

Ciudad Obregón, Sonora, a 3 de Febrero de 2012.

Instituto Tecnológico de Sonora  
P r e s e n t e.

El que suscribe Pedro Alberto Duarte Portillo, por medio del presente manifiesto bajo protesta de decir verdad, que soy autor y titular de los derechos de propiedad intelectual tanto morales como patrimoniales, sobre la obra titulada:

**“Aislamiento y caracterización de las fracciones protéicas de la semilla de *Moringa oleifera*.”**

En lo sucesivo “LA OBRA”, misma que constituye el trabajo de tesis que desarrollé para obtener el grado de: Maestro en Ciencias en Recursos Naturales, en ésta casa de estudios, y en tal carácter autorizo al Instituto Tecnológico de Sonora, en adelante “EL INSTITUTO”, para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios del objeto del Instituto, es decir, sin fines de lucro, por lo que la presente autorización la extiendo de forma gratuita.

Para efectos de lo anterior, EL INSTITUTO deberá reconocer en todo momento mi autoría y otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente de LA OBRA.

De igual forma, libero de toda responsabilidad a EL INSTITUTO por cualquier demanda o reclamación que se llegase a formular por cualquier persona, física o moral, que se considere con derechos sobre los resultados derivados de la presente autorización, o por cualquier violación a los derechos de autor y propiedad intelectual que cometa el suscrito frente a terceros con motivo de la presente autorización y del contenido mismo de la obra.

*Pedro A. Duarte P.*

**Pedro Alberto Duarte Portillo**  
(Nombre y firma del autor)



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**  
**DIRECCIÓN ACADÉMICA DE RECURSOS NATURALES**

---

---

---

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS  
FRACCIONES PROTEICAS DE LA SEMILLA DE  
*Moringa oleifera*”**

TITULACION POR TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

**PEDRO ALBERTO DUARTE PORTILLO**

---

---

## DEDICATORIA

*A mi abuela Carmen Serna “Chula”, por quien quise ser un científico desde muy pequeño, me educó en la fe, y me enseñó a valorar lo que la tierra nos da, los vegetales frescos del campo, la fruta recién cortada, los huevos del gallinero, la leche de establo, los guajolotes, el canto del gallo, y ese aroma a café tostado en la hornilla y las tortillas de harina al despertar. No teníamos dinero, pero siempre fuimos ricos, pero por nuestras carencias, el Espíritu Santo me entregó el don que hoy profeso.*

*A mi primo Omar por crecer conmigo compitiendo por todo en la vida, así mejoramos cada cosa que hacíamos, formando el mejor equipo al enfrentar diversas situaciones y compartir los momentos más felices de la infancia, y ahora solo en sueños nos encontramos.*

*A mi tía Rosario, siempre admirada por su fortaleza y alegría, siempre con ánimos de bromas, tan cariñosa, quien siempre me recibía como uno más de sus hijos.*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por todo lo que me ha dado como quitado, y por lo que tiene preparado a mi familia y para mí.*

*A mis padres Alberto y Graciela, que cambiaron tanto, para bien, y me enseñaron que aunque la vida parezca fácil se requiere un esfuerzo extra para lograr el éxito, y a enfrentar las situaciones difíciles con actitud positiva, pero sobre todo: Gracias por no dejarme ser “uno más del montón”.*

*A mi esposa, por la familia que juntos hemos formado, por apoyarme en todo y estar a mi lado durante todo mi desarrollo profesional, y seguir adelante a pesar de todas las dificultades por los que hemos pasado.*

*A mis hijas que son el mayor motivo que tengo para superarme y vivir saludablemente.*

*A la Dra. Gabriela Ramos Clamont-Montfort, de quien aprendí que sin importar el título, podemos ser humildes.*

*Al Dr. Jaime López Cervantes, por demostrarme que una pequeña idea bien trabajada puede generar cambios en el mundo.*

*A la Dra. Dalia Isabel Sánchez Machado, por su asesoría para tomar el camino correcto para “hacer ciencia”.*

*Al Dr. Luis Jesús Vargas Pérez, por enseñarme que nunca es demasiado tarde, para triunfar en la vida, haciendo lo que nos gusta y disfrutando con la familia.*

*A mis compañeros José Núñez y Rubén Rodríguez, por sus consejos profesionales y por la amistad que hemos cultivado. Igualmente Ana Escárcega, por su paciencia para coordinar actividades del laboratorio y dedicar tiempo para apoyarnos en el trabajo.*

*A la Dra. Olga Nydia Campas Baypoli, por motivar mi decisión para ingresar a la maestría, y así comenzar la etapa que con el presente trabajo concluyo.*

---

---

## INDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
I. INTRODUCCION	
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo general	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
1.5. Hipótesis	7
1.6. Delimitaciones	7
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. El árbol <i>Moringa oleifera</i>	8
2.1.1. Descripción botánica	8
2.1.2. Origen y distribución	10
2.1.3. Composición química	11
2.1.4. Aplicaciones	11
2.2. Proteínas y aminoácidos	13
2.2.1. Importancia nutricional	16
2.2.2. Clasificación	17
2.2.3. Importancia Industrial	18
2.2.4. Métodos de determinación	18
2.3. Separaciones	19
2.3.1. Extracción	20
2.3.2. Diálisis	21
2.3.3. Liofilización	22
2.4. Cromatografía	22
2.4.1. Definición y generalidades	22
2.4.2. Exclusión molecular	23
2.4.3. Electroforesis	24

---

---

2.4.4. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	26
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Ubicación del experimento	29
3.2. Recolección de la muestra	29
3.3. Reactivos químicos	30
3.4. Caracterización de la semilla	31
3.4.1. Humedad	31
3.4.2. Lípidos totales	32
3.4.3. Minerales totales	32
3.4.4. Proteína cruda	33
3.5. Preparación de la muestra	33
3.5.1. Desgrasado de la SMO	33
3.5.2. Extracción de proteínas	34
3.5.3. Purificación del extracto	35
3.6. Separación de proteínas	35
3.6.1. Empaque de la columna	36
3.6.2. Fraccionado de la muestra	37
3.7. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes	39
3.7.1. Equipo y preparación del gel	39
3.7.2. Desnaturalización y aplicación de muestras	40
3.7.3. Revelado del gel	41
3.8. HPLC en fase reversa (RP-HPLC)	42
3.8.1. Hidrólisis de las fracciones proteicas	42
3.8.2. Derivatización de aminoácidos	43
3.8.3. Equipo y condiciones para HPLC	44
3.8.4. Identificación	45
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. Análisis proximal	47
4.2. Extracción de proteínas	48
4.3. Aislamiento de proteínas	50
4.4. Fraccionado de proteínas	
4.5. Análisis de aminoácidos	55

---

---

V. CONCLUSIONES	62
Vi. REFERENCIAS	63

### INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Moringa oleifera</i> .	9
Figura 2. Hojas de <i>Moringa oleifera</i> .	9
Figura 3. Flores de <i>Moringa oleifera</i> .	10
Figura 4. Frutos de <i>Moringa oleifera</i> .	10
Figura 5. Semillas de <i>Moringa oleifera</i> .	13
Figura 6. Estructura de un zwitterión.	16
Figura 7. Esquema del proceso de diálisis.	22
Figura 8. Mecanismo de la cromatografía de exclusión molecular.	24
Figura 9. Migración de especies cargadas por electroforesis.	25
Figura 10. Columnas para HPLC.	27
Figura 11. Muestras de semilla de <i>Moringa oleifera</i> ,	30
Figura 12. Determinación de humedad de SMO por secado atmosférico.	31
Figura 13. Cuantificación de lípidos en la SMO.	32
Figura 14. Cuantificación de minerales totales de SMO.	33
Figura 15. Cuantificación de nitrógeno total por el método Kjeldhal.	34
Figura 16. Extracción de proteínas de SMO desgrasada.	34
Figura 17. Procedimiento de diálisis.	35
Figura 18. Liofilización del extracto proteico dializado.	36
Figura 19. Preparación del empaque para columna de cromatografía.	36
Figura 20. Fraccionado de proteínas por exclusión molecular.	38
Figura 21. Espectrofotometría de absorción UV-Vis.	39
Figura 22. Preparación de estándares y muestras por el método de Bradford.	40
Figura 23. Desnaturalización de las proteínas para SDS-PAGE.	41
Figura 24. Equipo de electroforesis cargado con muestras de proteína.	42
Figura 25. Tinción del gel en solución azul de Coomassie.	43
Figura 26. Extracción e hidrólisis ácida de las fracciones proteicas del EP MO	44
Figura 27. Derivatización de aminoácidos de las fracciones proteicas.	44
Figura 28. Sistema HPLC Varian Pro Star 800.	45
Figura 29. Extractos a partir de SMO pulverizada.	48

---



---

Figura 30. Extractos después de 24 horas en refrigeración.	49
Figura 31. Electroforesis en gel de poliacrilamida con doudecil sulfato de sodio.	50
Figura 32. Proteína de SMO liofilizada	51
Figura 33. Separación de diferentes concentraciones de EPMO.	52
Figura 34. Cromatografía de exclusión molecular o permeación en gel.	52
Figura 35. Recta de calibración método Bradford.	53
Figura 36. Confirmación de la separación de las fracciones de EPMO	55
Figura 37. Peso molecular de las fracciones proteicas de SMO.	56
Figura 38. Cromatograma de los estándares de aminoácidos.	56
Figura 39. Cromatograma de aminoácidos de la fracción coagulante de SMO.	57
Figura 40. Distribución de los aminoácidos en la fracción coagulante de SMO.	57
Figura 41. Cromatograma de los aminoácidos de la fracción de 20 KDa de SMO.	58
Figura 42. Distribución de aminoácidos en la fracción no coagulante de 20 KDa.	59
Figura 43. Cromatograma de aminoácidos de la fracción no coagulante de SMO con mayor peso molecular.	60
Figura 44. Distribución de aminoácidos en la fracción no coagulante de SMO, de mayor peso molecular.	60

### INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales aplicaciones reportadas de las diferentes partes del árbol de <i>Moringa oleifera</i>	15
Tabla 2. Estructura de los 20 aminoácidos, que conforman las proteínas.	16
Tabla 3. Métodos empleados para desgrasar la semilla de moringa oleífera.	21
Tabla 4. Métodos empleados para extraer las proteínas de la SMO.	22
Tabla 5. Gradiente empleado en la separación de los aminoácidos por HPLC	47
Tabla 6. Composición proximal de la semilla de <i>Moringa oleifera</i> .	48
Tabla 7. Concentración de minerales del extracto proteico antes y después de dializar, y el agua de dializado.	52
Tabla 8. Contenido de proteínas obtenido mediante el método de Bradford	55



---

---

## RESUMEN

La intención del presente trabajo fue fraccionar las proteínas de la semilla de *Moringa oleifera*, identificar peso molecular y perfil de aminoácidos de las mayores fracciones. Para lograrlo se realizaron extractos de proteína a partir de la semilla con diferentes soluciones y se utilizaron técnicas de separación preparativas como diálisis y cromatografía líquida (LC) de exclusión molecular, la confirmación de la efectividad de cada uno de los procedimientos anteriores se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de duodecil-sulfato de sodio (SDS), por último para determinar el perfil de aminoácidos de cada fracción se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detector de fluorescencia. Se encontró buena separación del péptido coagulante por exclusión molecular, en total se encontraron tres fracciones principales: una con peso molecular inferior a 14 KDa, otra de peso intermedio alrededor de 20 KDa y la de mayor peso fue cercano a los 66 KDa, mientras que el análisis de aminoácidos por HPLC muestra que glicina fue el de mayor presencia para las tres fracciones, lisina fue el segundo mas abundante en las fracciones de mediano y mayor peso molecular, en su lugar la fracción de menor peso contiene histidina. Este trabajo demuestra la viabilidad de la columna empleada, para trabajos posteriores con el péptido coagulante, y sugiere que varias de las propiedades que se le atribuyen a la semilla pueden estar relacionadas con los aminoácidos que contiene.

