

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Optimización del proceso de extracción y precipitación de un  
concentrado proteico foliar de *Moringa oleifera* Lam.**

**Byron Patricio Pérez Simba**

**Ingeniería en Alimentos**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Alimentos

Quito, 12 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Optimización del proceso de extracción y precipitación de un concentrado proteico foliar  
de *Moringa oleifera* Lam.

**Byron Patricio Pérez Simba**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Lucía de los Ángeles Ramírez  
Cárdenas, Ph.D.**

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

**Nombre del profesor, Título académico**

**Javier Alberto Garrido Espinosa, MSc.**

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 12 de diciembre de 2019

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Byron Patricio Pérez Simba

Código:

00130275

Cédula de identidad:

1725457541

Lugar y fecha:

Quito, 12 de diciembre de 2019

## Agradecimientos

Gracias a Dios y a mis padres Carmen y Olger y a mi hermana Margorie por ser mi fortaleza, soporte e inspiración para conseguir este sueño.

A mis abuelos, tía y todos mis familiares y amigos quienes siempre me han apoyado en este camino.

Un agradecimiento especial al Decanato del Colegio de Ciencias e Ingenierías-El Politécnico, por el financiamiento de esta investigación a través de los Poligrants.

A Lucía Ramírez, Javier Garrido y Andrea Endara, que han sido mentores, amigos y parte fundamental de este trabajo.

A Andrea Landázuri por la logística para la obtención de las hojas de moringa (Ecuamoringa) utilizadas en la primera fase del estudio y a José Álvarez y Daniela Viteri por su colaboración en el análisis de Bradford.

A Don Manuelito, Gabi y Francisco muchas gracias por todo lo que me han enseñado y toda la ayuda durante estos años.

## RESUMEN

*Moringa oleifera* Lam. (MO) es reconocida por su alta calidad nutricional, resaltando su contenido de proteína, balance de aminoácidos y varios compuestos bioactivos. El consumo directo de las hojas de MO en grandes cantidades no es posible debido a su sabor amargo y astringente, por lo que la obtención de un concentrado proteico foliar podría ser utilizado como suplemento nutricional y materia prima para nuevos productos con carácter funcional. Se estudió la influencia del pH (10, 11, 12) y concentración de NaCl (0, 0.25, 0.5) en el proceso de extracción de la proteína de MO a través de un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial  $3^2$ . La combinación de pH 11 y pH 12, ambos sin NaCl, presentaron el mayor rendimiento ( $p < 0.05$ ). El tratamiento a pH 11 sin NaCl continuó la etapa de precipitación para su purificación, evaluando el efecto de diferentes niveles de pH (4, 4.5, 5) y temperatura (40, 60, 80°C) utilizando un DCA con arreglo factorial  $2^2$  con 6 puntos centrales. La temperatura no afectó significativamente el rendimiento del proceso y a pH 4 y 4.5 se maximizó la cantidad de precipitado obtenido. A partir de 100 g de hoja se aislaron  $7.26 \pm 0.19$  g de proteína con una recuperación de  $26.93 \pm 0.22$  g/100 g de la proteína total.

Palabras clave: Moringa, proteína foliar, extracción, precipitación, concentrado proteico.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* Lam. (MO) is recognized for its high nutritional quality, its protein content, aminoacidic balance and the presence of many bioactive compounds. Consuming huge amounts of MO leaves is not possible, due to its astringent and bitter flavor, so obtaining a leaf protein concentrate could be useful for its applications in nutritional supplements, and raw material for new products with functional characteristics. The influence of pH (10, 11, 12) and the concentration of NaCl (0, 0.25, 0.5) in the protein extraction process was studied through a Completely Randomized Design (CRD) with factorial arrange  $3^2$ . The combination of pH 12 and pH 11 with 0 Molar NaCl had the best yield ( $p < 0.05$ ). The treatment of pH 11 without NaCl followed the precipitation stage for its purification, while the effect of different levels of pH (4, 4.5, 5) and temperature (40, 60, 80°C) was evaluated using a CRD with factorial arrange  $2^2$  and 6 central points. The temperature did not affect in a significant way the yield of the process and the amount of precipitate was maximized at pH 4 and 4.5. From 100 g of dry leaf  $7.26 \pm 0.19$  g of protein were isolated with a recovery of  $26.93 \pm 0.22$  g/100g from the total protein.

Key words: Moringa, leaf protein, extraction, precipitation, protein concentrate.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>15</b>
1. Materia prima .....	15
2. Reactivos .....	15
3. Extracción proteica .....	15
4. Proceso de precipitación .....	18
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>20</b>
1. Extracción proteica .....	20
2. Precipitación proteica.....	26
<b>Conclusiones.....</b>	<b>30</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de los tratamientos de la etapa de extracción proteica.....	16
Tabla 2. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de extracción.....	21
Tabla 3. Prueba Tukey del rendimiento de extracción de los tratamientos.....	23
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de precipitación.....	27
Tabla 5. Prueba Tukey del rendimiento de precipitación de los tratamientos.....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de dispersión de los métodos de Bradford y Kjeldahl .....	25
--	----

## INTRODUCCIÓN

*Moringa oleífera* Lamarck (MO) pertenece a la familia Moringaceae con un solo género: *Moringa* (Morton, 1991). Es una planta originaria de la India ampliamente distribuida en las zonas tropicales (Al-Khalifah & Shanavaskhan, 2017), reconocida como un cultivo resistente a la sequía y multipropósito, que se utiliza tanto para alimento animal como humano por su alta calidad nutricional (Domenico, Lina & Francesca, 2019).

Las hojas de MO son alternadas de conformación pinnada de 20 a 70 cm de longitud. El largo pecíolo con 8 a 10 pares de pinnas tiene hojuelas opuestas de forma ovalada con una última hojuela en el ápice (Mridha & Barakah, 2017). *M. oleífera* está adaptada a un amplio rango de condiciones de cultivo, es de rápido crecimiento y capaz de producir aproximadamente 580 ton/ha de brotes frescos al año (Palada, Chang, Yang & Engle, 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés FAO (2019) recomienda esta especie como un cultivo potencial. A pesar de que en Ecuador no existen registros oficiales de la cantidad de MO cultivada, se han desarrollado algunas iniciativas privadas, la más importante es “Ecuamoringa” que maneja un amplio mercado nacional (Ecuamoringa, 2017).

