteca, del departamento de Escuintla. La variedad de la moringa es PK M1, proveniente de plantas adultas.

6.3 FACTORES A ESTUDIAR

Se estudiaron dos factores: El primero de ellos (A), corresponde a tres distintos métodos de extracción de proteínas de hoja de *Moringa oleífera*, y, el segundo factor (B), corresponde a dos métodos de precipitación protéica

6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Método de Extracción	Método de Precipitación
1	Laing	
2	García	Con ácido clorhídrico (HCl) al 18%
3	Laing	
4	García	Térmico
5	Laing	
6	García	Virabalin

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Debido a que la experimentación se llevó a cabo dentro de un laboratorio, las condiciones fueron homogéneas durante esta fase. Por lo tanto, se utilizó un diseño completamente al azar, con repeticiones en el tiempo.

Se realizaron diez réplicas de cada tratamiento, una por una, durante la fase de experimentación del presente estudio.

6.6 MODELO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza, bifactorial. Se hicieron diez réplicas. El modelo incluye seis tratamientos que son: los dos métodos de extracción y sub-tratamientos que corresponden a los tres métodos de precipitación, y sus posibles interacciones.

$$Y_{ij} = M + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = variable respuesta en la ij -ésimo experimento

M = media general

A_i = efecto del i -ésimo método de extracción

B_j = efecto del j -ésimo método de precipitación

AB_{ij} = efecto de la interacción entre el i -ésimo método de extracción y el j -ésimo método de precipitación

E_{ij} = error experimental en la ij -ésima unidad experimental

6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL

Las unidades experimentales fueron recipientes con 50 gramos de hoja de *Moringa oleífera* seca, a los cuales se les aplicó los tratamientos ya descritos.

6.8 DIAGRAMA EXPERIMENTAL

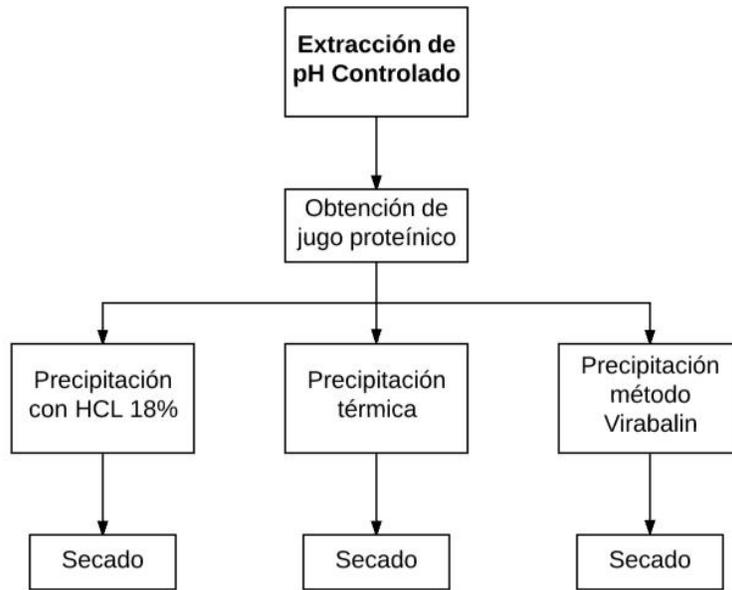


Figura 1. Extracción de Lang (elaboración propia)

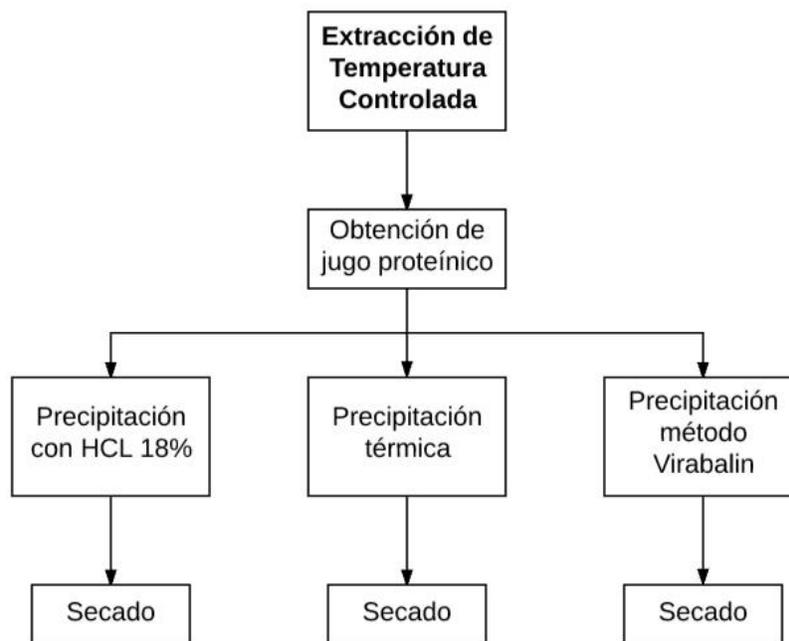


Figura 2. Extracción de García (elaboración propia)

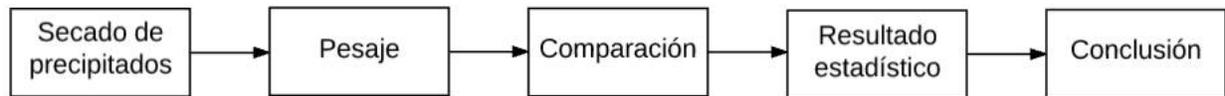


Figura 3. Diagrama experimental (elaboración propia)

6.9 MANEJO DEL EXPERIMENTO

6.9.1 Preparación

Se prepararon las muestras de moringa en las unidades experimentales. La moringa seca se pesó, y dividió en unidades individuales de 50 g.