---

---

### **1.1. Antecedentes**

A lo largo de su existencia la humanidad ha utilizado plantas y derivados de origen vegetal como alimento, fuente de esencias, colorantes y medicina, además de aprovechar a la madera y el papel. A partir de los vegetales se han aislado diferentes compuestos de interés, y con el conocimiento adquirido en el proceso es posible identificar fuentes alternativas de esos componentes y proponer nuevas áreas de aplicación.

En la actualidad se tiene interés en varias especies vegetales entre ellas el árbol de *Moringa oleifera* El cual fue introducido a Sonora en el año 2001, en apoyo a programas de nutrición de organismos internacionales mediante la Fundación para el Apoyo Infantil (FAI).

Es un árbol originario de la India que muestra gran número de aplicaciones en el tratamiento de enfermedades agudas como infecciones, dolores, fiebre, cálculos renales, y algunas enfermedades virales. También reportan efectos positivos contra padecimientos crónico-degenerativos como el cáncer y la diabetes mellitus (Roy y cols., 2007; Jaiswal y cols., 2009; Rastogi y cols., 2009).

En general es un alimento rico en micro y macronutrientes. Los frutos son ricos en ácido ascórbico y otras vitaminas, mientras que las hojas poseen un perfil de aminoácidos

---

---

similar a la proteína de soya (Richter y cols., 2003; Reyes-Sanchez y cols., 2006; Salem y Makkar, 2009). También es muy útil como agente antioxidante por su alto contenido de tocoferoles, diversos flavonoides, glucosinolatos y otros fitoquímicos, dependiendo del tejido de la planta que se trate (Sánchez-Machado y cols., 2006; Anwar y cols., 2007; Verma y cols., 2009; Amaglo y cols., 2010).

La semilla de Moringa posee un alto contenido de aceite comestible de excelente calidad (Rashid y cols., 2009), y también es utilizada como agente coagulante para el tratamiento de aguas (Muyibi y cols., 1995, 1999, 2002; Ndabigengesere y cols., 1995, 1998).

Gassenschmidth y cols. (1995), caracterizaron el agente responsable de la capacidad coagulante, encontrando que es un polipéptido con peso molecular entre 6.5 y 7 KDa, resultados que fueron confirmados por Ndabigengesere y cols. (1995). Posteriormente, Ghebremichael y cols. (2005, 2006) han trabajado en el desarrollo de métodos sencillos para la obtención de la proteína coagulante, y evaluando dicha capacidad.

---

---

## **1.2. Planteamiento del problema**

El árbol de *Moringa oleifera* es un árbol de rápido crecimiento y que prospera en climas áridos. En el Sur de Sonora se ha incrementado su cultivo porque presenta un alto valor nutricional y posee beneficios a la salud (<http://www.faison.org/programas/>, 2008).

En un programa gubernamental para el municipio de Huatabampo, en el Sur de Sonora, se otorgaron varias plantas por familia para el desarrollo de diversas actividades en apoyo a su economía. Sin embargo, trabajos con la semilla no se contemplan entre dichas actividades (<http://www.lafuerzadelvalle.com>, 2010).

Una actividad económica rentable para los productores sería la comercialización de la semilla de *moringa* para la extracción de su aceite a nivel industrial, y aprovechar el bagazo resultante para el tratamiento de aguas como lo hacen en otros países, o como ya se manejan los subproductos de otras oleaginosas en la industria aceitera.

---

---

Entre los productos de la extracción del aceite de soya están la proteína texturizada utilizada en la preparación de alimentos de consumo general, y los hidrolizados proteicos que se usan como suplemento o para enriquecimiento de jugos de fruta por considerarse una proteína de buena calidad nutricional (Agrawal y cols., 2004).

Al ser una semilla con alto contenido de aceite constituido principalmente por ácidos grasos de cadena larga, y que son utilizados como reserva energética por el embrión de la planta, requieren la participación del transportador L-carnitina para su transformación en energía por beta-oxidación (Knuttel-Gustavsen y Harmeyer, 2006). A esta molécula también se le atribuyen capacidad antioxidante y regenerador neuronal (Hussein y cols., 2009; Wilson y cols., 2009; Gomez-Amores y cols., 2009), lo cual sugiere que la semilla de *Moringa oleífera* (SMO) contiene este metabolito o sus precursores, que son lisina y metionina (Izadi y cols., 2009).

La calidad nutricional de una proteína depende de su perfil de aminoácidos, digestibilidad y biodisponibilidad (Yu-Hui y cols 1999). La interrogante que se presenta es: ¿Cuál será el perfil de aminoácidos de las principales proteínas no coagulantes que contiene la semilla de *Moringa oleifera*?

---

---

### **1.3. Justificación**

Foidl y cols., 2001, mencionan el gran potencial de este vegetal como fuente de alimento, por su valor nutricional, la facilidad en el manejo del cultivo y la capacidad de producción a corto plazo.

La semilla de *Moringa* contiene alrededor de 30 y 40 % (p/p) de aceite (Rashid y cols., 2008) de muy buena calidad, y el residuo resultante posee un alto contenido de proteínas, que varía según la región de 49 a 70%, y 60.33% en plantas cultivadas en Sonora (Rodríguez-Núñez, 2009). Este residuo es utilizado en algunos países para el tratamiento de aguas residuales como agente floculante o en la alimentación animal, incluso después de tratar el agua se aprovecha como fertilizante (Ghebremichael y cols., 2005).

En algunas comunidades del Sur de Sonora existen huertas de este árbol, con más de 70 hectáreas sembradas. En promedio, cada árbol tiene una producción de 500 kilogramos de semilla descascarillada en un año (Foidl y cols., 2001), y dependiendo de la densidad de cultivo se pueden obtener hasta 13 toneladas por hectárea. Si se procesa el total de la semilla cosechada es posible extraer alrededor de 280,000 litros de aceite al año, llegando a generar ingresos totales superiores a los \$ 3,000,000.00 anuales por esta actividad.

---

---

Las investigaciones previas sobre la semilla de *Moringa oleifera* se enfocan en las propiedades del aceite y en los péptidos responsables de la capacidad coagulante, éstas constituyen alrededor del 1% del contenido total de proteínas (Foidl y cols., 2001). Pero, no se ha encontrado información acerca de las proteínas restantes de esta semilla.

Al establecer un procedimiento rentable para la separación del péptido coagulante a partir del residuo como lo sugieren diversos autores, y se comercializara el remanente como suplemento alimenticio por las proteínas no coagulantes, además de los alcaloides y antioxidantes que contiene, se pudieran triplicar las ganancias.

En la mayoría de los casos los residuos generados por cualquier industria al no ser tratados adecuadamente pueden provocar contaminación del ambiente por proliferación de fauna nociva o enfermedades infecciosas principalmente cuando se trata de materia orgánica rica en nutrientes.

Por lo anterior, se considera pertinente realizar la caracterización de las principales proteínas presente en la semilla de *Moringa oleifera*, en el laboratorio de Tecnología de alimentos ubicado en el edificio CIIBAA (Centro de Innovación e Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental) del Instituto Tecnológico de Sonora unidad Obregón centro, debido a que se cuenta con el equipo necesario y profesionales con el nivel requerido para este tipo de investigación.

---

---

#### **1.4. Objetivo general**

Aislar las principales fracciones proteicas de la semilla de *Moringa oleifera* para su caracterización fisicoquímica mediante métodos cromatográficos.

##### **1.4.1 Objetivos específicos**

- Extraer las proteínas del residuo desgrasado de la semilla
- Purificar el extracto proteico por diálisis y liofilizado
- Separar las fracciones proteicas por cromatografía de exclusión molecular
- Estimar el peso molecular de cada fracción por electroforesis
- Identificar el perfil de aminoácidos de cada fracción por cromatografía de líquidos.

#### **1.5. Hipótesis**

Las proteínas no coagulantes de la semilla de *Moringa oleifera* presentan buen perfil de aminoácidos para suplemento nutricional.

#### **1.6. Delimitaciones**

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Tecnología de Alimentos, Bromatología y Nutrición ubicado en las instalaciones del CIIBAA en la unidad Centro del ITSON por las calles 6 de Abril y Chihuahua, en Ciudad Obregón, Sonora, México.



---

---

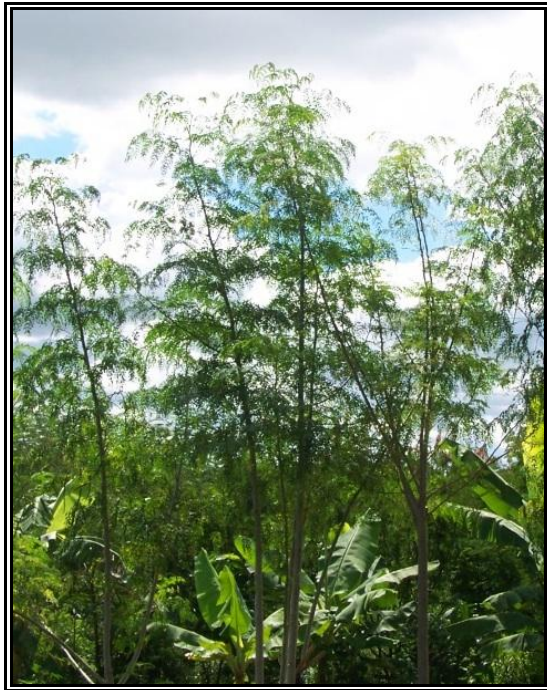
## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. El árbol *Moringa oleífera***

#### **2.1.1. Descripción botánica**

El árbol de Moringa (figura 1), proviene de la familia *Moringaceae* de árboles y arbustos, pertenece al género *Moringa* del cual hay 14 especies entre las que *oleífera* ha ganado popularidad por sus beneficios (Gasseneschmidt y cols., 1995; Abdulkarim y cols., 2005). Posee varios nombres regionales derivados de la raíz “Morunga”. En inglés se conoce como: árbol de rábano, árbol palo de tambor, el que nunca muere, el árbol de Ben y otros nombres (Makkar y Becker, 1996; Foidl y cols., 2001), tiene una alta tasa de crecimiento hasta 4 m por año, y puede medir de 5 hasta 15 m (Sánchez-Machado y cols., 2006).

En los primeros años sus tallos son rectos, delgados y flexibles, pero con el tiempo se tornan leñosos y se fortalecen, posee raíces tuberosas y profundas. Las hojas (figura 2) son compuestas, pecioladas con forma elíptica, miden de 1 a 2 cm de diámetro, dispuestas en posición alterna, y se encuentran organizadas en forma de racimo (<http://www.botanical-online.com/hojastipos.htm>).



**Figura 1.** Árbol de *Moringa oleifera*.

Fuente: [www.beeglorious.com/moringa-oil.html](http://www.beeglorious.com/moringa-oil.html)

Posee pequeñas flores blancas de 2 a 3 cm (figura 3), tienen un aspecto similar al azahar de cítricos, pueden brotar varias veces al año. Los frutos (figura 4) son vainas que miden de 20 a 50 cm con forma de prisma triangular, comestibles cuando están frescos, tienen textura fibrosa y humectada, ligeramente dulce e irritante. Las semillas (figura 5) son redondas y blancas similares al garbanzo, tienen una cubierta rígida de color café a negro, poseen tres crestas papiráceas, en general miden alrededor de 3 cm enteras y 1 cm descascarillada.