Olson et al. (2016) sostienen que las hojas de MO tienen cualidades nutritivas sobresalientes entre los vegetales perennes, resaltando su contenido de 24-29 g/100g de proteína, además de concentraciones significativas de Vitamina A, C y minerales como calcio, hierro y fósforo.

Los aminoácidos son esenciales en el cuerpo como precursores para la síntesis de proteínas, péptidos y moléculas de bajo peso molecular (Wu, 2009). La falta de estos componentes desencadena enfermedades como kwashiorkor causada por una severa deficiencia de ingesta proteica y marasmo, otro padecimiento caracterizado por la falta de

energía y proteína; ambas enfermedades se observan sobre todo en países en desarrollo (Wu, 2016). La proteína foliar de MO contiene todos los aminoácidos esenciales en concentraciones importantes; sin embargo, la cantidad de hoja que se debe ingerir para obtenerlos es alta (Lalas et al., 2017).

Con el rápido crecimiento de la población y el problema ambiental que la ganadería a gran escala genera, es necesario encontrar fuentes alternativas de proteína que puedan satisfacer las necesidades nutricionales (Zhang, Sanders & Bruins, 2014), por lo que se ha intensificado la investigación de fuentes proteicas no convencionales (Haque & Varshney, 2015). En países de economías desarrolladas, donde la carne sigue siendo la mayor fuente de proteína, la opción vegetal aún es subutilizada y presenta problemas de producción por su eficiencia y costo de procesamiento (Day, 2013).

MO ha sido empleada tradicionalmente para tratar la diabetes, debido al poder hipoglucemiante atribuido a sus metabolitos secundarios (Li, Zheng, Bukuru, De Kimpe, 2004). Sin embargo, diferentes estudios han probado las propiedades farmacológicas de la proteína foliar de varios vegetales (Oliveira et al., 1999; Sheng, Yao, Xu, Ling, He, 2004). Específicamente Paula et al. (2012) demostraron que un extracto acuoso proteico y purificado de las hojas de MO, administrado en dosis de 500 mg/kg de peso corporal, disminuyó significativamente el nivel de glucosa en sangre de ratas diabéticas inducidas por alloxan, en hasta 66.4%, 5 horas después de la aplicación. De igual manera se observó una significativa disminución de malonaldehído (MDA), el cual se forma por el incremento de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) comúnmente elevadas en esta patología y que causan estrés oxidativo y problemas mutagénicos (Nishikawa et al., 2000).

Los péptidos de MO han demostrado capacidades antioxidantes, antidiabéticas e inhibitoras de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) (Lin et al., 2018). Una gran variedad de péptidos bioactivos se puede obtener por la combinación sinérgica de las enzimas

peptídicas del estómago y los efectos mencionados dependerán del tipo y composición de aminoácidos de los péptidos (Saucedo et al., 2018).

Consumir directamente los folios de los vegetales en grandes cantidades provoca inconvenientes debido a la existencia de componentes antinutricionales y fibra (Mendieta, Spörndly, Reyes & Spörndly, 2011). En las hojas de MO no se han identificado inhibidores de tripsina ni de amilasa; pero presentan concentraciones importantes de fenoles, taninos, saponinas y fitatos que reducen su calidad nutricional (Makkar & Becker, 1997). A pesar de que estos mismos fitoquímicos en cantidades adecuadas han demostrado ser beneficiosos para la salud.

Las hojas de MO pueden contener hasta 12.5 g/100g de fibra, que presenta diversas ventajas para el sistema digestivo, entre estas la prevención de cáncer de colon (Gopalakrishnan, Doriya & Kumar, 2016). Los taninos tienen cualidades antitumorales y antimicrobianas (Hausteen, 2005). Las saponinas de MO han sido estudiadas ampliamente por su poder antioxidante, antiinflamatorio y estimulador del sistema inmunológico (Rausch, Liu, Grille & Radad, 2006) entre muchos otros.

El sabor amargo y astringente de las hojas de MO se debe al contenido de flavonoides, principalmente catequinas (Guevara, 2012) y glucosinolatos, especialmente 4(rhamnopiranosiloxi) benzil glucosinolato y monoacetil(rhamnopiranosiloxi) benzil glucosinolato. Estos últimos son transformados tras el proceso de masticación en isotiocianatos por la enzima mirosinasa y aumentan el sabor pungente y picante del producto, reduciendo su atractivo alimenticio (Doerr, Fahey, Reed, Stephenson & Wade, 2009). Por lo tanto, es importante aislar la proteína con el fin de suministrarla como suplemento o materia prima en el desarrollo de nuevos productos con valor nutricional incrementado y posibles aplicaciones farmacológicas a futuro (Hassan, Afify, Basyiony, Ahmed & Ghada, 2010).

La obtención de un precipitado proteico se inicia con la solubilización de la proteína, Martínez, Hernández, Amigo, Miralles & Gómez (2013) consideran a este el paso clave para separarla de los demás compuestos del material vegetal. Existen diferentes métodos como: aplicación de solventes orgánicos, extracción acuosa y utilización de enzimas. Por condiciones económicas y ambientales, el método más comúnmente aplicado es el acuoso, adicionando sales o cambiando el pH para modificar la solubilidad de las proteínas (Tan, Mailer, Blanchard & Agboola, 2011).

La extracción alcalina a partir de la metodología de Osborn (1924) con modificaciones ha sido especialmente utilizada. Además se ha reportado la adición de sales de sodio y calcio para la extracción proteica en diferentes fuentes alimenticias (Martínez et al., 2013). Sin embargo, hay poca información sobre la interacción entre concentración salina y pH alcalino.

Teixeira, Carvalho, Neves, Silva & Arantes (2013) estudiaron el fraccionamiento proteico sugerido por Osborn & Voogt (1978) de las hojas de *Moringa oleifera* Lam., detectando la presencia de todas las fracciones: albúminas solubles en agua, globulinas solubles en solución salina, prolaminas solubles en etanol 70-90% y glutelinas solubles en ácido y álcali. Esto permitiría utilizar tanto el método alcalino como la extracción salina para maximizar el rendimiento, evitando el uso de solventes orgánicos como el etanol por su costo económico y ambiental.