6.9.2 Extracción

a) Extracción con pH Controlado

- **Extracción:** Se licua la proteína durante 10 minutos en una licuadora, con 10 veces la cantidad de solución extractora. Es decir, 50 gramos de harina de moringa, serán licuados con 500 ml solución a pH 10.5
- La solución a utilizar consta de 500 ml de solución de tampón TBE, llevado con NaOH a un pH de 10.5.
- **Filtrado:** A partir de la extracción, se obtiene un líquido espeso resultante, que debe ser filtrado a través de una tela de algodón, hacia un beaker de 500 cc. El líquido producto del filtrado es sometido posteriormente a un proceso de precipitación.

b) Extracción con temperatura controlada

- **Extracción:** Se licuan, 50 gramos de harina de moringa, con 500 ml de agua destilada entre los 0°C y los 4°C. Para ello, debe agregarse primero 300 mililitros de agua a 0°C, y cada tres minutos de licuado, agregar 100 ml más de agua a 0°C, para mantener baja la temperatura. El licuado debe ser pausado cada 90 segundos para verificar que la temperatura no haya sobrepasado los 4°C como producto de la fricción generada por las aspas de la licuadora.
- **Filtrado:** El líquido resultante se filtra a través de una tela de algodón a un hacia un beaker de 500 cc, el líquido ya filtrado será sometido posteriormente a un proceso de precipitación.

6.9.3 Precipitación

a) Precipitación por desnaturalización en medio ácido a pH 4

Al líquido obtenido de los procesos de extracción se le agrega ácido clorhídrico (HCL) al 18%, hasta alcanzar un pH de 4. Ensayar, con tiras de papel tornasol. A un pH de 4, las proteínas presentes se desnaturalizan, perdiendo su solubilidad, y precipitan. El precipitado es filtrado mediante un filtro de café, y secado durante 24 horas a 60°C, con lo que se obtiene un concentrado proteínico a baja humedad. (Laing & Christefeller, 2004)

b) Precipitación por desnaturalización en medio a 84°C

El líquido obtenido de los procesos de extracción es calentado, en baño maría, hasta que alcance los 55°C, luego se monitorea el precipitado, y la temperatura. Cuando alcance los 84°C, la mayor parte de la proteína habrá precipitado. El líquido se filtra mediante un filtro de café, y el precipitado se seca durante 24 horas a 60°C, obteniendo así un concentrado proteínico a baja humedad. (Laing & Christefeller, 2004)

c) Precipitación por método de Virabalin

- El líquido filtrado, obtenido de la extracción. Se centrifuga a 1465 G durante 3 minutos, y se elimina la fracción transparente.
- Posteriormente, se acidifica a pH 4.0 y se calienta a 82°C durante 5 minutos.

6.9.4 Determinación de la humedad

Para determinar la humedad contenida, se secarán durante 24 horas adicionales las muestras de concentrado proteico ya secadas, a una temperatura de 60°C. Realizando un pesaje nuevamente, y asumiendo la humedad como la diferencia del peso entre los pesajes previo y posterior al segundo secado.

6.10 VARIABLES DE RESPUESTA

6.10.1 Determinación de la cantidad de proteína extraída

Las variables de respuesta principales a analizar son: la cantidad de proteína, expresada en la cantidad bruta extraída como efecto de cada método. Para determinar la cantidad bruta extraída se realiza un pesaje de la cantidad coagulada retenida en el filtro, posterior a las 24 horas de secado, restando la tara realizada del filtro.

La sumatoria de la cantidad de proteína extraída en cada corrida, dividido por la cantidad de corridas realizadas, fue la forma de calcular la media de cada método.

6.10.2 Determinación del Rendimiento

Para determinar el rendimiento, se hace un análisis de la cantidad de proteína cruda en la muestra de harina de *Moringa Oleífera* a ser analizada, en el laboratorio especializado CONCALIDAD en las Instalaciones de la Universidad Rafael Landívar. El resultado obtenido de proteína cruda, se compara con el concentrado proteico foliar extraído y precipitado según los distintos métodos, según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Concentrado proteico obtenido}}{\text{Cantidad de proteína cruda de la muestra}} * 100$$

6.11 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los datos se analizaron de manera estadística, utilizando el programa Infostat para Windows. Para la comprobación de la validez de las hipótesis, se utilizaron análisis estadísticos de Varianza (ANOVA), y una prueba DGC, para determinar las diferencias entre tratamientos, y cuál es el mejor tratamiento. Se utilizó la prueba DGC por tener menos ambigüedad que otras equivalentes.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se efectuaron 60 experimentos independientes en total, en el transcurso de 3 meses, divididos en 10 corridas para cada uno de los 6 métodos probados. Posteriormente éstos fueron analizados para obtener el peso del concentrado protéico foliar, y, del rendimiento total.

7.1 CANTIDAD DE PROTEÍNA OBTENIDA

Se obtuvo además el rendimiento promedio de cada corrida y la desviación estándar, que demuestra la uniformidad de los datos. El rendimiento se obtuvo mediante la determinación de la cantidad total de proteína en la moringa utilizada para efectuar los métodos de extracción (Ver anexo 1), en donde se determinó que la planta utilizada cuenta con 30.06% de proteína cruda.

Cuadro 3: Media, Rendimiento y Desviación Estándar de los 6 métodos de obtención de concentrado protéico foliar

Tipo de tratamiento		Media de cantidad extraída (en g)	Rendimiento	SD
Laing	Extracción	4.79	32%	0.48
García	Térmica	5.90	39%	0.87
Laing	Extracción pH	5.05	34%	0.56
García		6.42	43%	0.72
Laing	Extracción	5.70	38%	0.77
García	Virabalín	6.52	43%	0.45

En el cuadro tres puede observarse la media, desviación estándar y el rendimiento de cada uno de los 6 métodos probados de obtención de concentrado protéico foliar. Puede verse que cada tratamiento ha mostrado diferencias en sus medias, y su rendimiento en extraer la proteína cruda, que también varía de método a método. Para comprobar la premisa, de que un método dará un mejor resultado que los otros, se analizó estadísticamente los datos para comprobar o desmentir su validez.