**Figura 2.** Hojas de *Moringa oleifera*.



**Figura 3.** Flores de *Moringa oleifera*.

### **2.1.2. Origen y distribución**

Al parecer es originaria del Noroeste de la India, donde hace miles de años que se cultiva. Actualmente se distribuye por África, Medio Oriente, sureste de Asia, el Pacífico, las Islas del Caribe, Centro y Norteamérica. Prospera mejor en climas tropicales soleados, abunda cerca de arenas en ríos y arroyos, aunque es muy adaptable, ya que tolera rangos de lluvia de 25 a mas de 300 cm por año, resiste suelos deficientes y pH de 5.0 a 9.0 (Rashid y cols., 2008; Foidl y cols., 2001).



**Figura 4.** Frutos de *Moringa oleifera*.

---

---

### 2.1.3. Composición química

En general posee un alto contenido de carbohidratos, aminoácidos, flavonoides, glucósidos, esteroides, alcaloides y taninos (Rastogi y cols., 2009). La raíz contiene alcaloides (*Moringina* y *Moringinina*), y un antibiótico (*pterigospermina*).

Las hojas son ricas en vitamina C, tocoferol (Sanchez-Machado y cols., 2006), proteínas, caroteno, bencilnitrilos, N-bencil carbamatos, tiocarbamatos, calcio, fósforo, selenio, (Jaiswal y cols, 2009), niaririna, niazinina, isotiocianato, niacinamina A y B (Karadi y cols., 2006).

La composición proximal de los frutos es de 3.7 % carbohidratos, 2.5 % proteína, 0.1 % de grasa, 4.8 % fibra, y 2 % minerales, son ricos en ácido ascórbico y aminoácidos libres, también poseen un benciléster que estimula la producción de insulina (Jaiswal y cols., 2009).

Las semillas poseen 7-9 % de humedad, 6-7 % minerales, 37-40 % proteína cruda, 4-5% de fibra cruda y 28-32 % de aceite, destacando ácido behénico (C22:0), lignocérico (C24:0), pentadecanóico, pentadecenóico y trazas de ácido láurico. (Abdulkarim y cols., 2005). Contiene un péptido coagulante, con peso molecular alrededor de 13 KDa, y punto isoeléctrico entre 10 y 11 (Muyibi y cols., 2002).

### 2.1.4. Aplicaciones

En la antigüedad ya se conocía su valor contra diferentes enfermedades (Karadi y cols., 2006), sus acciones farmacológicas han sido muy utilizadas tradicionalmente (Rastogi y cols., 2009). La mayor parte del árbol se utiliza como alimento (Chumark y cols., 2008), posee actividad antimicrobiana. (Fakurazi y cols., 2008). Los extractos etílicos de toda la planta muestran actividad anticancerígena (Roy y cols., 2007), de los tallos se extraen analgésicos y antibióticos, aunque se utilizan más para alimentación animal, y el tronco para producción de papel (Jaiswal y cols., 2009).

---

---

Las hojas frescas sirven de alimento y conservador de comidas ricas en grasa, por su alto contenido de antioxidantes (Sánchez-Machado y cols., 2006), tienen efecto antiulceroso, diurético, antiinflamatorio, y cicatrizante. Los extractos etílicos muestran actividad antifúngica, mientras que el extracto metílico posee un efecto depresivo del Sistema Nervioso Central (Jaiswal y cols., 2009), relacionado con los compuestos con actividad hipotensiva reportados (Karadi y cols., 2006).

Del exudado de las hojas se obtiene un gel aplicable para la industria farmacéutica (Panda y cols., 2006). El extracto acuoso tiene actividad anticonceptiva, regula la tiroides en ratas (Jaiswal., 2009), y es promotor de crecimiento (Roy y cols., 2007).

La raíz se utiliza como condimento picante, son útiles para tratar lumbago, gota, asma, problemas hepáticos, inflamaciones y cálculos renales. También se han estudiado por su actividad diurética y antiinflamatoria (Karadi y cols., 2006). En té son cardiotónico y estimulante (Chumark y cols., 2008), y tiene cierto efecto antiviral (Roy y cols., 2007), preparada en pasta reduce dolor e inflamación por artritis reumatoide (Rastogi y cols., 2009).

Las flores son estimulantes, diurético y beneficia el flujo de bilis, y un extracto metílico del fruto estimula la liberación de insulina en roedores, e inhibe la enzima ciclogenasa y la peroxidación de lípidos (Jaiswal y cols., 2009).

El aceite de semilla posee un sabor suave, parecido al cacahuate, es usado para cocinar y en ensaladas gourmet, su composición es similar al aceite de oliva, por lo que puede ser su competencia en el mercado (Abdulkarim y cols., 2005), es resistente a la degradación oxidativa, y utilizado en perfumería, además tiene potencial para la producción de biodiesel (Rashid y cols., 2008).



**Figura 5.** Semilla de *Moringa oleifera* entera y descascarillada.

El bagazo de la extracción del aceite posee propiedades coagulantes para el tratamiento de aguas (Muyibi y cols., 2002), que han sido muy utilizadas en países africanos y asiáticos (Santos y cols., 2005), incluso la semilla pulverizada sin desgrasar puede remover ciertos metales pesados (Kumari y cols., 2005). El agente coagulante es un péptido que actúa como polímero catiónico, y purificado parece ser más efectivo que el alumbre (Muyibi y cols., 2002). En la tabla 1 se muestran las principales aplicaciones de las diferentes partes del árbol *Moringa oleífera*.

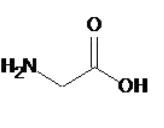
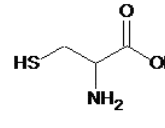
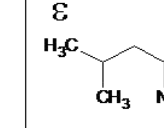
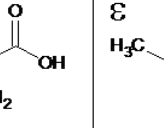
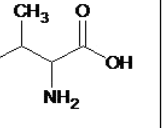
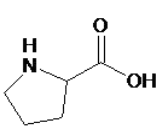
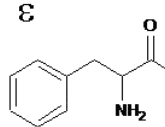
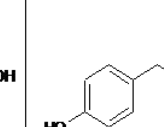
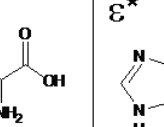
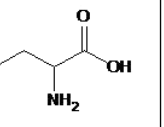
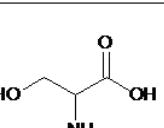
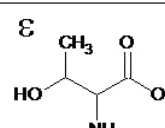
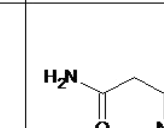
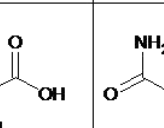
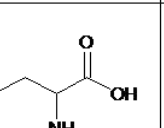
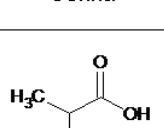
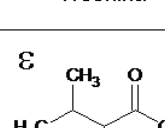
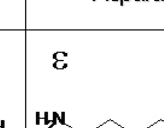
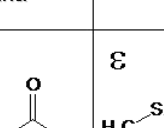
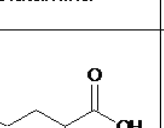
## **2.2. Proteínas y aminoácidos**

La palabra proteína, viene del griego “proteios” que significa “primordial” o “primer lugar”, sugerida por Berzelius (1838). Son macromoléculas presentes en todos los organismos, formadas por varios  $\alpha$ -aminoácidos, sintetizados por los vegetales a partir de nitratos y otros elementos, que a través de las cadenas tróficas forman parte de otros organismos (Raven y Berg, 2004). Son de gran importancia en la nutrición y se han introducido a la industria (Badui-Dergal, 2006).

**Tabla 1.** Principales aplicaciones reportadas de las diferentes partes del árbol de *Moringa oleifera*

Parte	Aplicaciones	Autor
Hojas	Suplemento. Digestivo. Antioxidante. Antipirético. Analgésico. Antibacterial. Hipocolesterolémico. Hipolipidémico. Hipotensivo. Hipoglucémico. Regulador de tiroides y hepatoprotector Extracto etílico antifúngico y contra enfermedades oculares.	Folkard y Sutherland, 1996 Roy y cols., 2007 Katayon y cols., 2006 Bhuptawat y cols., 2007 Chumark y cols., 2008 Fakurazi y cols., 2008 Verma y cols., 2009
Flores, frutos y raíces	Alimentos ricos en nutrientes- Estimulante, diurético, aumenta el flujo de bilis. Hepatoprotector. Analgésico y antiinflamatorio. Hipotensivo, quimiomodulador.	Roy y cols., 2007 Katayon y cols., 2006 Rastogi y cols., 2009 Verma y cols., 2009
Raíces	En pasta para inflamación y dolores artríticos. Disminuir irritación y erupciones cutáneas.	Rastogi y cols., 2009 Verma y cols., 2009 Anwar y cols, 2007
Semillas	En ungüento sirve para tratamiento de infecciones dermatológicas. Pulverizadas como agente floculante para tratamiento de aguas. Aceite comestible de buena calidad, se puede producir jabón, cosméticos, biocombustible, etc. El bagazo de la extracción del aceite como agente coagulante, mejor que sin desgrasar. También sirve para acondicionar suelos o alimento. Posee alcaloides, antibióticos, y efecto antitumoral.	Muyibi y cols., 1995, 1996, 2001, 2002 Folkard y Sutherland 1996 Anwar y cols., 2003 Ghebremichael y cols., 2006 Bhatia y cols., 2007 Bhuptawat y cols., 2007 Roy y cols., 2007 Katayon y cols., 2008 Rashid y cols., 2008 Verma y cols., 2009
Aceite de SMO	Se aplica sobre afecciones de la piel. Mezclado con aceite comestible mejora su estabilidad térmica.	Abdulkarim y cols., 2005 Anwar y cols., 2007
Corteza	Adsorbente de metales pesados. Resina antimicrobiana.	Kumar-Reddy y cols., 2010 Rastogi y cols., 2009

Existen 20 aminoácidos comunes que emplean los organismos como bloques para sintetizar sus proteínas. Diez se consideran esenciales porque el cuerpo humano no los sintetiza, solo dos de estos son para niños. Su conformación estructural es un grupo amino unido al carbono “α” contiguo al carboxilo, a este carbono también se une un grupo “R”, cuya naturaleza química influye en sus propiedades fisicoquímicas (tabla 2) (Badui-Dergal, 2006).

 Glicina	 Cisteína	$\epsilon$  Leucina	$\epsilon$  Isoleucina	 Acido Aspártico
 Prolina	$\epsilon$  Fenilalanina	 Tirosina	$\epsilon^*$  Histidina	$\epsilon$  Triptófano
 Serina	$\epsilon$  Treonina	 Asparagina	 Glutamina	$\epsilon^*$  Arginina
 Alanina	$\epsilon$  Valina	$\epsilon$  Lisina	$\epsilon$  Metionina	 Acido Glutámico

$\epsilon$  = Esenciales,  $\epsilon^*$  = Esenciales solo para niños

**Tabla 2.** Estructura de los 20 aminoácidos, que conforman las proteínas.

En disolución acuosa, los aminoácidos muestran un comportamiento anfótero, dependiendo del pH pueden ionizarse, como ácido carboxílico, liberando protones y quedando el radical ( $-\text{COO}^-$ ), o como base por los grupos  $-\text{NH}_2$  que captan protones, quedando como ( $-\text{NH}_3^+$ ), o comportarse como ácido y base a la vez, apareciendo una forma dipolar iónica llamada zwitterion (figura 6) (Horton, 2008).



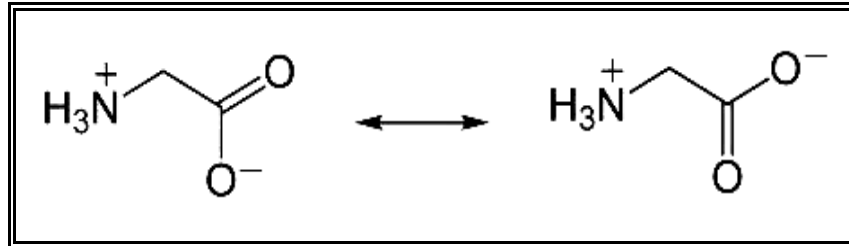


Figura 6. Estructura de un zwitterion

### 2.2.1. Importancia nutricional

Las proteínas no aportan la mayor cantidad de energía, pero constituyen uno de los nutrimentos de mayor trascendencia en los seres vivos, debido a que poseen muchas funciones biológicas.