Después de la extracción es necesario aislar la proteína, por lo que la precipitación isoeléctrica es empleada y permite obtener proteína libre de lípidos a partir de materiales complejos posterior a la solubilización proteica por condiciones ácidas o básicas extremas (Vilg & Undeland, 2016). De igual forma, la precipitación puede ser consecuencia de temperaturas elevadas, que desestabilizan la proteína reduciendo su solubilidad y desnaturalizándola (Peña, 2012).

Debido a las aplicaciones que un concentrado proteico foliar ofrece y la importancia de la relación costo/beneficio para su utilización industrial, el objetivo de este estudio fue determinar las mejores condiciones de extracción y precipitación de la proteína de las hojas de *Moringa oleifera* Lam. evaluando el efecto de diferentes factores para maximizar el rendimiento del proceso.

## METODOLOGÍA

### 1. Materia prima

Las hojas de *Moringa oleifera* Lam. se adquirieron de un productor local “Ecuamoringa”. Fueron secadas en estufa a 35°C hasta obtener peso constante, molidas y tamizadas a un tamaño de partícula de -60 mesh (Teixeira et al., 2014). El material fue envasado al vacío en polietileno de alta densidad y guardado a 15°C.

### 2. Reactivos

Ácido clorhídrico (PubChem CID: 313; 37%) de MERCK; Hidróxido de sodio (PubChem CID: 14798) de Fisher Scientific; Catalizador kjeldahl(Cu-Se) de Scharlau; Ácido sulfúrico (PubChem CID: 1118) de MERCK; antiespumante (Sulfato de Sodio 97% y Silicona 3%) de Velp; Ácido bórico (PubChem CID: 7628) de Loba Chemie; Reactivo Bradford de Kit Sigma-Aldrich; Albúmina de suero bobino (PubChem CID: 16132389) de Kit Sigma-Aldrich.

### 3. Extracción proteica

#### 3.1. Proceso de extracción

Se siguió la metodología de Tan et al. (2011) con modificaciones. En un erlenmeyer de 500 mL fueron pesados  $20 \pm 0.1$ g de polvo de hoja de MO utilizando una balanza Mettler Toledo ML 204 T  $\pm 0.1$  mg y se agregó agua ultra pura con conductividad eléctrica de 0.067 uS/cm en relación 1:10 w/v.

La muestra fue homogenizada durante 5 min en plancha de agitación marca VELP Scientifica a 800 rpm. El pH fue ajustado (10, 11 y 12) con solución NaOH 1N, según el diseño experimental planteado y con un potenciómetro Mettler Toledo modelo Seven Compact. El erlenmeyer se colocó en un baño con agitación

marca Julabo modelo SW22 realizando la extracción a 25°C y 200 rpm durante 1 hora. Se rectificó el pH cada 10 minutos con potenciómetro y solución NaOH 1 N.

### 3.2. Diseño experimental

Para la extracción proteica se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial  $3^2$  correspondiente a la combinación de los factores: pH (10, 11 y 12) y concentración de NaCl (0, 0.25 y 0.5 Molar). Se obtuvieron 9 tratamientos (Tabla 1) y se realizaron 3 repeticiones con un total de 27 unidades experimentales. Se evaluó como variable de respuesta el rendimiento de extracción de proteína, buscando obtener el máximo. En el rango de pH planteado y hasta una concentración 0.5 Molar de NaCl la solubilidad de la proteína se maximiza (Osborn, 1978; Peña, 2012).

Tabla 1: Codificación de Tratamientos

Tratamientos	pH	Concentración NaCl (Molar)
E1	10	0
E2	10	0.25
E3	10	0.5
E4	11	0
E5	11	0.25
E6	11	0.5
E7	12	0
E8	12	0.25
E9	12	0.5

### **3.3. Análisis proteico**

#### **3.3.1. Método Kjeldahl**

El contenido total de proteína en el extracto fue determinado por el método de Kjeldahl (AOAC 991.22) utilizando un factor de conversión de 6.25 (Mbailao, Mianpereum & Albert, 2014). Se programaron tres rampas de temperatura 140°C por 15 minutos, 250 °C por 20 minutos y 420° C por 40 minutos en el digester de proteína (VELP Scientific modelo DK 6). La destilación se realizó en el equipo VELP Scientific modelo UDK 132.

#### **3.3.2. Método Bradford**

La concentración de proteína soluble en el extracto fue cuantificada empleando un Kit de Bradford marca Sigma-Aldrich (Technical Bulletin Bradford Assay, 2019). Se construyó la curva de calibración, utilizando como estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA). Los extractos fueron diluidos en relación 1/15, 1/20 y 1/25 con agua ultra pura en base a la concentración de proteína, para que la densidad óptica permanezca dentro del rango de la curva de calibración. Se colocaron 5 uL de muestra con 250 uL de reactivo Bradford y se incubó en la oscuridad por 25 min. La densidad óptica se determinó en un lector de Elisa MRX Microplate Reader marca Technologies a 595 nm (Viteri & Álvarez, 2018).

### **3.4. Rendimiento**

La comparación entre la cantidad de proteína extraída (determinada por los dos métodos) y la proteína total en la hoja de moringa previo el proceso de solubilización permitió el cálculo del rendimiento (Serpa, Hincapié & Álvarez, 2014).

### **3.5. Relación de métodos de análisis de proteína**

El coeficiente de correlación de Pearson determinó la relación de los dos métodos utilizados para la cuantificación de proteína en la etapa de extracción.

#### **4. Proceso de precipitación**

El mejor tratamiento de la etapa de extracción proteica continuó con el proceso de precipitación siguiendo la metodología de Serpa et al. (2014) con modificaciones. Se obtuvieron 1300 mL de extracto y se tomó alícuotas de 100 mL. El pH fue medido con potenciómetro (Mettler Toledo modelo Seven Compact) y ajustado con una solución de HCl 1N. Cada tratamiento fue colocado en baño María con agitación de 100 rpm durante 30 minutos. Los niveles de los factores temperatura y pH, correspondieron a lo establecido en el diseño experimental.