Los datos superaron los criterios de normalidad, mediante una prueba de Shapiro-Wilks, y muestran desviaciones estándar en un rango aceptable. (Cooper, 1997). Sin embargo, es importante mencionar que el Coeficiente de Variación fue relativamente alto, para un procedimiento de laboratorio; la razón atribuible, es que los procedimientos utilizados, no son puramente instrumentales, sino llevan un paso que requiere la extracción del líquido sea mediante una tela de algodón con presión a mano, lo cual conlleva un grado alto de variabilidad en el proceso, siendo éste un modo no uniforme de extraer el líquido, pero es el que sugiere la literatura.

Habiendo comprobado las premisas estadísticas necesarias para el posterior análisis de datos, se prosiguió a hacer una comprobación de la hipótesis de que existe interacción entre métodos de extracción y precipitación, habiéndose comprobado mediante un análisis de la interacción entre métodos en el programa InfoStat, obteniendo un p-valor para la hipótesis de 0.44, rechazando ésta y comprobando, que en efecto no hay interacción entre los métodos de extracción y de precipitación, y que pueden combinarse para obtener los resultados deseados.

Posteriormente se analizaron los resultados de los 6 métodos diferentes mediante un análisis de varianza, y una prueba de comparación de medias. Tanto para el ANOVA como para la prueba de medias se utilizó el programa InfoStat, para la segunda se utilizó el método de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC), por ser una prueba con menor ambigüedad que otros análisis de medias.

Cuadro 4: Análisis de Varianza de las hipótesis formuladas

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	24.60	5	4.92	11.32	<0.0001
Mextraccio	18.03	1	18.03	41.48	<0.0001
Mprecipita	5.85	2	2.92	6.73	0.0025
Mex*Mpre	0.72	2	0.36	0.83	0.4403
Error	23.47	54	0.43		
<u>Total</u>	<u>48.07</u>	<u>59</u>			

Cuadro 5: Prueba de DGC (diferencia estadística) para los métodos de extracción

Método de extracción	Resultado prueba DGC	Medias (g)
Laing	A	5.18
García	B	6.28

Cuadro 6: Prueba DGC (diferencia estadística) para los métodos de precipitación

Método de precipitación	Resultado prueba DGC	Medias (g)
Temperatura controlada	A	5.34
pH controlado	B	5.73
Virabalín	B	6.11

La prueba DGC para análisis de métodos de extracción y precipitación comprueba los resultados observados, en cuanto al rendimiento mayor del método de pH controlado (García), tanto en la fase de extracción como en la fase de precipitación y obtención del concentrado de proteína foliar. La acidificación del pH, como método de precipitación isoeléctrico, muestra en otros estudios antecedentes mejores resultados que la termocoagulación (Cortez & Gallardo, 2005) aunque las combinaciones de termocoagulación y precipitación por acidificación (Virabalin), utilizando la centrifugación como un paso previo para separar las fases también es un método que demuestra rendimientos significativos (Virabalin, Kositup, & Punnapayak, 1993).

La prueba DGC comprueba la mayor efectividad de la extracción con pH controlado (García), y la coagulación por método isoeléctrico. Sin embargo, no existe evidencia estadística para comprobar diferencia entre el método por pH y el método combinatorio como lo es el de Virabalín.

Los resultados positivos de la extracción mediante solución a pH 10.5, coinciden con los obtenidos por Ferri (2006), en donde sus investigaciones en cuanto a extracción de proteínas de hoja de Yuca, mostraron mejores resultados si eran solubilizadas en soluciones de pH alcalino.

Sanchinelli, (2004) y Laing & Christenfeller (2004) coinciden en que una temperatura entre los 0°C y los 4°C es útil en promover la solubilidad de las proteínas, y previene una desnaturalización prematura de las mismas debido al calor que genera el proceso de licuado, sin embargo, el rendimiento del método sugerido de temperatura controlada es sumamente más trabajoso, debido a la constante interrupción del licuado por la toma de temperatura y la adición de hielo o agua fría, y se obtienen rendimientos significativamente inferiores.

Sin embargo, un método con una solución alcalina con un tampón adecuado, debe ser más efectivo por dos razones: en primer lugar, porque adicional a la disrupción celular por acción mecánica, la acción del hidróxido de sodio será la de la destrucción de la pared celular, y la disrupción de los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, teniendo ésta un doble efecto a la hora de extraer aminoácidos (Osborne, 1924). Esto puede ser comprobado en el presente estudio, siendo el método propuesto por García - pH alcalino- superior al de Laing con agua destilada fría.

El análisis estadístico valora como el método más efectivo a los métodos que tuvieron una coagulación isoelectrica, es decir, que redujeron el jugo extraído a un pH de 4 utilizando solución de ácido clorhídrico al 10%. La mayor efectividad observada de la coagulación por el método isoelectrico sugerido por Laing & Christenfeller, (2004), fue comprobada por el presente trabajo, coincidiendo con Martínez-Maqueda *et al* (2013), quienes mencionan que el pH es el principal factor a tener en cuenta para la correcta desnaturalización protéica, más que la temperatura. Sin embargo, Urribari *et al.* (2004) y otros autores, coinciden en utilizar tanto calentamiento como reducción del pH, tal como sugiere Virabalín *et al* (1993), sin embargo, el presente trabajo no puede determinar que exista una ventaja estadística significativa al utilizar este método mixto en cuanto a la cantidad de proteína extraída.

Cabe mencionar, sin embargo, aunque no se determine diferencia estadística, sí hubo un leve aumento entre el coagulado obtenido mediante extracción bajo temperatura controlada y extracción por Virabalín. El método de obtención mediante Virabalín se encontró replicado varias veces en los antecedentes.