Forman estructuras de soporte como el colágeno y la queratina, constituyen los principales tejidos del organismo, como cabello, uñas, tendones y huesos, así mismo conforman diferentes fluidos corporales entre ellos algunas hormonas y enzimas responsables de diversas funciones vitales, algunas sencillas como la degradación de nutrientes, síntesis de metabolitos y estructuras, o bien, otras demasiado complejas como la división celular (Horton, 2008).

Algunas proteínas transportan ciertos elementos o nutrimentos, la hemoglobina transporta oxígeno y dióxido de carbono entre células y pulmones, la insulina transporta la glucosa al interior de la célula, en la mitocondria hay una serie de proteínas que transportan electrones hasta el oxígeno en la respiración. También forman anticuerpos, capaces de identificar y eliminar sustancias extrañas como virus, bacterias etc., cumpliendo su función en el sistema inmune (Horton, 2008).

Ciertas proteínas o péptidos de cadena corta poseen actividad biológica que resulta importante en diversos procesos metabólicos para el mantenimiento de la homeostasis, antimicrobianos, antioxidantes y estimulante o depresiva del sistema nervioso central (Badui-Dergal, 2006).

---

---

Algunos aminoácidos poseen actividad antioxidante, antimicrobiana y son indispensables para ciertas funciones metabólicas por ser precursores de hormonas y otros metabolitos. Además confieren ciertos sabores a los alimentos como el dulce, amargo o picante (Badui-Dergal, 2006), sabores característicos que presentan las flores, raíces y semillas de *Moringa oleifera*.

### **2.2.2. Clasificación**

Existen dos clases de proteínas que difieren por su conformación: proteínas fibrosas y proteínas globulares.

Las proteínas fibrosas se constituyen por cadenas polipeptídicas alineadas en forma paralela, estas pueden producir dos macro-estructuras diferentes: doble hélice como la  $\alpha$ -queratina del cabello; o bien, láminas como las  $\beta$ -queratinas de las sedas naturales. Estas proteínas poseen alta resistencia, por eso son los principales soportes estructurales de los tejidos, son insolubles en agua y en soluciones salinas diluidas, en general son más resistentes al daño físico y factores que las desnaturalizan (Horton, 2008).

Las proteínas globulares son conformaciones de cadenas polipeptídicas que se enrollan sobre si mismas en formas intrincadas como una bola de estambre. El resultado es una macro-estructura de tipo esférico. La mayoría de estas proteínas son solubles en agua y por lo general desempeñan funciones de transporte en el organismo y como enzimas (Horton, 2008).

Por su composición se clasifican en simples y conjugadas, al hidrolizarse las simples solo producen aminoácidos, y las conjugadas liberan aminoácidos y otros compuestos orgánicos o inorgánicos, estas a su vez se sub-clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo prostético, o parte no- proteica (Horton, 2008).

---

---

### **2.2.3. Importancia industrial**

La aplicación de las proteínas en la industria alimentaria es muy común, sacando provecho principalmente de sus propiedades funcionales como emulsificante, espumante, gelificante, componente para películas comestibles o edulcorantes. Otra manera de aprovecharlas es como ingrediente de suplementos nutricionales, concentrados o hidrolizados de proteína y aminoácidos libres, con la posibilidad de emplearlos para enriquecer alimentos o consumo directo (Badui-Dergal, 2006).

### **2.2.4 Métodos de determinación.**

La determinación del contenido de proteínas más común es a partir del nitrógeno presente en la muestra, ya que su estructura está formada de aminoácidos y la proporción de nitrógeno entre ellos es similar. Para determinar el contenido de proteína total o bruta en base al contenido de nitrógeno (N), se debe eliminar toda la materia orgánica, este proceso se denomina digestión, la muestra se somete a una oxidación con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalizadora (sales y óxidos que ayudan a las reacciones del oxígeno, e incrementar el punto de ebullición). El resultado de este proceso es sulfato de amonio, que por un tratamiento alcalino se transforma en hidróxido de amonio, y por arrastre con vapor se destila hacia un recipiente con ácido bórico, en este se realiza una titulación con ácido clorhídrico o sulfúrico valorado.

El contenido de proteína de la muestra se calcula teniendo en cuenta el contenido medio de nitrógeno de la muestra y un factor de conversión específico. El resultado de este análisis puede ser influenciado por la presencia de compuestos orgánicos nitrogenados en la muestra (Skoog, 2005; Garritz, 1998).

También existen métodos fotométricos, en los que se determina la concentración de las proteínas en base a la absorción de luz a una longitud de onda específica aplicando la ley de Lambert-Beer, por ejemplo, ciertos aminoácidos poseen la capacidad de absorber la mayor cantidad de luz a 280 nm de manera natural,

---

---

existen muchos compuestos que pueden interferir con este método, por lo que solo se emplea de modo presuntivo, para determinar la presencia y abundancia de proteína (Skoog, 2005; Garritz, 1998).

Como las proteínas pueden tener innumerables combinaciones de aminoácidos, se han desarrollado métodos que se basan en la formación de complejos que a cualquier proteína le pueden conferir una capacidad de absorción conocida para que cumpla con la ley de Lambert-Beer.

Entre estos métodos fotométricos para determinación de proteínas destacan el de Bradford, Biuret y Lowry, estos se basan en la formación de complejos, a partir de diferentes reactivos y las proteínas, que poseen la capacidad máxima de absorción a 590, 550 y 725 nm respectivamente, y los resultados se expresan en equivalentes de albúmina (Skoog, 2005; Garritz, 1998).

### **2.3. Separación**

Una separación es el procedimiento por el cual los componentes de una mezcla son obtenidos en forma libre. Estas se clasifican en dos ramas: preparativas que se utilizan para eliminar interferencias en los análisis, o concentrar el analito para poder cuantificarlo, regularmente implican grandes cantidades de muestra, y son escalables a nivel industrial; mientras que las analíticas requieren cantidades de muestra menores, y el grado de separación es mayor, ya que de ello depende su correcta identificación y cuantificación (Skoog, 2005; Garritz, 1998).

Para la obtención de las proteínas de la semilla de *Moringa oleifera* es necesario eliminar las interferencias, como la semilla posee una alta proporción de aceite, es preferible su remoción antes del análisis, para lo cual los investigadores han utilizado diferentes métodos (tabla 3).

### 2.3.1. Extracción

El fundamento de las separaciones por extracción, es la migración selectiva de un compuesto desde una mezcla sólida o líquida, hacia un solvente específico o fase líquida. El éxito de este proceso está en función de la diferencia de solubilidad entre el compuesto de interés y los demás componentes de la mezcla, con el solvente de extracción. Si se pretende eliminar las impurezas de una mezcla, dejando el compuesto de interés como la fracción insoluble, este proceso se denomina lavado (Harris, 1999; Chang, 2000). Los métodos de extracción empleados para la obtención de las proteínas de *Moringa oleifera*, y la separación del péptido coagulante se muestran en la tabla 4.

**Tabla 3.** Métodos empleados para desgrasar la semilla de *moringa oleífera*.

Autor	Método	Solvente	Condiciones
Abdulkarim y cols., 2005	Enzimático Centrifugación	Neutrasa	45 °C/24 h en agitación constante pH 6.8. Se decantó el aceite.
Bathia y cols., 2007	Soxhlet	Hexano	8 Horas.
Gassenchmidt y cols., 1995	Soxhlet	Triclorofluorometano	5 días a 4 °C.
Ghebremichael y cols., 2006	Extracción Centrifugación	Etanol 95%	30 minutos de agitación. Se decantó y secó al ambiente.
Maikokera y cols., 2007	Extracción Filtración	Éter de petróleo	30 minutos de agitación 40-60 °C.
Muyibi y cols., 2000, 2002, 2003	Soxhlet	Hexano	De 6 a 8 horas.

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla, la efectividad de este método radica en la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer entre dos solventes inmiscibles, en los que se distribuye según su coeficiente de reparto.

### 2.3.2. Diálisis.

El proceso de diálisis es empleado para la purificación de biomoléculas principalmente proteínas, sin producir cambios en su estructura o actividad biológica, se fundamenta en la migración de solutos a través de una membrana semipermeable que permite el paso de iones y moléculas pequeñas, hasta alcanzar un equilibrio osmótico en ambos de dicha membrana (figura 7), y dependiendo de la porosidad del material es el tamaño de las moléculas que podrán ser retenidas (Harris, 1999; Chang, 2000).

**Tabla 4.** Métodos empleados para extraer las proteínas de la SMO.

Autor	Método	Solvente	Condiciones
Bathia y cols., 2007	Extracción Filtración	Agua destilada	5 g SMO sin grasa/100 ml agua, 2 min licuadora, pasado por muselina.
Bhuptawat y cols., 2007	Extracción Filtración	Agua común	2 g SMO/agua, 30 min agitación fuerte, pasado por papel whatman No.1.
Gassenschmidt y cols., 1995	Extracción Centrifugación	Buffer fosfato 0.1M, pH 7.5	10 g SMO sin grasa/100 ml buffer agitación suave 2h/4 °C, luego decantado.
Ghebremichael y cols., 2005	Extracción Filtración	NaOH 0.5 M	5 g SMO/100 ml NaOH, 30 min agitación, papel whatman No.3.
Muyibi y cols., 1995; Katayon y cols., 2006	Extracción Filtración	Agua	5 g SMO/200 ml agua, se agitó 2 min, pasó por muselina.
Muyibi y cols., 2002, 2003	Extracción Filtración	Agua	5 g SMO desgrasada/200 ml agua, se agitó 1 min, pasó por muselina.
Beltrán--Heredia y cols., 2009	Extracción Filtración	NaCl 1M	5 g SMO/100 ml NaCl, agitado 30 min, filtrado en papel y luego por fibra de vidrio 45 µm.
Ghebremichael y cols., 2004, 2005	Extracción Filtración	NaCl 1M y 0.5 M	10 g SMO/100 ml NaCl, agitado 30 min, filtrado a 500 y 100 µm.

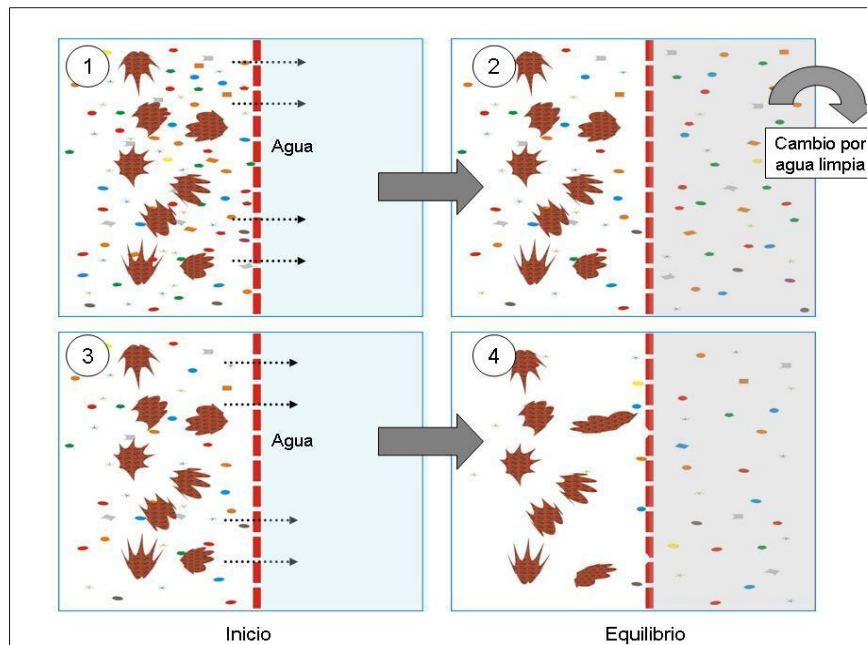
### 2.3.3. Liofilización.