El extracto fue colocado en 4 tubos Falcon de 50 mL y centrifugado (equipo Hermle Z206A) durante 10 minutos a 3080 g (RCF). Se separaron el sobrenadante y el precipitado (proteína) y fueron congelados a -18°C hasta su análisis proteico por el método Kjeldahl (AOAC 991.22) utilizando un factor de conversión de 6.25 (Mbailao, Mianpereum & Albert, 2014).

##### **4.1. Diseño experimental**

Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2<sup>2</sup>; considerando los factores: pH (4 y 5) y temperatura (40 y 80 °C). Estos valores de pH son cercanos al punto isoeléctrico de la proteína foliar de la mayoría de vegetales (Kobbi et al., 2016). En el rango de las temperaturas estudiadas la solubilidad de la proteína disminuye (Zayas, 2013).

Se realizaron 2 repeticiones de cada tratamiento y se adicionaron 6 puntos centrales. Los 5 tratamientos fueron: P1 (pH 4, 40°C); P2 (pH 4, 80°C); P3 (pH 5, 40°C); P4 (pH 5, 80°C); P5 (pH 4.5, 60°C).

Se consideró el porcentaje de rendimiento de precipitación, esperando obtener la mayor cantidad de proteína precipitada.

## **4.2. Rendimiento**

El rendimiento de precipitación se calculó relacionando la proteína obtenida en el sobrenadante de cada una de las unidades experimentales tras el centrifugado con la concentración de proteína en el extracto previo al proceso de precipitación (Urribarrí, Ferrer & Carolina, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Extracción proteica

El propósito de la primera parte del estudio fue determinar las mejores combinaciones de pH y concentración de NaCl para obtener el máximo rendimiento de extracción proteica a partir de las hojas de MO. Por el método Kjeldahl (AOAC 991.22), el contenido de proteína total en las hojas previo al proceso de solubilización fue de  $26.96 \pm 0.24$  g/100g, similar a 27.3 g/100g reportado por Olson et al. (2016). Con este valor se calculó el rendimiento de extracción al relacionarlo con el contenido de proteína extraída en cada unidad experimental.

La curva de calibración en la metodología de Bradford mostró los siguientes datos: ecuación de regresión  $(y) = 0.2927X + 0.4408$ ; coeficiente de determinación  $(R^2) = 0.9954$ .

Un coeficiente de determinación de 0.9954 demuestra que una gran proporción de variación de la variable dependiente es predicha a partir de la variable independiente, es decir el modelo tiene buen ajuste y es capaz de predecir los datos reales (Navidi, 2011).

Como se puede observar en la Tabla 2, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y tanto el factor pH, como la concentración de sal y su interacción influyeron significativamente en el rendimiento de extracción con los dos métodos de cuantificación.

Tabla 2: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de extracción (g/100g) de los tratamientos.

Fuentes de variación	GL	Cuadrados medios	
		Método Kjeldahl	Método Bradford
Total	26		
Tratamientos	8	92.18 *	222.32*
Sal (A)	2	295.01*	432.54*
pH (B)	2	46.69*	407.34*
Interacción A x B	4	13.09*	24.7*
Error	18	1.03	1.85

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

Condo & Pazmiño (2015) sostienen que en experimentos controlados en laboratorio se espera un Coeficiente de Variación (CV) menor al 5%. Por lo tanto, en el método Kjeldahl (CV 3.23%) y en el método Bradford (CV 3.9%) la variabilidad extrínseca fue controlada y la investigación fue confiable.

El pH del medio es el factor decisivo en la solubilidad de la proteína. La carga neta a determinado pH depende de los valores de pKa de los grupos ionizables de la proteína dando lugar a tres diferentes posibilidades: en el punto isoeléctrico (pI) la carga neta es 0, valores de pH menores al pI dan carga neta positiva y valores de pH superiores presentan carga negativa (Shaw, Grimsley, Yakovlev, Makarov & Pace, 2001). De la carga de la molécula depende su relación con el solvente y su solubilidad, cuando  $\text{pH} = \text{pI}$  la solubilidad es mínima y en valores de pH más bajos o altos esta forma una distribución tipo U, siendo a pH alcalino mayor la

solubilidad que a pH ácido (Zayas, 2013). Además del cambio de solubilidad proteica, el álcali es capaz de hidrolizar la proteína ligada a polifenoles y polisacáridos, disminuyendo su característica hidrofóbica; de igual manera la pared celular de las hojas se ve afectada por el NaOH generando grietas y aumentando la difusión (Zhang, Sanders Xiao & Bruins, 2015).

Las hojas de MO tienen un alto contenido de fitatos, incluso superior al de algunas leguminosas (Leone et al., 2015). Los fitatos se unen en complejos insolubles con ciertos minerales como calcio y magnesio, al igual que con las proteínas afectando negativamente la digestibilidad posiblemente por la inhibición de las enzimas digestivas, ya sea por su unión con la proteína del alimento, las enzimas o por la quelación de calcio, sustrato esencial de la tripsina (Thrane, Paulsen, Orcutt & Krieger, 2017). Sin embargo, durante el proceso de extracción al utilizar pH altamente alcalino, el enlace del complejo fitato-proteína se rompe y en presencia de suficiente calcio (MO es rica en calcio) precipita, por lo que podría ser removido previo al proceso de precipitación proteica (Rham & Jost, 1979).

Por otro lado, la concentración salina del medio influye en la fuerza iónica y el mecanismo por el cual esta característica cambia la solubilidad de la proteína es poco conocido (Zayas, 2013). Las sales interactúan con los grupos cargados de la proteína ya sea disminuyendo las interacciones de atracción electrostática y/o mejorando su relación con el solvente. Cuando la concentración salina llega a un punto determinado las moléculas de agua no logran soportar las cargas de iones y proteínas y el soluto menos soluble (proteínas) precipitará (McQuarrie & Simon, 2008). Debido a que los grupos cargados de la proteína dependen del pH del medio, el efecto de la concentración salina se relaciona con el pH como se pudo observar en la presente investigación, al ser la interacción significativa entre los factores ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

Los tratamientos E4 (pH 11) y E7 (pH 12), ambos en ausencia de sal fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los demás tratamientos, con rendimientos de

40.4 y 38.79 g/100g por el método Kjeldahl y 38.11 y 40.28 por el método de Bradford respectivamente (Tabla 3). Esto fue similar al 38 g/100g reportado por Zhang et al. (2015) en extracción alcalina de proteína a partir de hojas de té (*Camellia sinensis*) y al 41.5 g/100g obtenido por Coldebella et al. (2013) utilizando hojas de residuo de yuca (*Manihot esculenta*) también por el método alcalino.