Otra ventaja observada del método de Virabalín durante el presente estudio, es que la reducción del volumen líquido a filtrar fue más sencilla, el filtrado significativamente más rápido, y ningún filtro se tapó, a diferencia del proceso de filtrado con los otros dos procedimientos, en donde los filtros se taparon con frecuencia, y el proceso de obtención del filtrado se alargó durante las noches. Se infiere que debido al proceso de Virabalín, hubo un aumento en la insolubilidad del coagulado, lo que hizo más sencilla su filtración.

Cuadro 7: Comparativa entre métodos con extracción isoelectrica y control de pH, con métodos con calentamiento, y mixtos

Promedio	Media de extracción (en g)
Isoeléctricos	5.73
Térmicos	5.34
Virabalin	6.11

En el cuadro siete puede comprobarse la efectividad de los métodos de control del pH con coagulación isoelectrica, mayor a los que controlan exclusivamente la temperatura, sin embargo, puede verse un leve aumento entre la media de rendimiento cuando se usa extracción con el método mixto de Virabalín.

7.2 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

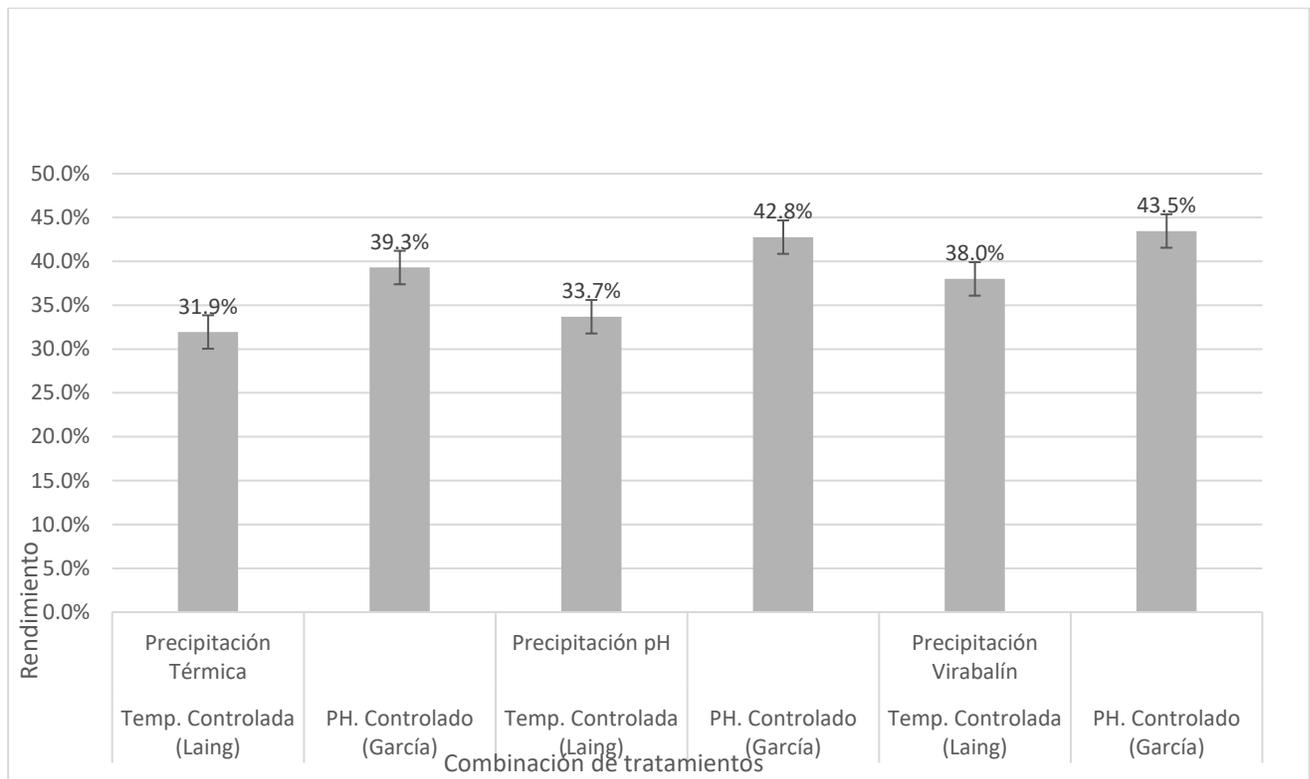


Figura 4. Rendimiento según método de extracción y precipitación (la columna de la izquierda de cada categoría, corresponde al método de Laing, la derecha al de García)

Resulta necesario también comparar entre sí y evaluar, el rendimiento que obtiene cada método. Los métodos que requieren de un paso de coagulación isoeléctrica, que en el presente trabajo son los métodos Laing y García que se les dio extracción isoeléctrica y por Virabalín, mostraron rendimientos notablemente más altos, y, similares a los obtenidos en otros vegetales con los métodos ya desarrollados para los mismos (Cortez & Gallardo, 2005).

El rendimiento óptimo, se da cuando hay una combinación de extracción con control de pH, en medio alcalino, es decir, el método de García, extraído con un método isoeléctrico. Nuevamente se debe resaltar, que, aunque en ambos casos el análisis estadístico no reveló diferencia estadística, el rendimiento obtenido cuando existe extracción mixta (Virabalin) es levemente mayor que cuando solamente se acidifica el medio a pH 4. El

rendimiento bajo esta última combinación fue 0.7% mayor que el método de pH 4 sin calentamiento ni centrifugación, y, cabe resaltar su mayor facilidad y rapidez para filtrar.

Un factor determinante para escoger este método, es precisamente su rendimiento levemente mayor, que si bien en un ambiente de laboratorio pareciera ínfimo, en una producción industrial puede significar una cantidad sustantivamente mayor, que se traduciría en aumento de la ganancia marginal. Por lo tanto, se puede observar como el método ideal a desarrollar el que resulta como combinación de los de García y Virabalín.