La liofilización es un proceso que permite deshidratar un material a muy baja temperatura, prácticamente sin cambio en las propiedades químicas de sus componentes. El material se congela y posteriormente se aplica un alto vacío para

---

---

separar el agua por sublimación. Este proceso es muy utilizado en alimentos y ciencias biológicas, principalmente para la deshidratación de proteínas, enzimas y microorganismos, ya que su estructura molecular no se ve afectada, y su actividad biológica se reanuda al rehidratarse (Harris, 1999; Chang, 2000).



**Figura 7.** Esquema del proceso de diálisis

## 2.4. Cromatografía

### 2.4.1. Definición y generalidades.

En 1906 el botánico ruso Tswett utilizó el término cromatografía para describir un experimento con un extracto de hojas verdes en una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio. Al agregar éter se separaron varias bandas coloridas que descendían a diferentes velocidades con el solvente, obteniendo dos tipos de clorofila, cuatro xantofilas y un carotenoide. La separación no está condicionada por el color, pero conserva el nombre por motivos históricos (Garritz, 1994, y Burriel-Martí, 1985). Esta técnica proporciona más información sobre los compuestos aislados, como la cantidad de elementos en una mezcla, proporción

---

---

aproximada, a que velocidad migran, y con los detectores modernos se pueden identificar ciertas propiedades fisicoquímicas (Garritz, 1998).

Consta de un material fijo en un soporte, columna o placa (fase estacionaria) y un solvente o combinación de dos o más, que se desplazan a través del soporte (fase móvil). La separación se debe a la velocidad con que se mueve cada sustancia, por la afinidad que posee hacia cada fase (equilibrio de distribución). El más afín a la fase estacionaria se mueve más lento, mientras que los afines a la fase móvil se desplazan mas rápido (figura 8), La cromatografía se divide en varias categorías dependiendo del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria: reparto, adsorción, intercambio iónico, exclusión molecular y afinidad (Burriel-Marti, 1985). El principio es parecido a la extracción sólo que una fase permanece fija, mientras otra pasa a través de ella. El fluido que entra por la columna se llama eluyente, y el fluido que sale por el otro extremo se llama eluato, y este proceso se conoce como elución (Harris, 1999).

#### **2.4.2. Exclusión molecular.**

También llamada permeación en gel, esta separa las moléculas por su tamaño, en el caso ideal de una exclusión molecular no existe interacción entre la fase estacionaria y el soluto. La fase móvil fluida pasa por la porosidad del gel llevando a los solutos pequeños, mientras las moléculas grandes pasan más rápido sin entrar a los poros (figura 9). Las pequeñas tardan más tiempo en pasar porque son retardadas dentro del gel y requieren más volumen de eluyente para abandonar la columna (Garritz, 1994; Burriel-Marti, 1985; Andrews, 1981).

#### **2.4.3 Electroforesis**

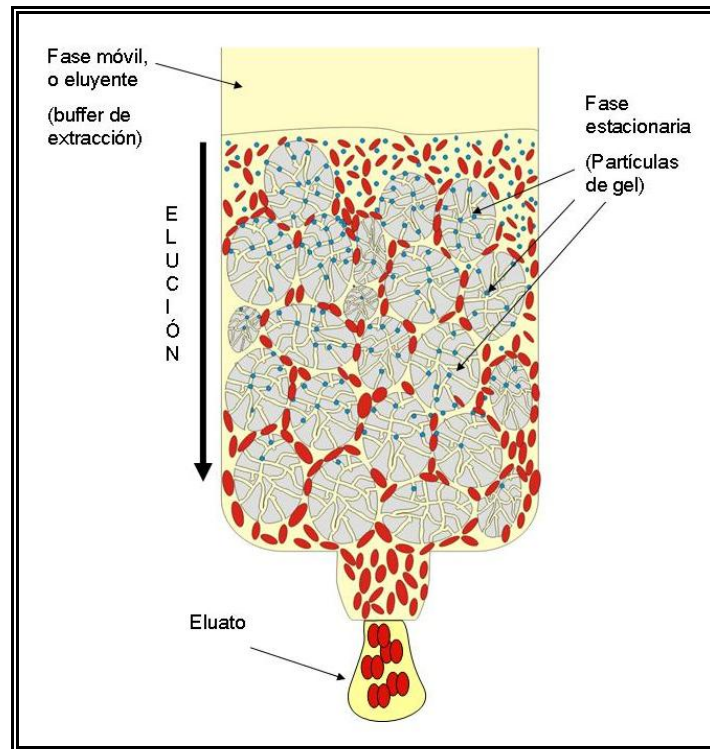
Está técnica se debe al trabajo de Arne Tiselius en la década de 1930, logró separar mezclas de proteínas séricas, por su movilidad en un soporte poroso al que aplicaba un campo eléctrico. En 1948 fue galardonado con el premio Nobel por estos trabajos. A partir de ahí se ha aplicado a separaciones difíciles como:



---

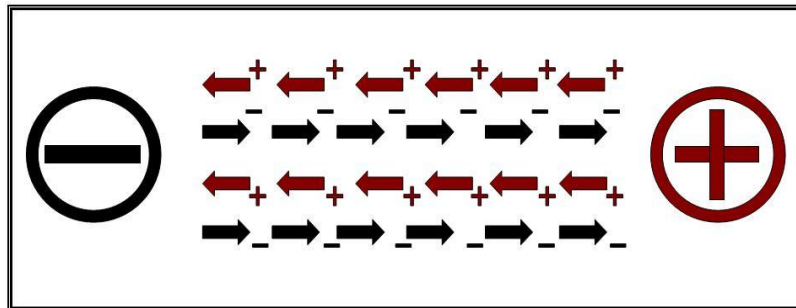
---

aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, catecolaminas, fármacos, vitaminas, carbohidratos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, y cualquier especie cargada o alrededor de la cual exista una carga eléctrica (Skoog, 1992; Andrews, 1981).



**Figura 8.** Mecanismo de la cromatografía de exclusión molecular

El fundamento es la migración de especies cargadas a través de un soporte por la aplicación de un campo eléctrico desde los extremos, las especies se irán separando de acuerdo a su carga y su movilidad iónica en ese medio (Figura 9), en realidad es otro tipo de cromatografía. Para favorecer el paso de la corriente se utilizan electrolitos que previamente impregnan el soporte poroso, y son escogidos siempre que no formen precipitados con los componentes de la muestra (Garritz, 1994; Burriel-Martí, 1985; Andrews, 1981).



**Figura 9.** Migración de especies cargadas o electroforesis

Como soporte se han utilizado papel, alúmina, lana de vidrio, almidón, agar-agar, sílica-gel, etc. tanto en columna como en capa fina. Se suelen utilizar tiras de acetato de celulosa, que por poseer una estructura mas uniforme y un poro menor que el de papel filtro, tienen un mayor poder de resolución. A estas ventajas se le añade su fácil disolución en ácidos, lo que facilita la posterior determinación de las especies separadas (Garritz, 1994; Burriel-Marti, 1985).

Los soportes modernos son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente (Garritz, 1994, y Burriel-Marti, 1985). La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método muy útil para separar macromoléculas, ya que tienen las siguientes ventajas:

- 1) Son químicamente inertes.
- 2) Suprimen las corrientes de convección por cambios de temperatura.
- 3) El tamaño de poro se controla con la concentración de acrilamida y N,N-metilenbisacrilamida al polimerizar. Así, además de ser soporte para electroforesis, el gel también retrasa ciertas moléculas por su tamaño.

Esta técnica de electroforesis, al incluir duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) permite determinar la masa molecular de las proteínas. Este método exige tratar a la proteína con el detergente iónico SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol o ditiotreitól, que desnaturalizan la estructura proteica, hasta formar un complejo estándar.

---

---

El SDS se une fuertemente a la molécula de proteína (1.4 g de SDS por g de proteína) confiriendo una carga neta negativa, debida a que los iones sulfato quedan expuestos. Por otra parte el reactivo  $\beta$ -mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuro en las proteínas, con este procedimiento se deshace el enroscamiento aleatorio del complejo y asume la forma de una cadena de ancho constante. Por lo tanto su movilidad está función del tamaño de la proteína, ya que la carga superficial del complejo tiende a ser constante, independientemente de la cadena del polipéptido (Chang, 2000).

#### **2.4.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Actualmente es la técnica más utilizada debido a las ventajas que presenta frente a otras, entre ellas su sensibilidad, fácil manejo, exactitud, tiempo total de análisis, bajo consumo de reactivos, es ideal para compuestos no volátiles o termolábiles y aplicables a innumerables sustancias de interés. Su funcionamiento depende de los componentes del equipo (Skoog y cols, 2001).

Un equipo HPLC puede tener varios recipientes de vidrio o acero inoxidable, con capacidad para 200 a 1000 ml de solvente que constituyen la fase móvil, que puede ser constante o isocrática, y variable o en gradiente. Un sistema de bombeo con tres tipos de bomba posibles, con ventajas y desventajas según su diseño: bombas recíprocas, bombas de pistón o de desplazamiento positivo y bombas neumáticas o de presión constante.

El sistema de inyección que puede ser manual donde se introduce una jeringa a través de un septo de goma que sella la muestra. Los equipos más modernos cuentan con muestreadores automáticos, donde solo se colocan los viales previamente sellados, normalmente están integrados con el equipo HPLC.

---

---

Las columnas de un equipo HPLC (figura 10) generalmente están compuestas por un tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque a veces pueden ser de vidrio resistente. Estas son analíticas, pueden estar termostatazadas, y en algunas ocasiones requieren el uso de precolumnas.

El relleno de columna puede ser en film y de partícula porosa. El primero consiste en esferas o perlas de vidrio o polímeros, no porosas con diámetros entre 30 y 40  $\mu\text{m}$ , cubiertas de una capa delgada y porosa de materiales como sílice, alúmina, de algún polímero, resina sintética, o de intercambio iónico. El segundo, está compuesto de micropartículas porosas con diámetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$  formadas con los materiales de los films de las primeras. En ambos casos debe existir la menor dispersión posible del material de relleno.



**Figura 10.** Columnas para HPLC  
Fuente: [www.teknocromateknokroma.es.es](http://www.teknocromateknokroma.es.es)

Un componente esencial de los equipos de HPLC es el detector, el cual tiene la función de generar una señal eléctrica proporcional a la concentración de los analitos de la muestra. Entre los detectores disponibles se encuentran los de fluorescencia, UV-Vis, índice de refracción y electroquímico (Skoog, 2001), los primeros dos son los más utilizados.

---

---

Los detectores de fluorescencia solo identifican sustancias fluorescentes, que absorben una longitud de onda específica y emiten otra más larga como respuesta. Estos detectores poseen una celda por donde pasa la luz de excitación axialmente, una fotocelda adyacente recoge la luz emitida por el analito, ésta es convertida a señal eléctrica y después amplificada para su identificación. Cuando un analito no es fluorescente, se requiere modificar su molécula, formando un complejo susceptible a ser detectado, esto se logra mediante la adición de un grupo cromóforo, este proceso es conocido como derivatización (Skoog, 2001).

Los detectores UV-Vis contienen una fuente de luz visible y otra ultravioleta. La luz incide en una rejilla holográfica que la dispersa y produce un espectro con diferentes longitudes de onda, las cuales inciden sobre otra rendija por la que solo pasa un haz o banda espectral a la vez, estos atraviesan la muestra, obteniendo el espectro de absorción de cada analito conforme pasan por el detector, y esta información se lleva a un registro o sistema de datos (Skoog, 2001).