Tabla 3. Rendimiento de extracción (g/100g) de los tratamientos.

Método Kjeldahl		Método Bradford	
Tratamiento	Rendimiento (g/100g)*	Tratamiento	Rendimiento (g/100g)*
E4	40.41±1.28Aa	E4	38.11±2.43Aa
E7	38.79±0.30Aa	E7	40.28±1.85Aa
E1	35.01±1.76Ab	E1	24.01±1.66Bcd
E8	32.01±1.40Ac	E8	30.29±0.38Ab
E9	31.13±1.31Ac	E9	27.75±1.19Bbc
E2	27.60±0.09Ad	E2	18.51±0.12Be
E5	27.24±0.30Ad	E5	23.72±1.32Bde
E3	25.85±0.42Ad	E3	15.56±0.76Be
E6	25.56±0.71Ad	E6	19.09±0.82Be

\*Media ± desviación estándar

Medias seguidas de por lo menos una misma letra mayúscula en las filas no difieren entre si por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

Medias seguidas de por lo menos una misma letra minúscula en las columnas no difieren entre si por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

El aumento del rendimiento proteico al subir el pH se debe a que en un medio con pH superior al punto isoelectrico (pI cercano a 4), los grupos de la proteína se cargan negativamente, generando fuerzas electrostáticas evitando que las moléculas se unan entre sí (Hou et al., 2017).

En general las sales en baja concentración mejoran la solubilidad de la proteína y la estabilizan por interacciones electrostáticas no específicas. La sal podría disminuir las fuerzas de atracción entre las moléculas proteicas, añadiendo cargas adicionales aumentando su estabilidad y solubilidad (Pérez, Godoy, Ibarra & Sánchez, 2004). Sin embargo, en condiciones en las cuales la proteína está sumamente cargada, como en este experimento (pH altamente alcalino) la sal debilitó las interacciones electrostáticas enmascarando las cargas, reduciendo la repulsión electrostática y disminuyendo la solubilidad (Dahal & Schmit, 2018).

El método de Bradford utiliza el azul brillante de comassie (CBB) como un colorante que se une a las proteínas por interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals. Es especialmente utilizado para estudiar proteínas solubles (Owusu, 2002) y mide el incremento de la absorbancia de la muestra después de añadir el colorante en un tiempo específico. Si el tiempo se excede es posible que el complejo insoluble formado por proteína-CBB precipite. Marshall & Williams (1991) sugieren que el complejo es insoluble desde su formación, lo que indicaría que el resultado del análisis puede variar dependiendo de diferentes proteínas, sus estructuras y especialmente su solubilidad.

El rendimiento analizado con los métodos de Kjeldahl y Bradford de los tratamientos E4 (pH 11, 0 M NaCl), E7 (pH 12, 0M NaCl) y E8 (pH 12, 0.25M NaCl) fue estadísticamente igual (Tabla 3); sin embargo, los demás tratamientos fueron diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ), como resultado de que a pH 11 y 12 sin NaCl o con baja concentración (E8), pero altamente cargado (pH 12), la solubilidad de la proteína es elevada y la prueba de Bradford es capaz de cuantificar la mayoría de la proteína; en cambio, a pH inferior y concentración de sal superior la proteína

es menos soluble y no permite la formación del complejo proteína-CBB ya sea porque sus fuerzas electrostáticas están enmascaradas por los iones de sodio y cloro, o porque se encuentra precipitada.

Por otro lado, el método de Kjeldahl determina el contenido de nitrógeno que se convierte en el contenido de proteína, al considerar el factor de conversión respectivo dependiendo del tipo de muestra (Mbailao, Mianpereum & Albert, 2014), por lo que sería un método más confiable para determinar el rendimiento del extracto.

El coeficiente de Pearson indicó una alta correlación positiva entre ambas metodologías (0.886) dentro de un rango posible (-1 a +1). En la Figura 1 se puede observar que los valores siguieron una misma tendencia.

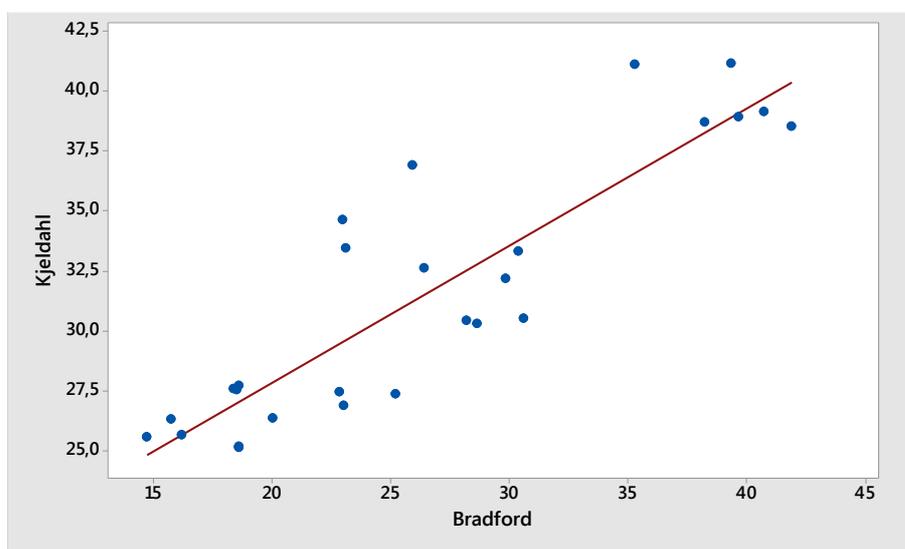


Figura 1: Diagrama de dispersión de los métodos de Bradford y Kjeldahl

En la siguiente etapa se utilizó el método de Kjeldahl para el análisis de proteína, porque adicionalmente tuvo un CV menor al del método de Bradford que es lineal en un pequeño rango de entre 0 ug/ml a 2000 ug/mL, y por lo mismo se deben hacer diluciones

de la muestra, lo que podría generar errores que restarían precisión al resultado (Ernst & Zor, 2010).