Cabe mencionar además, que los 6 métodos presentaron una cantidad de humedad similar, de aproximadamente 12% para cada uno, habiendo diferencias no significativas entre ellos. La cantidad de humedad coincide con lo mencionado por Quintana (2013).

7.3 DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE CONCENTRADO PROTÉICO FOLIAR A NIVEL DE LABORATORIO

Basado en García (1984) y Virabalin (1993)

Según los resultados obtenidos, y las observaciones realizadas en el presente trabajo, se sugiere como método de laboratorio para la moringa oleífera, lo que se detalla a continuación:

a) Homogenización y pesaje de la harina foliar

El primer paso, es la homogenización del lote de harina foliar del cual se quiere obtener el concentrado proteico foliar. El lote luego se divide en muestras homogéneas de 50 o 100 gramos.

b) Preparación de la solución de extracción

Para cada muestra a extraer, son requeridos 500 ml de solución extractora. Para preparar la solución, se utiliza solución buffer PBS al 0.1x y se lleva mediante NaOH 6M a un pH de 10.5

c) Extracción

Con una licuadora de 450W de potencia, se licúa la harina y la solución durante 8-10 minutos, o hasta que quede una solución espesa con textura de puré de papa.

d) Separación

Utilizando una tela de algodón, se filtra el licuado. Se pone un poco de licuado en la tela, y se presiona uniendo los bordes, de tal manera que se extraiga el líquido a un beaker de 600 ml. Se obtendrán de 250 a 350 ml de sobrenadante.

e) Coagulación

El líquido extraído, se lleva hasta un pH de 4.0, utilizando HCL al 10%, se requerirán de 2 a 4 ml. Se observará que una parte coagula y flota.

f) Calentamiento

En una estufa de laboratorio, se calentará el líquido ya coagulado, monitoreando la temperatura, hasta alcanzar los 84°C, donde se observará que la proteína precipita al fondo, y se comprime en un coágulo homogéneo, y el líquido sobrenadante se torna negro.

g) Filtrado

Para separar ambas fases, se utiliza un filtro de poro grande, similar a un filtro de café, montado en un embudo hacia un kitasato. Previa tara del filtro.

h) Secado

Cuando ya no quede líquido visible en el filtro, y el kitasato haya recibido la totalidad del sobrenadante, se separa el filtro, se pesa nuevamente y se hornea a 50°C durante 24 h para eliminar el exceso de humedad.

8. CONCLUSIONES

- Se da una mayor cantidad de extracción proteína cuando se utilizan métodos que modifiquen y controlen el pH, como en el caso de las combinaciones de extracción por el método de García, y precipitación a pH 4 o por método Virabalín.
- Los métodos con extracción mediante pH controlado pudieron dar rendimientos superiores a la extracción sin este control, el método de Garcia-Virabalín, obtuvo un rendimiento levemente mayor, y fue comparativamente más práctica su implementación en laboratorio.
- Se desarrolló, a partir de los métodos existentes para otros cultivos, un método de extracción estándar de proteína de moringa, a nivel de laboratorio.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar la adaptación del método propuesto, en un ámbito industrial.
- Para extracción con fines alimenticios, debe utilizarse buffer PBS en lugar del buffer utilizado TBE. Esto se debe a que el buffer TBE contiene ácido bórico, cuyo uso con fines alimenticios no es aconsejable, por lo se recomienda la utilización de buffer PBS u otros, que no contengan el compuesto en mención.
- Se recomienda investigar la incorporación de una plancha extrusora al procedimiento, que probablemente mejorará el rendimiento de extrusión al momento de extraer el jugo protéico, para homogenizar la extracción.
- Se recomienda investigar la extracción de proteínas de moringa fresca, para comparar el rendimiento de extracción entre la moringa fresca y la harina de moringa seca.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Diamond, J. (1999). *Guns, germs, and steel: The fates of human societies*. Nueva York: Norton.
- Beyer, I., Bickel, H., Gropengiesser, H., Kluge, S., Knauer, B., Kronberg, I., . . . Tischer, W. (2005). *Natura: Biologie für Gymnasien*. Stuttgart: Ernst Klett.
- Bifani, P. (1999). *Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible No. 18*. IEPALA: Buenos Aires.
- Bischoff, R., & Schlüter, H. (2012). amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications . *Journal of proteomics* 75(8), 2275-2296.
- Carranco, M., Castillo, R., Escamilla, A., Martínez, M., Pérez-Gil, F., & Stephan, E. (2002). Composición química, extracción de proteína foliar, y perfil de aminoácidos de siete plantas acuáticas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 36, 247-250.
- Carrasco-Quintero, M., Ortiz-Hernández, L., Roldán-Amaro, J., Chávez-Villasana, A., Aguirre-Arenas, J., & Aguilar-Carrasco, F. (2013). EFECTO DEL CONSUMO DE UNA HARINA DE MAÍZ ENRIQUECIDA CON SOJA EN EL ESTADO DE NUTRICIÓN DE MUJERES INDÍGENAS DE MÉXICO. *Salud Pública* N°3, 293-302.
- Cooper, G. (1997). *Sistemas de Control de Calidad Básico e Intermedio para el Laboratorio Clínico*. Irvine: Bio-Rad Laboratories.
- Cortez, A., & Gallardo, Y. (2005). Obtención de concentrados proteicos a partir de la alfalfa (*Medicago sativa*). *Ponencia del VII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos* (S. 254-263). Guanajuato: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- de Saint Sauveur, A., & Broin, M. (2010). *Growing and processing Moringa leaves*. Gémenos: Horizon.
- Diamond, J. (1999). *Guns, germs, and steel: The fates of human societies*. Nueva York: Norton.
- Durán, O. (19. Noviembre 2013). *Crece la producción de Moringa, la planta milagrosa*. Von Soy 502: <http://www.soy502.com/articulo/crece-produccion-de-la-planta-milagrosa-abgerufen>