Para el caso particular de los aminoácidos se requiere efectuar una derivatización, ya que no todos tienen la propiedad de fluorescencia, entre los reactivos más comúnmente utilizados para este fin se encuentran: Fenilisotiocianato (PITIC), ninhidrina, 9-fluorenil-metil cloroformato (FMOC-Cl), orto-ftaldehído (OPA), 5-N,N-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonyl chloride (cloruro de dansilo) (López-Cervantes y cols., 2006).

---

---

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del experimento**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos ubicado en el edificio C.I.I.B.A del Instituto Tecnológico de Sonora unidad Obregón centro, en el periodo que comprende Julio de 2010 a Agosto de 2011, asesorado por el Dr. Jaime López Cervantes y la Dra. Dalia I. Sánchez Machado.

#### **3.2. Recolección de la muestra**

Se obtuvieron tres muestras al azar de un huerto del Ejido Esperanza, en las afueras de Ciudad Obregón, Sonora, el mes de mayo 2010 y mayo 2011. Los frutos de la planta *Moringa oleifera* fueron recolectados en estado de madurez avanzada, se extrajeron las semillas (SMO), luego se descascarillaron y fueron molidas en licuadora convencional (figura 11), por último se guardaron en bolsas de plástico hasta su análisis.



**Figura 11.** Muestras de semilla de *Moringa oleifera*

### **3.3. Reactivos químicos**

Se adquirieron los reactivos fosfato de sodio monobásico, bis-acrilamida, acrilamida, persulfato de amonio, N,N,N,N-tetrametilendiamina (TEMED), duodecil sulfato de sodio (SDS), 2-mercaptoetanol, azul de Coomassie R-250, y azul de bromofenol de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri. USA). Los estándares utilizados para aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, serina, histidina, glicina, treonina, alanina, prolina, tirosina, arginina, valina, lisina, leucina, metionina, isoleucina y fenilalanina) y para peso molecular la mezcla SDS7 ( $\alpha$ -lactoalbúmina bovina 14 KDa, inhibidor de tripsina de soya 20 KDa, tripsinógeno pancreático bovino 24 KDa, anhidrasa carbónica bovina 29 KDa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo 36 KDa, ovoalbúmina 45 KDa, seroalbúmina bovina 66 KDa) todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri. USA), al igual que el clorhidrato de hidroxilamina, 9-fluorenilmetil cloroformato (Fmoc-Cl), 2-(metiltio)-etanol, y el reactivo de Bradford.

---

---

La seroalbúmina bovina de laboratorios Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA). Se utilizó n-hexano de Fluka (Steinheim, Alemania), cloroformo, metanol y ácido acético glacial, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, ácido bórico y sulfato de cobre de productos químicos Monterrey (Monterrey, Nuevo León, México). La mezcla de selenio de Merck (Dramstadt, Alemania), y agua bidestilada por el sistema Nanopure Diamond (Branstead Internacional, Dubuque, Iowa, EUA).

### 3.4. Caracterización de la muestra

Las muestras de semilla fueron pulverizadas para realizar los ensayos para determinar su composición proximal, antes de la preparación para extraer las proteínas.

#### 3.4.1. Humedad

La humedad se determinó de acuerdo al método de AOAC (1999), en cajas Petri puestas a peso constante en un horno a 110 °C durante 2 h. Se pesaron 2.5 g de muestra y fueron secadas a 70 °C por 24 h hasta peso constante (figura 12), para la eliminación del agua libre. Después fueron enfriadas en un desecador para proceder a pesarlas.



**Figura 12.** Determinación de humedad en SMO por secado atmosférico



---

---

### 3.4.2. Lípidos totales

Los lípidos fueron extraídos con la mezcla de solventes propuesta por Bligh-Dyer (1959). La primera extracción se realizó con 10 ml de solventes y las cuatro posteriores con 5 ml. Realizando la extracción durante 10 min en un sonificador a partir de 2 g de muestra con cloroformo:metanol (2:1), y posteriormente fue centrifugada a 4500 rpm por 10 min, el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 41, y se recogió en un vaso de 20 ml a peso constante. El filtro y embudo se lavaron con otros 5 ml (figura 13), el solvente se evaporó en campana y se llevó de nuevo a peso constante, para calcular por diferencia de peso la cantidad de grasa extraída.



**Figura 13.** Cuantificación de lípidos en la SMO

### 3.4.3. Minerales totales

Se determinaron de acuerdo al método de AOAC (1999), por diferencia de peso entre 2 g de muestra, colocados en crisoles de porcelana a peso constante, y el residuo después de la incineración en mufla a 550 °C por 6 a 8 horas, y enfriado en desecador para proceder a su pesado (figura 14).

---

---

#### 3.4.4. Proteína cruda

Se estimó con el método de AOAC (1999), por el método microKjeldhal (figura 15), a partir del nitrógeno total utilizando un factor de 6.25. Se realizó la digestión de 0.2 g de muestra con ácido sulfúrico concentrado y para su destilación se adicionó 10 ml de NaOH al 40 % (p/v). El destilado se recogió en solución de ácido bórico al 4 % y se tituló con una solución valorada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 14.** Cuantificación de minerales totales de SMO

### 3.5. Preparación de la muestra

#### 3.5.1. Desgrasado de SMO

La semilla molida fue desgrasada con hexano en agitador ultrasónico Branson 1510 (Emerson, Co. Danbury, USA), se decantó el sobrenadante, la recuperación del solvente se realizó en un rotavapor Büchi (Labortechnik, Flawil, Suiza), esta extracción se hizo por duplicado, y el residuo se evaporó en campana, se secó en horno Felisa (Monterrey, Nuevo León, México) a 40 °C, como residuo desgrasado se obtuvo un polvo de color blanco-beige y se almacenó en frascos sellados.



**Figura 15.** Cuantificación del nitrógeno total por el método Kjeldhal

### 3.5.2. Extracción de proteínas

Para la elección del mejor solvente se realizaron pruebas de extracción con 2 g de SMO en 10 ml de solvente. Los solventes ensayados fueron NaCl 0.5 M, NaCl 1 M, y buffer fosfato 0.1 M a pH 4.5, 5.6, 6.5, y 7.5.

La muestra se homogenizó en un vortex por 10 s, posteriormente se sonificó durante 10 min, luego se centrifugó por 20 minutos y se filtró el sobrenadante (figura 16). Se optimizó la cantidad de utilizar a 2 g de polvo con 7 ml de buffer fosfato 0.1 M pH 7.5 en la primera extracción y con 5 ml en una segunda, al líquido obtenido se le denominó EPMO (extracto proteico de *Moringa oleifera*).



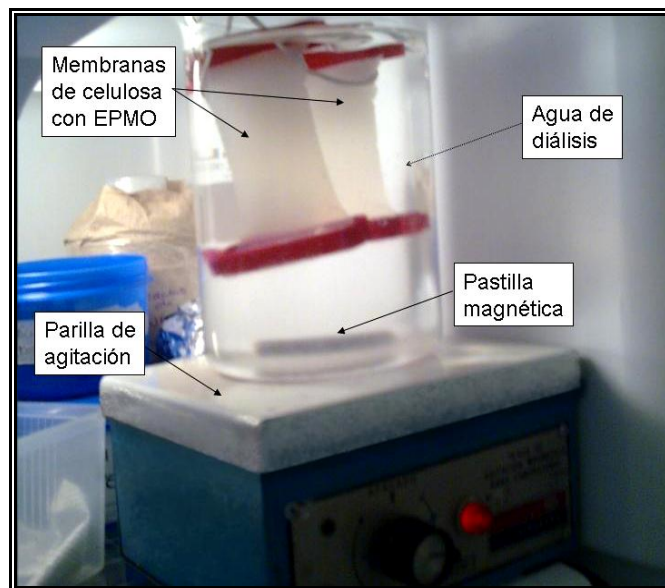
**Figura 16.** Extracción de proteínas de SMO desgrasada:  
(a) Sonificación (b) Centrifugación

---

---

### 3.5.3. Purificación del extracto

Al EPMO se le eliminaron sales e impurezas, mediante un proceso de diálisis a través membranas de celulosa Spectra/por con porosidad de 3500 Da, utilizando agua destilada en el exterior y renovándola cada 12 h por 2 días en refrigeración con agitación constante (figura 17).



**Figura 17.** Procedimiento de diálisis

Se confirmó la efectividad de la diálisis mediante la determinación de minerales a partir 2 ml del extracto antes y después de este proceso, así como a 4 ml de agua del exterior de la membrana. Se congelaron y posteriormente se liofilizaron en un equipo Labconco (Labconco Corporation, Kansas, MO, USA) (figura 18).

### 3.6. Separación de las proteínas

El fraccionado de las proteínas a partir del extracto seco se realizó mediante cromatografía por exclusión molecular, con una fase estacionaria no comercial.



**Figura 18.** Liofilización del extracto proteico dializado

### 3.6.1 Empaque de la columna

Se preparó un gel de poliacrilamida al 6 % entre dos placas de vidrio con calibradores de 1.25 mm de grosor, se cortó en rectángulos alrededor de 2 cm cuadrados y fue deshidratado en horno a 80 °C toda la noche, por último se pulverizo en mortero y fue tamizado por malla No.80 (140 micrones) (figura 19), se almaceno en un frasco seco.

Se pesaron 500 mg del gel en polvo, se disolvieron en 10 ml de buffer fosfato 0.1 M a pH 7.5 y se empacó en una columna de 12 mm de diámetro interno y 73 mm de altura de cama, previamente sellada con lana de vidrio.



**Figura 19.** Preparación del empaque para columna de cromatografía:  
(a) gel cortado para deshidratación y (b) tamizado en malla No. 80

---

---

El sistema se equipó con una bomba peristáltica para forzar el flujo y mantenerlo constante (figura 20). La fase estacionaria se lavó con el buffer de extracción hasta equilibrar la absorbancia de la fase móvil en la entrada y a la salida de la columna a 280 nm para proceder con la separación.