En la extracción los tratamientos E4 (pH 11) y E7 (pH 12) presentaron el mayor rendimiento de extracción ( $p < 0.05$ ); pero E4 utilizó menos NaOH, reduciendo el uso de un reactivo contaminante así como el costo del proceso, además medios más alcalinos generan cambios químicos en la proteína (Friedman, 2010). Durante el procesamiento en pH extremadamente ácido o básico y altas condiciones de temperatura, los L-aminoácidos pueden transformarse a su isómero D, proceso conocido como racemización (Schwass & Finley, 1984). Este cambio tiene efectos en la calidad nutricional de la proteína extraída, pues los aminoácidos D son menos susceptibles a la digestión, además algunos de los isómeros D han presentado efectos tóxicos en estudios con ratas (Friedman, 2010). Por lo tanto, el tratamiento E4 continuó la etapa de precipitación.

## **2. Precipitación proteica**

Existió diferencia significativa entre los tratamientos y el factor pH influyó significativamente en el rendimiento de precipitación ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4). La precipitación isoeléctrica ocurre cuando el pH del medio se acerca al pI de la proteína generando una carga neta 0 (Shaw, Grimsley, Yakovlev, Makarov & Pace, 2001). De igual manera, la temperatura tiene un marcado efecto en las propiedades funcionales de la proteína al cambiar su estructura de forma irreversible modificando su interacción con el medio (Zayas, 2013).

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) del rendimiento de precipitación (g/100g)

Fuentes de variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios
Total	13	58.53	
Tratamientos	4	52.69	13.17*
pH (A)	1	46.83	46.82*
Temperatura (B)	1	2.18	2.18n.s.
Interacción A x B	1	1.46	1.46n.s.
Curvatura	1	2.23	2.23n.s.
Error	9	5.83	0.6481

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

n.s. No significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

El CV fue 1.21% lo que confirma su confiabilidad (<5%) (Condo & Pazmiño, 2015).

También se observa en la Tabla 4 que la curvatura no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ), lo que implica que el modelo fue lineal, no siendo necesario añadir más puntos experimentales para estudiar el efecto cuadrático (Gutiérrez, Vara, Cano & Osorio, 2008).

Los tratamientos P1 (pH 4, 40°C), P2 (pH 4, 80°C) y P5 (pH 4.5, 60°C) fueron estadísticamente iguales y presentaron el más alto rendimiento de precipitación ( $p < 0.05$ ). La influencia del pH en la disminución de la solubilidad (Tabla 5), se debe a que mientras más se acerca el pH del medio al pI (punto Isoeléctrico), las interacciones proteína - proteína aumentan porque las fuerzas electrostáticas disminuyen drásticamente y existe menor cantidad de agua interactuando con estas macromoléculas (Salcedo et al., 2002).

La proteína foliar de MO tuvo un comportamiento similar a la de otros vegetales disminuyendo su solubilidad cuando el pH fue cercano a 4 (Kobbi et al., 2016). El rendimiento en la precipitación isoelectrica fue superior a 62.5 g/100g reportado por Urribarrí, Ferrer & Carolina (2004) utilizando un pH cercano a 4 y 50°C en pasto de

elefante (*Pennisetum purpureum Schum cv. Mott*). De igual manera superó al encontrado por Serpa et al. (2014) en hojas de *Jatropha curcas* L. (31.4 g/100g).

Tabla 5. Rendimiento de precipitación (g/100g) de los tratamientos.

Tratamiento	Rendimiento de precipitación [g/100g] *
P1	68,69 ± 1,88a
P2	68,50 ± 0a
P5	66,98 ± 0,42a
P3	64,71 ± 1,07b
P4	62,81 ± 0,54b

\*Media ± desviación estándar

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tukey.

El aumento de la temperatura en general disminuye la solubilidad de la proteína debido a que se dan cambios conformacionales en su estructura. La modificación es irreversible y depende del tiempo de calentamiento y la temperatura. Hasta 40°C la solubilidad de la proteína aumenta y después empieza a disminuir. La influencia de la temperatura en la solubilidad se ve marcada por el pH y la fuerza iónica del medio (Zayas, 2013). En el presente estudio el pH cercano al pI de la proteína cambió la configuración electrostática eliminando las fuerzas repulsivas y permitiendo que se unan y en su mayoría precipiten, por lo que el efecto de la temperatura no se observó debido a que la proteína se volvió insoluble a causa del pH (Tablas 4 y 5).

Conseguir la máxima precipitación sin el uso de altas temperaturas disminuye el costo energético del proceso y además evita cambios o daños en los aminoácidos termolábiles como

la lisina y previene el deterioro de las propiedades funcionales de la proteína (Belhadj, Najar, Ghram & Abdrrabba, 2016).

Considerando el rendimiento promedio de las dos etapas (extracción y precipitación) se obtuvo un máximo de  $26.93 \pm 0.22$  g/100g con base en la concentración inicial de proteína en la hoja, lo que representa aproximadamente  $7.26 \pm 0.19$  g de proteína aislada a partir de 100 g de hoja, similar a lo obtenido por Nissinen, Kalliainen & Jauhiainen, (2008) al recuperar 24-26 g/100g de la proteína total de la hoja de *Phleum pratense*. Además, en el estudio de Chiesa & Gnansounou (2011) de la extracción del concentrado proteico foliar de alfalfa (*Medicago sativa*) con base en la hoja deshidratada se obtuvo 8.53 g/100g de rendimiento, que vuelve comercial a la proteína de alfalfa tradicionalmente industrializada y que es ligeramente mayor al obtenido en este estudio a partir de MO.

## CONCLUSIONES

Las mejores condiciones de extracción de la proteína foliar de *Moringa Oleifera* Lam. fueron a pH (11-12) sin NaCl, con un rendimiento de hasta  $40.41 \pm 1.28$  g/100g.

Existió influencia negativa de la concentración de Cloruro de Sodio en la solubilidad de la proteína en medio altamente alcalino.

Valores cercanos a su punto isoeléctrico (pH 4 y 4.5), maximizaron la precipitación de la proteína extraída de *Moringa oleifera* Lam., con un rendimiento de hasta  $68.69 \pm 1.88$  g/100g. La temperatura no tuvo influencia en este proceso.