- Ferri, P. (2006). *Extração de proteína de folha de mandioca (Manihot esculenta Crantz) para la obtenção de concentrado proteico*. Paraná: Universidade estadual do Oeste de Paraná.
- Folkard, G., & Sutherland, J. (1996). Moringa oleifera un árbol con enormes potencialidades. *Agroforestry Today*, 5-8.
- García, A., & Sánchez-Rojas, J. (1984). *Determinación de proteínas en hojas de Citrus. II. Extracción, fraccionamiento y cuantificación*. Murcia: Universidad, Servicio de Publicaciones.
- Laing, W., & Christefeller, J. (2004). Extraction of Proteins from Plant Tissues. *Current Protocols in Protein Science*, 4.7.1.-4.7.7.
- Lamarck, J. (1783). *Botánica*. París: IPNI.
- Leone, A., Spada, A. B., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2016). Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J. (2013). Extracción/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In F. Toldrá, & L. Nollet, *Proteomics in Foods Principles and Applications* (S. 21-50). Madrid: Springer.
- McKee, T., & McKee, J. (2009). *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Vida*. Ciudad de México: McGraw-Hill.
- Olson, M., Sankaran, R., Fahey, J., Grusak, M., Odee, D., & Nouman, W. (2016). Leaf Protein and Mineral Concentrations across the "Miracle Tree" Genus Moringa. *PLOS|One*, 17.
- Osborne, T. (1924). *The vegetable proteins*. Londres: Green And Co.
- Pérez, A., & Bertsch, A. (12 2016). *Enriquecimiento de harina de maíz precocida con concentrado proteico del suero obtenido por termocoagulación*. Von Researchgate:
https://www.researchgate.net/publication/48221442_Enriquecimiento_de_harina_de_maiz_precocida_con_concentrado_proteico_del_suero_obtenido_por_termocoagulation abgerufen
- Price, M. (2007). *The Moringa Tree*. North Fort Myers, Florida, USA.
- Quintana, J., & Alvarado, A. (2013). *Condiciones para la precipitación de la proteína foliar a partir de la Moringa Oleífera Lam*. Barranquilla: UNAD.
- Sanchinelli, K. (2004). *Contenido de proteína y aminoácidos, y generación de descriptores*. Ciudad de Guatemala: USAC.

- Savon, L., & Idania, S. (5. Mayo 1999). *Producción y utilización de recursos foliares en la alimentación porcina*. Von Ponencia del V encuentro sobre nutrición y Producción de Animales Monogástricos: www.sian.info.ve abgerufen
- Tan, S., Mailer, R., Blanchard, C., & agboola, S. (2011). Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and funcional properties. *J Food Science* 76, R16-R28.
- Telek, L. (1978). Leaf Protein Extraction from tropical Plants. *Science and Education, USDA*, 78-110.
- URRIBARI, I., FERRER, A., & COLINA, A. (2004). Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia* (21), 264-275.
- USDA. (2. 5 2016). *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. Von usda.gov abgerufen
- van het Hof, K. H., de Boer, B. C., Tijburg, L. B., Lucius, B. R., Zijp, I., West, C., & Weststrate, J. (2000). arotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1189-1196.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., & Pedroche, J. (2001). obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y aceites*, 52(2), 127-131.
- Virabalin, R., Kositup, B., & Punnapayak, H. (1993). Leaf Protein Concentrate from Water Hyacinth. *J. Aquat. Plant Management* 31, 207-209.

11. ANEXO

Fecha de Emisión 15/02/2016 del Documento R-PLAB010-001 Rev 01



CONCALIDAD
Laboratorio de Control de Calidad

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIVAR, VISTA HERMOSA III, CAMPUS CENTRAL, EDIFICIO TEC,
PRIMER NIVEL, OFICINA 110, ZONA 16, GUATEMALA, TEL.: 2426-2594

INFORME DE ANÁLISIS 1403-17

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA			
Código de Laboratorio:	PA-1421-17	Empresa	URL-FCAA
Nombre la muestra:	Moringa	Dirección	Vista Hermosa III, Campus Central Zona 16
Lote:	No presenta	Análisis Solicitado:	Proteína
Fecha de Producción:	No presenta	Con atención a:	Mario Alvarez
Fecha de Vencimiento:	No presenta	Fecha de recepción	12/07/2017
Código de Análisis	C10-201	Fecha de Informe	19/07/2017

DATOS DE LA MUESTRA	
Condiciones de la muestra al momento de la recepción:	Se recibe muestra en bolsa plástica, a temperatura ambiente.
Fecha de inicio de análisis	13/07/2017
Fecha de Finalización	14/07/2017

Resultados de Análisis Físicoquímicos

Parámetro	Resultado (%)
Proteína %	30.06
Nitrógeno %	4.81

Abreviaturas: % porcentaje
Metodología: PROTEINAS: <ME-FQ-04-010

Analistas: GR
Vo.Bo: LA

Supervisado por:



Inga. Luisa Arias
Colegiado No. 2360
Gerente de Laboratorio

Laboratorios de Control y Calidad
"CONCALIDAD"
Universidad Rafael Landívar, Vista Hermosa
Tres (III), Campus Central, Edificio TEC,
Primer Nivel, Oficina 110, zona 16,
Guatemala, Guatemala
Tel: (502) 2426-2594

NOTAS:

1. Los resultados de este informe corresponden únicamente a la muestra analizada tal y como fue recibida por Concalidad.
2. Este informe puede ser reproducido únicamente en su totalidad, si desea hacerlo parcialmente, solicite la aprobación por escrito de la gerencia de Concalidad.
3. Este informe es válido únicamente en original.
4. Concalidad no se responsabiliza por el uso que se dé a este informe.