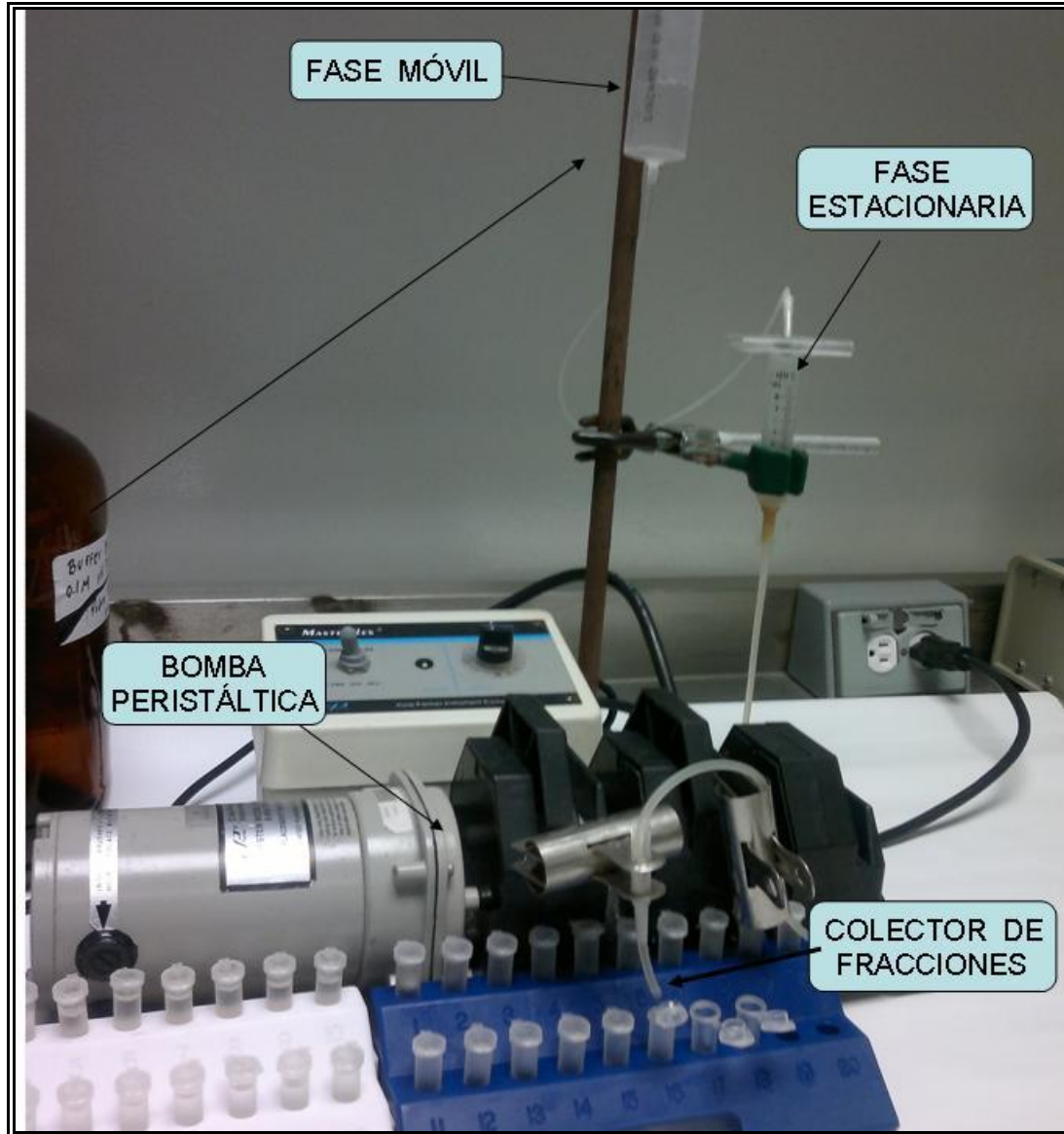
### 3.6.2. Fraccionado de la muestra

50 mg de EPMO seco se disolvieron en 1 ml de buffer y fue aplicado lentamente con una pipeta Pasteur en la parte superior de la columna. La elución se llevó a cabo con el mismo buffer, a flujo de 0.3 ml/min constante, de ahí se colectaron fracciones de 1.5 ml, se midió la absorbancia de cada fracción a 280 nm (figura 21) en espectrofotómetro Genesis 10 (Thermo Electron Scientific Co., Madison, WI, USA), separando cada una de ellas, para su posterior análisis.

La concentración de proteína se determinó por el método Bradford (1976), en las fracciones que presentaron mayor absorbancia a 280 nm. Para lo cual se realizó una curva de calibración, graficando concentración contra absorbancia a partir de una solución conocida de proteína.

Se preparó una solución patrón con 39 mg de seroalbúmina bovina en 25 ml de buffer de elución y se le denominó solución A (1.56 mg/ml), de ahí se prepararon seis soluciones de trabajo:

- Solución B (4 ml de A aforados a 5 ml) (1.248 mg/ml)
- Solución C (6 ml de A aforados a 10 ml) (0.936 mg/ml)
- Solución D (4 ml de A aforados a 10 ml) (0.624 mg/ml)
- Solución E (2 ml de A aforados a 10 ml) (0.312 mg/ml)
- Solución F (2 ml de A aforados a 25 ml) (0.125 mg/ml)
- Solución G (1 ml de A aforados a 25 ml) (0.063 mg/ml)



**Figura 20.** Fraccionado de proteínas por exclusión molecular

De cada solución se tomó 0.1 ml y se les adicionó 3 ml del reactivo de Bradford, se dejaron reposar durante 5 min (figura 22), luego se tomó lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm (figura 21). De la misma manera se procedió al análisis de cada una de las fracciones y en base a la ecuación de la recta, se calculó su concentración de proteína.



**Figura 21.** Espectrofotometría de absorción UV-Vis, empleada en la separación cromatográfica de proteínas y el método de Bradford

### **3.7. Electroforesis bajo condiciones desnaturizantes**

#### **3.7.1. Equipo y preparación del gel**

Se utilizó una cámara vertical de electroforesis SG-200 (C.B.S, Del Mar, California, USA) equipada con disipadores de calor electrónicos, conectada a una fuente de poder de corriente directa EC-105 (E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida).

A partir de una solución patrón de acrilamida-bisacrilamida al 30% se prepararon geles de poliacrilamida de calibre 1.25 mm, continuos al 8, 10, 12 y 15 %, y en modo discontinuo, con el gel concentrador tenía una concentración del 4 y 8 %, mientras el gel separador del 10 y 12 % p/v, polimerizados en presencia de TEMED y catalizadas por persulfato de amonio, el molde usado forma 14 pocillos para la inyección de muestras.





**Figura 22.** Preparación de estándares y muestras por método de Bradford para cuantificación de proteína

### 3.7.2 Desnaturalización y aplicación de las muestras

Se preparó el buffer de carga con 500  $\mu$ l de buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 para mantener la continuidad, 500  $\mu$ l de glicerol para aumentar la densidad al aplicar la muestra, 1% SDS que le confieren carga negativa a los péptidos, 1% 2-mercaptoetanol para romper los enlaces disulfuro y 0.01% azul de bromofenol como indicador del frente de migración.

Se diluyeron 100  $\mu$ l de los extractos de proteína con 100  $\mu$ l de buffer de carga y se desnaturalizaron en baño de agua hirviendo por 10 min (figura 23). De la misma manera se analizaron soluciones proteicas de EPMO purificado a diferente concentración, así como las fracciones de la cromatografía en columna que presentaron mayor absorbancia a 280 nm, para confirmar la separación, y por último se realizaron corridas con las fracciones identificadas, la proteína recién extraída y los marcadores de peso molecular.

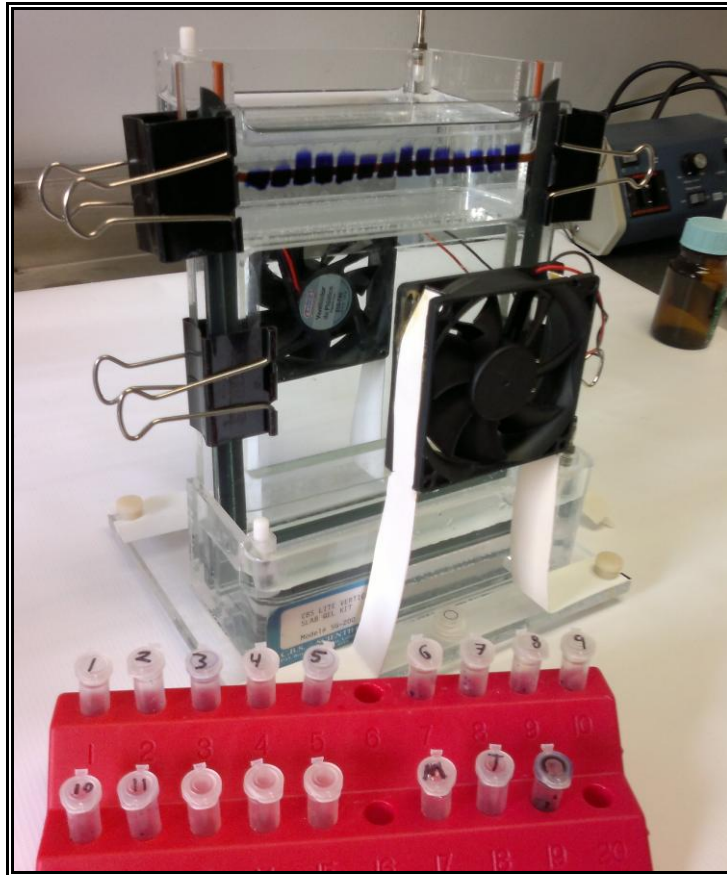


**Figura 23.** Desnaturalización de las proteínas para SDS-PAGE

En cada pocillo del gel en el polo negativo se inyectaron 20  $\mu$ l de muestra con jeringa Hamilton (figura 24), y se aplicó corriente directa a 180 V, con intensidad de 2 mA, en cámara refrigerada, por un tiempo promedio de 6 horas según lo indicaba el frente de migración.

### 3.7.2. Revelado del gel

Al finalizar la corrida, el gel se tiñó por inmersión en solución azul de Coomassie al 0.20 %, en un recipiente tapado por 3 horas con agitación suave (figura 25), y se destiñó mediante varios lavados con solución de metanol: ácido acético: agua (40:10:50) en agitador orbital, por un periodo de 2 h cada uno, hasta aclarar el gel lo suficiente para diferenciar las bandas formadas por las proteínas.



**Figura 24.** Equipo de electroforesis cargado con muestras de proteína desnaturalizada

Se capturó la imagen con escáner de luz visible HP-3670, ésta se analizó con el software Corel Photo-Paint® 11, para identificar la ubicación e intensidad de las manchas que representan a los péptidos separados y comparar las distancias recorridas con los marcadores estándar de peso molecular, estimando los valores para cada fracción.

### **3.8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

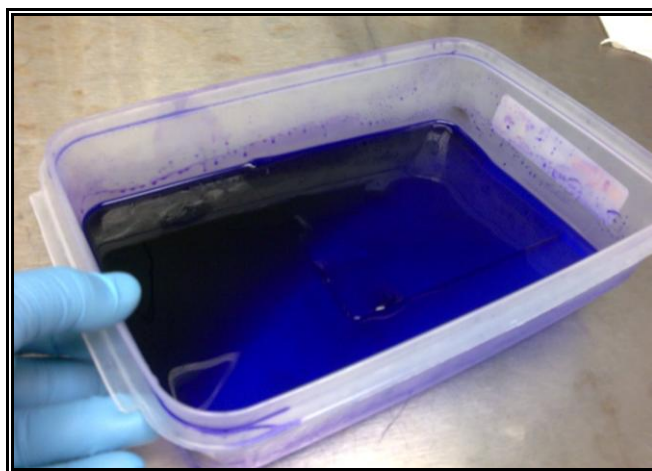
#### **3.8.1. Hidrólisis de las fracciones proteicas**

El perfil de aminoácidos de las proteínas de SMO se realizó mediante un análisis por HPLC, de las principales fracciones encontradas en las separaciones por electroforesis, se recortaron las porciones de gel que contenían notablemente la mayor concentración de proteínas y se colocaron en tubos con tapa, se dejaron,

---

---

en maceración toda la noche en 2 ml de buffer de extracción con 1 % de SDS, luego se agitaron en vortex (figura 26a), se reposaron por 5 min, y de ahí se centrifugaron por 5 minutos. De cada tubo se tomó 1 ml del sobrenadante, se decoloró por extracción líquido-líquido con 1 ml de n-hexano y se llevó a sequedad en horno a 110°C toda la noche.

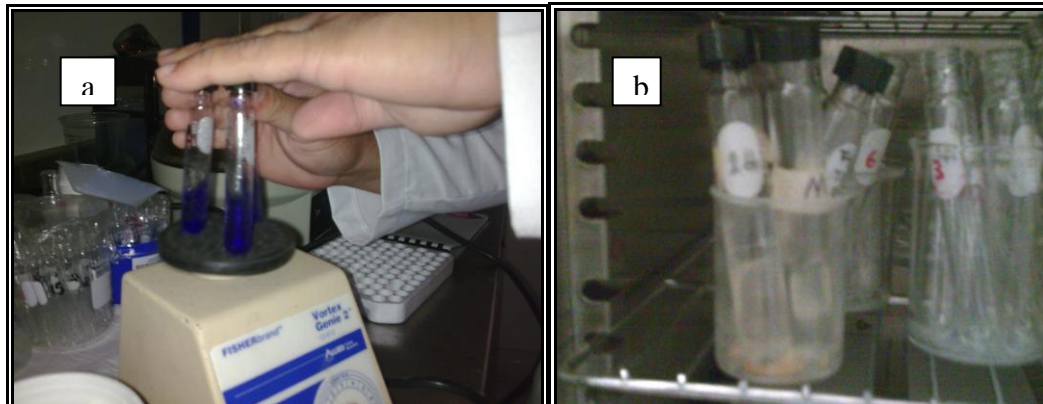


**Figura 25.** Tinción del gel en solución azul de Coomassie

Cada fracción se hidrolizó con 8 ml de HCl 6 N a 110°C por 24 h (figura 26b). Se filtraron al vacío y se llevaron a 50 ml con agua bidestilada, de cada solución se transfirieron 300  $\mu$ l a viales de 1.5 ml y se secaron a 60°C en un horno por 24 h.