Analizando ambas etapas (extracción + precipitación) fue posible extraer en promedio  $26.93 \pm 0.22$  g/100g de la proteína original y en total  $7.26 \pm 0.19$  g/100g a partir de las hojas deshidratadas de *Moringa oleifera* Lam., rendimiento similar al obtenido en el procesamiento de concentrados de alfalfa comercial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Khalifah, N., & Shanavaskhan, A. (2017). *Moringa oleifera* Lam., a promising crop species for arid conditions of Saudi Arabia and *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, a native wild species for crop improvement. *Acta Horticulturae*, (1158), 159-170. doi: 10.17660/actahortic.2017.1158.19
- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. Virginia: Association of Official Agricultural Chemists.
- Belhadj, I., Najar, T., Ghram, A., & Abdrabba, M. (2016). Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 401-412.
- Chiesa, S., & Gnansounou, E. (2011). Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery—Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technology*, 102(2), 427-436
- Coldebella, P., Gomes S., Evarini, J., Marney, C., Coelho, S. & Coldebella, A. (2013). Evaluation of protein extraction methods to obtain protein concentrate from cassava leaf. *Post Harvest Science and Technology*, 33 (6).
- Condo, L., & Pazmiño, J. (2015). *Diseño experimental*. Latacunga: ESPOCH.
- Dahal, Y., & Schmit, J. (2018). Ion Specificity and Nonmonotonic Protein Solubility from Salt Entropy. *Biophysical Journal*, 114(1), 76-87. doi: 10.1016/j.bpj.2017.10.040
- Day, L. (2013). Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. *Trends In Food Science & Technology*, 32(1), 25-42. doi: 10.1016/j.tifs.2013.05.005
- Doerr, B., Fahey, J., Reed, S., Stephenson, K., & Wade, K. (2009). Cultivar Effect on *Moringa oleifera*. Glucosinolate Content and Taste: A Pilot Study. *Ecology of Food and Nutrition*, 48, 199-211
- Domenico, M., Lina, C., & Francesca, B. (2019). Sustainable Crops for Food Security: *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.). *Encyclopedia Of Food Security And Sustainability*, 1(1), 409-415. doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.22574-2
- Ecuamoringa. (2017). Retrieved from <http://www.ecuamoringa.com/>
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal Of Visualized Experiments*, (38). doi: 10.3791/1918
- FAO. (2019). *Moringa*. Retrieved from <http://www.fao.org/traditional-crops/moringa/es/>
- Friedman, M. (2010). Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids. *Chemistry & Biodiversity*, 7(6), 1491-1530. doi: 10.1002/cbdv.200900225

- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science And Human Wellness*, 5(2), 49-56. doi: 10.1016/j.fshw.2016.04.001
- Guevara, J. (2012). Caracterización de tres extractos de Moringa oleifera y evaluación de sus condiciones de infusión en sus características fisicoquímicas. Departamento de agroindustria alimentaria Universidad Zamorano, 10-16.
- Gutiérrez, H., Vara, R., Cano, A., & Osorio, M. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw-Hill.
- Haque, L., & Varshney, V. (2015). Optimization of Process Conditions for Isolation of Leaf Protein Concentrate from Pongamia pinnata and its Proximate Nutritional Composition. *IOSR Journal Of Applied Chemistry*, 8(5), 24-33. doi: 10.9790/5736-08512433
- Hassan, H., Afify, A., Basyiony, A., Ahmed, A., & Ghada, T. (2010). Nutritional and functional properties of defatted wheat protein isolates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 348-358.
- Hausteen, B. (2005). The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. therapeutics J.* 96:67-202.
- Hou, F., Ding, W., Qu, W., Oladejo, A. O., Xiong, F., Zhang, W. & Ma, H. (2017). Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. *Food chemistry*, 218, 207-215.
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Karageorgou, I., Batra, G., Nanos, G. D., & Makris, D. P. (2017). Nutritional characterization of leaves and herbal tea of Moringa oleifera cultivated in Greece. (4), 320-333.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16(12), 12791-12835. doi: 10.3390/ijms160612791
- Li, W., Zheng, H., Bukuru, J., De Kimpe, N. (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol*, 92, 1-21.
- Lin, L., Zhu, Q., Zhao, M., Zhao, K., Tian, Y., & Yang, Y. (2018). Purification of peptide fraction with antioxidant activity from Moringa oleifera leaf hydrolysate and protective effect of its in vitro gastrointestinal digest on oxidatively damaged erythrocytes. *International Journal Of Food Science & Technology*, 54(1), 84-91. doi: 10.1111/ijfs.13907
- Kobbi, S., Bougatef, A., Le flem, G., Balti, R., Mickael, C., & Fertin, B. et al. (2016). Purification and Recovery of RuBisCO Protein from Alfalfa Green Juice:

- Antioxidative Properties of Generated Protein Hydrolysate. *Waste And Biomass Valorization*, 8(2), 493-504. doi: 10.1007/s12649-016-9589-y
- Makkar, H., & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *The Journal Of Agricultural Science*, 128(3), 311-322. doi: 10.1017/s0021859697004292
- Mbailao, M., Mianpereum, T., & Albert, N. (2014). Proximal and Elemental Composition of *Moringa oleifera* (Lam) Leaves from Three Regions of Chad. *Journal Of Food Resource Science*, 3(1), 12-20. doi: 10.3923/jfrs.2014.12.20
- Martínez, D., Hernández, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez, J. (2013). *Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion* (2nd ed.). New York: Springer Science+Business Media.
- Marshall, T., & Williams, K. (1992). Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Analytical Biochemistry*, 204(1), 107-109. doi: 10.1016/0003-2697(92)90147-y
- McQuarrie, D., & Simon, J. (2008). *Physical Chemistry a Molecular Approach*. Sausalito: University Science Books.
- Mendieta, B., Spörndly, R., Reyes, N., & Spörndly, E. (2011). *Moringa* (*Moringa oleifera*) leaf meal as a source of protein in locally produced concentrates for dairy cows fed low protein diets in tropical areas. *Livestock Science*, 137(1-3), 10-17.
- Morton, J. (1991). The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)—A boon to Arid Lands?. *Economic Botany*, 45(3), 318-333. doi: 10.1007/bf02887070
- Mridha, M., & Barakah, F. (2017). Diseases and pests of moringa: a mini review. *Acta Horticulturae*, (1158), 117-124. doi: 10.17660/actahortic.2017.1158.14
- Navidi, W. (2011). *Statistics for engineers and scientists*. New York (NY): McGraw-Hill.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M., Beebe, D., Oates, P., Hammes, H. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787–790.
- Nissinen, O., Kalliainen, P., & Jauhiainen, L. (2008). Development of yield and nutritive value of timothy in primary growth and regrowth in northern growing conditions. *Agricultural And Food Science*, 19(3), 252. doi: 10.2137/145960610792912602
- Oliveira, A., Machado, O., Gomes, V., Xavier, J., Pereira, A., Vieira, J., Fernandes, K., Xavier, J. (1999). Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein Pept. Lett.*, 6, 15–21.