Página 1 de 1

Figura 5. Informe de Análisis 1403-17

Resultados

Cuadro 8. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con Calor

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total de Extracto	Humedad
1	50.g	0.94g	5.7g	4.76	11%
2	50.g	0.89g	6.68g	5.79	11%
3	50.g	0.9g	5.68g	4.78	12%
4	50.g	0.92g	6.g	5.08	12%
5	50.g	0.87g	5.91g	5.04	12%
6	50.g	0.91g	5.73g	4.82	13%
7	50.g	0.87g	5.73g	4.86	12%
8	50.g	0.89g	5.g	4.11	12%
9	50.g	0.92g	5.4g	4.48	12%
10	50.g	0.9g	5.1g	4.20	11%
Promedio				4.79g	
SD				0.478	

Cuadro 9. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con Calor

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total de Extracto	Humedad
1	50.g	0.88g	7.73g	6.85	13%
2	50.g	0.91g	6.12g	5.21	13%
3	50.g	0.81g	6.51g	5.70	12%
4	50.g	0.95g	7.36g	6.41	11%
5	50.g	0.91g	5.36g	4.45	12%
6	50.g	0.9g	5.56g	4.66	13%
7	50.g	0.89g	7.62g	6.73	13%
8	50.g	0.91g	7.07g	6.16	12%
9	50.g	0.88g	7.57g	6.69	12%
10	50.g	0.89g	6.98g	6.09	11%
Promedio				5.9g	
SD				0.865	

Cuadro 10. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con HCL 10%

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total de Extracto	Humedad
1	50.g	0.92g	6.07g	5.15	13%
2	50.g	0.92g	6.49g	5.57	12%
3	50.g	0.91g	5.78g	4.87	12%
4	50.g	0.9g	5.07g	4.17	12%
5	50.g	0.92g	5.95g	5.03	12%
6	50.g	0.88g	6.56g	5.68	12%
7	50.g	0.91g	5.07g	4.16	12%
8	50.g	1.g	6.79g	5.79	12%
9	50.g	0.89g	5.89g	5.00	12%
10	50.g	0.91g	6.02g	5.11	11%
Promedio				5.05g	
SD				0.561	

Cuadro 11. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con HCL 10%

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total de Extracto	Humedad
1	50.g	1.g	8.49g	7.49	12%
2	50.g	0.91g	8.22g	7.31	12%
3	50.g	0.9g	7.16g	6.26	12%
4	50.g	0.81g	6.7g	5.89	13%
5	50.g	0.9g	7.23g	6.33	13%
6	50.g	0.91g	8.21g	7.30	12%
7	50.g	0.88g	6.61g	5.73	12%
8	50.g	0.9g	6.29g	5.39	12%
9	50.g	0.88g	7.33g	6.45	11%
10	50.g	0.92g	6.92g	6.00	12%
Promedio				6.42g	
SD				0.726	

Cuadro 12. Extracción mediante Temperatura controlada y Precipitación con método mixto de Virabalín

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total de Extracto	Humedad
1	50.g	0.9g	8.22g	7.32	11%
2	50.g	0.92g	6.38g	5.46	12%
3	50.g	0.85g	6.12g	5.27	11%
4	50.g	0.9g	7.g	6.10	12%
5	50.g	0.89g	6.19g	5.30	12%
6	50.g	0.87g	6.98g	6.11	12%
7	50.g	0.93g	5.88g	4.95	12%
8	50.g	0.88g	5.57g	4.69	12%
9	50.g	0.92g	6.44g	5.52	12%
10	50.g	0.86g	7.1g	6.24	12%
Promedio				5.7g	
SD				0.765	

Cuadro 13. Extracción mediante solución alcalina y Precipitación con método mixto de Virabalín

No. Muestra	Peso de Muestra	Peso filtro	Peso Seco	Total Extracto	Total
1	50.g	0.92g	7.89g	6.97g	12%
2	50.g	0.88g	6.94g	6.06g	11%
3	50.g	0.91g	8.g	7.09g	12%
4	50.g	0.88g	6.7g	5.82g	12%
5	50.g	0.92g	7.3g	6.38g	12%
6	50.g	0.89g	7.71g	6.82g	12%
7	50.g	0.85g	7.45g	6.6g	12%
8	50.g	0.88g	7.08g	6.2g	12%
9	50.g	0.91g	7.11g	6.2g	12%
10	50.g	0.85g	7.91g	7.06g	12%
Promedio				6.52g	
SD				0.453	

Paso 1



Figura 6. División de la hoja molida de moringa en 10 unidades de 50 g cada una

Paso 2



Figura 7. Molido de la moringa en licuadora, dependiendo del método en una solución alcalina o en agua destilada a 0°C. Monitoreo de pH/temperatura cada 3 minutos.

Paso 3



Figura 8. Transvasado del molido a un beaker de 600 ml

Paso 4



Figura 9. Filtrado del molido a través de una tela de algodón, para la obtención de un jugo protéico