- 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*, *11*(7), e0159782. doi: 10.1371/journal.pone.0159782
- Osborne, T. (1924) *The vegetable protein*. Longmans Green, New York.
- Osborne, D. & Voogt, P. (1978). *The analysis of nutrient in foods*. London, UK: Academic Press.
- Owusu, R. (2002). Food protein analysis. New York: Marcel Dekker. Palada, M., Chang, L., Yang, R., & Engle, L. (2007). INTRODUCTION AND VARIETAL SCREENING OF DRUMSTICK TREE (*MORINGA* SPP.) FOR HORTICULTURAL TRAITS AND ADAPTATION IN TAIWAN. *Acta Horticulturae*, (752), 249-253. doi: 10.17660/actahortic.2007.752.40
- Palada, M., Chang, L., Yang, R., & Engle, L. (2007). Introduction and varietal screening of drumstick tree (*moringa* spp.) For horticultural traits and adaptation in taiwan. *Acta Horticulturae*, (752), 249-253. doi: 10.17660/actahortic.2007.752.40
- Peña, A. (2012). *Bioquímica*. México: Limusa.
- Paula, P., Sousa, D., Oliveira, J., Carvalho, A., Alves, B., & Pereira, M. et al. (2017). A Protein Isolate from *Moringa oleifera* Leaves Has Hypoglycemic and Antioxidant Effects in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Molecules*, *22*(2), 271. doi: 10.3390/molecules22020271
- Pérez, R., Godoy, R., Ibarra, B., & Sanchez, J. (2004). The Efficiency of Different Salts to Screen Charge Interactions in Proteins: A Hofmeister Effect?. *Biophysical Journal*, *86*(4), 2414-2429. doi: 10.1016/s0006-3495(04)74298-8
- Rham, O., & Jost, T. (1979). Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products. *Journal Of Food Science*, *44*(2), 596-600. doi: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb03844.x
- Rausch, W., Liu, S., Gille, G., Radad, K. (2006). Neuroprotective effects of ginsenosides. *Acta. Neurobiol. Exp (Wars)*. *66*, 369-375.
- Salcedo, B., Osuna, J., Guevara, F., Domínguez, J., Santamaría, M., Karkov, N., & Lübeck, M. (2019). Influence of the development stage of perennial forage crops for the recovery yields of extractable proteins using lactic acid fermentation. *Journal Of Cleaner Production*, *218*, 1055-1064. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.01.292
- Saucedo, S., Torres, J., Castro, C., Rojas, R., Sánchez, E., Ngangyo, M., & Martínez, G. (2018). *Moringa* plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food Research International*, *111*, 438-450. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.062

- Schwass, D., & Finley, J. (1984). Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 32(6), 1377-1382. doi: 10.1021/jf00126a040
- Serpa, A., Hincapié, G., & Álvarez, C. (2014). Determination of the isoelectric point of four leaf sources: cassava (*Manihot esculenta* Crantz) veronica and tai varieties, jatropha (*Jatropha curcas* L.) and gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect*, 12(1), 30-39. Retrieved from <http://SciELO.org>
- Shaw, K., Grimsley, G., Yakovlev, G., Makarov, A., & Pace, C. (2001). The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Science*, 10(6), 1206-1215. doi: 10.1110/ps.440101
- Sheng, Q., Yao, H., Xu, H., Ling, X., He, T. (2004). Isolation of plant insulin from *Momordica charantia* seeds by gelfiltration and RP-HPLC. *Zhong Yao Cai*, 27, 414-416.
- Tan, S., Mailer, R., Blanchard, C. & Agboola, S. (2011) Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and functional properties. *J Food Sci* 76, 16-28.
- Technical Bulletin Bradford Assay. (2019). Retrieved 16 August 2019, from <https://www.sigmaldrich.com/>
- Teixeira, E., Carvalho, M., Neves, V., Silva, M., & Arantes, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51-54. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.135
- Thrane, M., Paulsen, P., Orcutt, M., & Krieger, T. (2017). Soy Protein. *Sustainable Protein Sources*, 23-45. doi: 10.1016/b978-0-12-802778-3.00002-0
- Urribarrí, C., Ferrer, O., & Colina, A. (2004). Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(3), 268-279.
- Vilg, J., & Undeland, I. (2016). pH-driven solubilization and isoelectric precipitation of proteins from the brown seaweed *Saccharina latissima*—effects of osmotic shock, water volume and temperature. *Journal Of Applied Phycology*, 29(1), 585-593. doi: 10.1007/s10811-016-0957-6
- Viteri, D., & Álvarez, J. (2018). *Development of a Film Based on Oxidized Ipomea Botatas L. Starch with Protein Encapsulation for Potential Skin Tissue Engineering Applications (Engineering)*. Universidad San Francisco de Quito.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0
- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, 7(3), 1251-1265. doi: 10.1039/c5fo01530h

Zayas, J. (2013). *Functionality of Proteins in Food*. Berlin: Springer Berlin.

Zhang, C., Sanders, J., & Bruins, M. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass And Bioenergy*, *67*, 466-472. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.020

Zhang, C., Sanders, J., Xiao, T., & Bruins, M. (2015). How Does Alkali Aid Protein Extraction in Green Tea Leaf Residue: A Basis for Integrated Biorefinery of Leaves. *PLOS ONE*, *10*(7), e0133046. doi: 10.1371/journal.pone.0133046