Paso 5

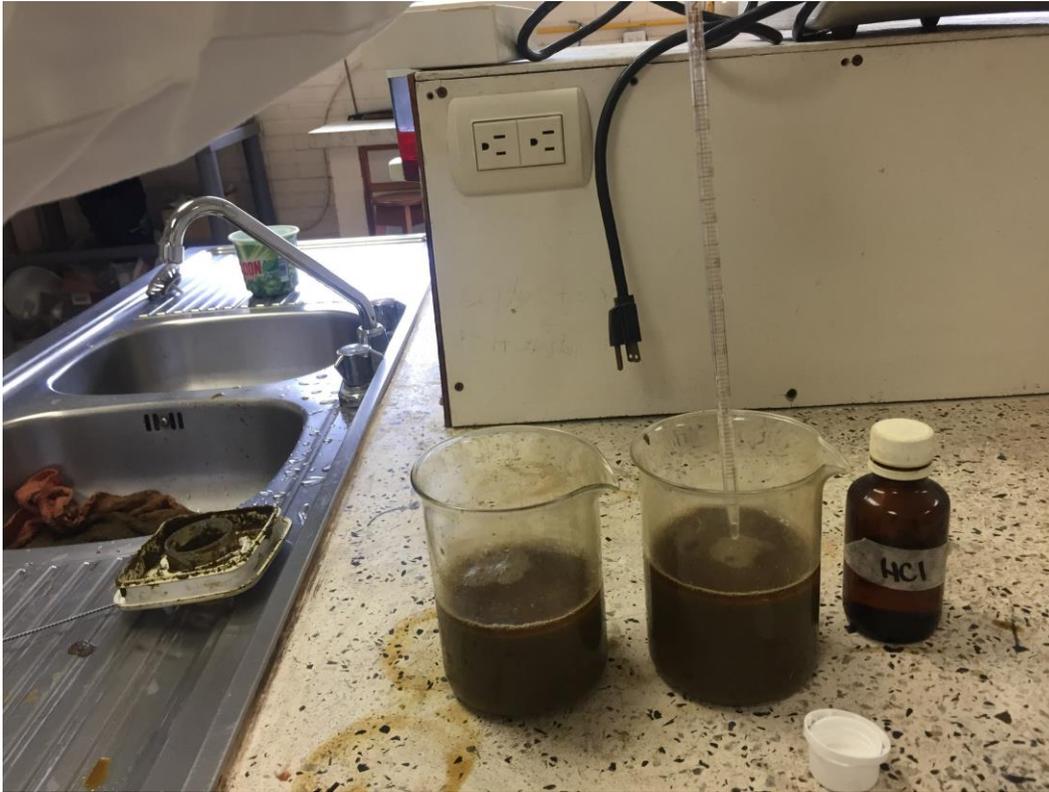


Figura 10. Obtención del jugo protéico, dependiendo del método, será acidificado o calentado.

Paso 6

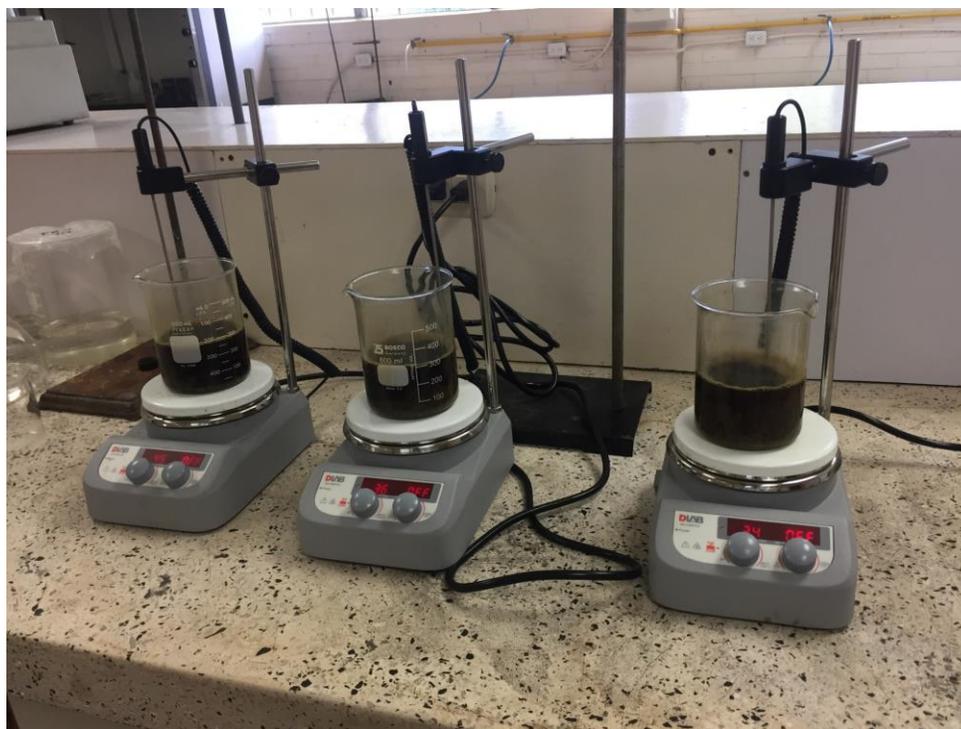


Figura 11. Agitación de las muestras a 1000 rpm , para virabalin y pres. térmica, también calentamiento durante 5 min a 84°C

Paso 7



Figura 12. Filtrado del coagulado

Paso 8.



Figura 13. Numeración de las muestras, y transferencia a un crisol para su secado.

Posterior al secado



Figura 14. Pesaje

Resultados estadísticos

Medidas resumen

Mex	Mpre	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
pH	pH	Rendimiento	10	6.42	0.73	0.23	11.31	5.39	7.49
pH	TEm	Rendimiento	10	5.90	0.87	0.27	14.67	4.45	6.85
pH	Vi	Rendimiento	10	6.52	0.45	0.14	6.94	5.82	7.09
Tem	pH	Rendimiento	10	5.05	0.56	0.18	11.10	4.16	5.79
Tem	Tem	Rendimiento	10	4.79	0.48	0.15	9.98	4.11	5.79
Tem	Vi	Rendimiento	10	5.70	0.76	0.24	13.42	4.69	7.32

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Rendimiento	60	5.73	0.90	0.95	0.0704

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento	60	0.51	0.47	11.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24.60	5	4.92	11.32	<0.0001
Mextraccion	18.03	1	18.03	41.48	<0.0001
Mprecipita	5.85	2	2.92	6.73	0.0025
Mex*Mpre	0.72	2	0.36	0.83	0.4403
Error	23.47	54	0.43		
Total	48.07	59			

Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.3407

Error: 0.4346 gl: 54

Mex	Medias	n	E.E.	
Tem	5.18	30	0.12	A
pH	6.28	30	0.12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:DGC Alfa=0.05 PCALT=0.4322

Error: 0.4346 gl: 54

Mpre	Medias	n	E.E.	
Tem	5.34	20	0.15	A
pH	5.73	20	0.15	B
Vi	6.11	20	0.15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)