### 3.8.2. Derivatización de aminoácidos

Los residuos se disolvieron en 300  $\mu$ l de buffer borato y los aminoácidos fueron derivatizados según López-Cervantes y cols., (2006), a cada fracción se le adicionó 300  $\mu$ l de reactivo FMOC-Cl y se agitó en vortex por 90 s. Se les añadió 180  $\mu$ l del reactivo de división y se agitaron 30 s en vortex. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 420  $\mu$ l del reactivo de amortiguación y se volvió a agitar 30 s en vortex, por último se filtraron por membrana de 0.45  $\mu$ m (figura 27), después de este proceso se inyectaron 10  $\mu$ l en el equipo de HPLC.



**Figura 26.** Extracción e hidrólisis ácida de las fracciones proteicas del EPMO

### 3.8.3. Equipo y condiciones para HPLC

Para la identificación y cuantificación de aminoácidos se utilizó un sistema HPLC Varian modelo Pro Star 800 (Palo Alto, CA, USA), equipado con automuestreador (modelo 410), desgasificador de solventes marca Meta Chem, bomba (modelo 230), detector de fluorescencia (modelo 363), y software del sistema Prostar para análisis cromatográficos (figura 28).

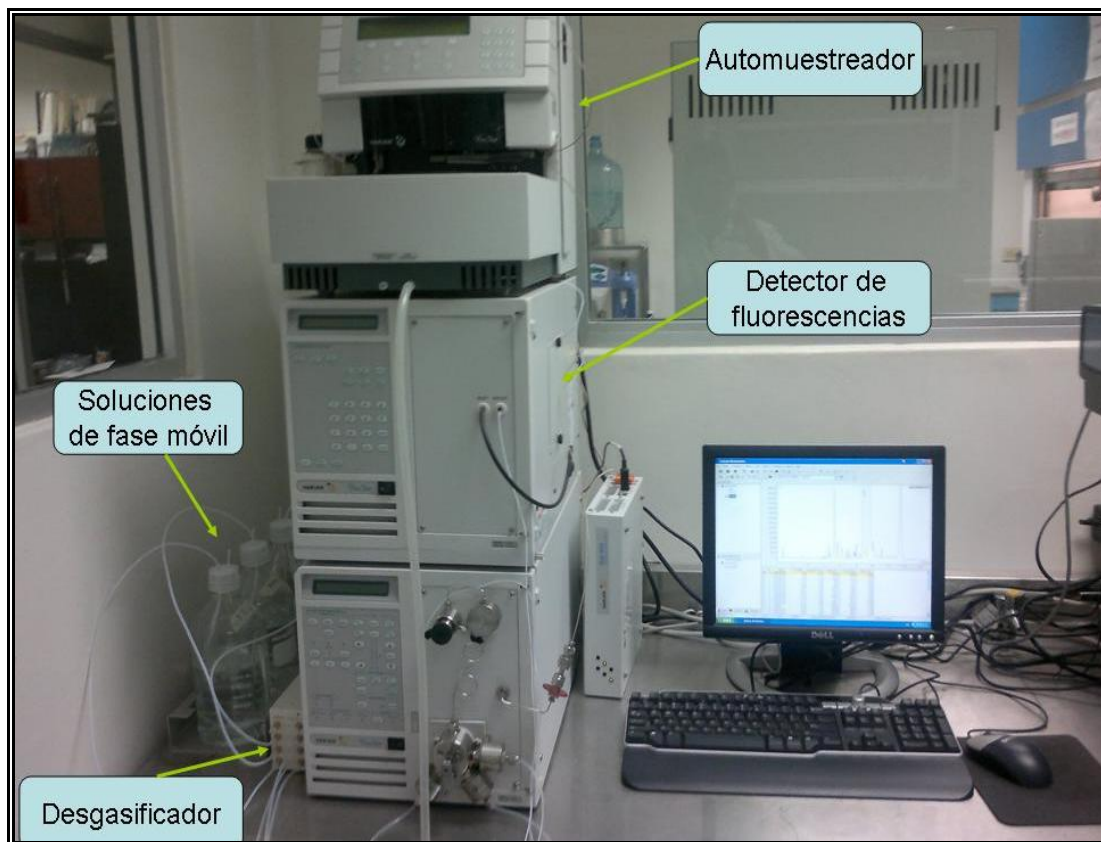


**Figura 27.** Derivatización de aminoácidos de las fracciones proteicas

---

---

La separación se llevó a cabo con una columna Zorbax Eclipse AAA (4.6 mm x 150 mm) tamaño de partícula 5  $\mu$ m (Agilent, USA). La fase móvil empleada consta de tres soluciones: A) buffer de fosfatos (pH 6.5); B) metanol-agua 85:15 (v/v); C) acetonitrilo-agua 90:10 (v/v), y se utilizó un gradiente que se presenta en la tabla 5. Se mantuvo un flujo constante de 0.7 ml/min, a 38°C. Para la detección se utilizaron longitudes de onda de excitación a 270 nm y de emisión a 316 nm.



**Figura 28.** Sistema HPLC Varian Pro Star 800

#### 3.8.4. Identificación

La identificación de los aminoácidos se realizó a partir de los picos de elución cromatográfica, mediante la comparación del tiempo de retención de los patrones individuales preparados en una mezcla, y la abundancia relativa se calculó por las áreas bajo la curva.

---

---

**Tabla 5.** Gradiente empleado en la separación de los aminoácidos por HPLC

Fase Tiempo	% A	% B	% C
0 min	17	68	15
0.5 min	17	68	15
39 min	10	40	50
40:05 min	0	40	50
41 min	0	0	100
41:55 min	17	68	15
52 min	17	68	15

---

---

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Análisis proximal

Se determinó la composición proximal de la semilla de *Moringa oleifera* (SMO), expresada en base seca se muestra en la tabla 6, comparando los resultados con los obtenidos por Abdulkarim y cols., (2005), el contenido de humedad, proteínas y minerales fue mayor, mientras que para lípidos fue ligeramente inferior, ya que el documento reporta 7.9, 38.3, 6.5 y 30.8 %, respectivamente, de la misma manera Amaglo y cols., (2010) proponen un contenido promedio de 35.7 % de proteína, 31.2 % de grasa, y presenta el contenido de minerales de manera independiente para sodio 0.94 %, potasio 1.1 %, magnesio 0.29 %, y para calcio 0.12 %.

**Tabla 6.** Composición proximal de la semilla de *Moringa oleifera*

MUESTRA	HUMEDAD	LÍPIDOS	CENIZAS	PROTEÍNA CRUDA
A1	4.12 %	29.37 %	4.10 %	53.83 %
A2	4.13 %	28.59 %	4.14 %	53.83 %
A3	4.18 %	27.42 %	4.17 %	53.21 %
B1	4.11 %	26.72 %	4.10 %	54.46 %
B2	4.08 %	27.01 %	4.05 %	53.21 %
B3	4.14 %	26.78 %	4.12 %	52.59 %
C1	4.18 %	25.75 %	4.04 %	53.83 %
C2	4.05 %	25.03 %	4.10 %	53.83 %
C3	4.10 %	25.38 %	4.03 %	53.21 %



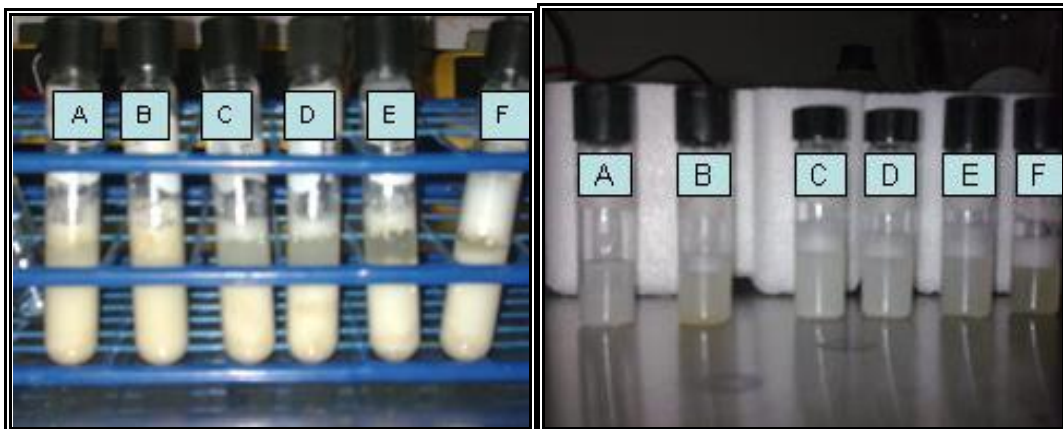
---

---

Rodriguez-Nuñez (2008), reportó un contenido de lípidos de 35.9 %, 60.3 % de proteína cruda, 6 % de minerales y 0.68 % de humedad, valores similares a los encontrados en este estudio, ya que trabajo con especímenes de la misma zona, es posible que la composición proximal sea muy influenciada por la composición del suelo y otros factores climáticos.

#### 4.2 Extracción de proteínas

Durante los estudios preliminares de extracción, al recolectar el sobrenadante, los viales, mostraban diferente cantidad de espuma y turbidez (figura 29), con las soluciones de cloruro de sodio 0.5 y 1 M se obtuvieron líquidos mas blancos que las otras soluciones, el extracto con buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5, se veía mas transparente (característica de mayor disolución), también tenía mayor viscosidad y cantidad de espuma, propiedades funcionales típicas de las proteínas, dicho extracto tenía un aspecto muy similar a la ovoalbúmina, incluso después de dos días a temperatura ambiente, mostró el mayor aroma a sulfuro, esto sugiere la presencia de los aminoácidos azufrados, metionina y cisteína (Badui, 2006).

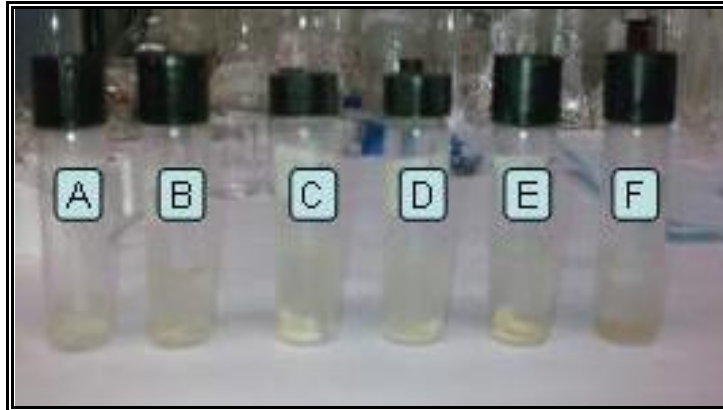


**Figura 29.** Extractos a partir de SMO pulverizada con: A) NaCl 0.5M, B) NaCl 1M, C) Buffer pH 4.5, D) pH 5.6, E) pH 6.5, F) pH 7.5, antes y después de filtrar

---

---

Después de 24 horas en refrigeración los extractos con buffer a pH 4.5 a 6.5 mostraron precipitación, seguramente por el punto isoeléctrico de algunas proteínas (figura 30).

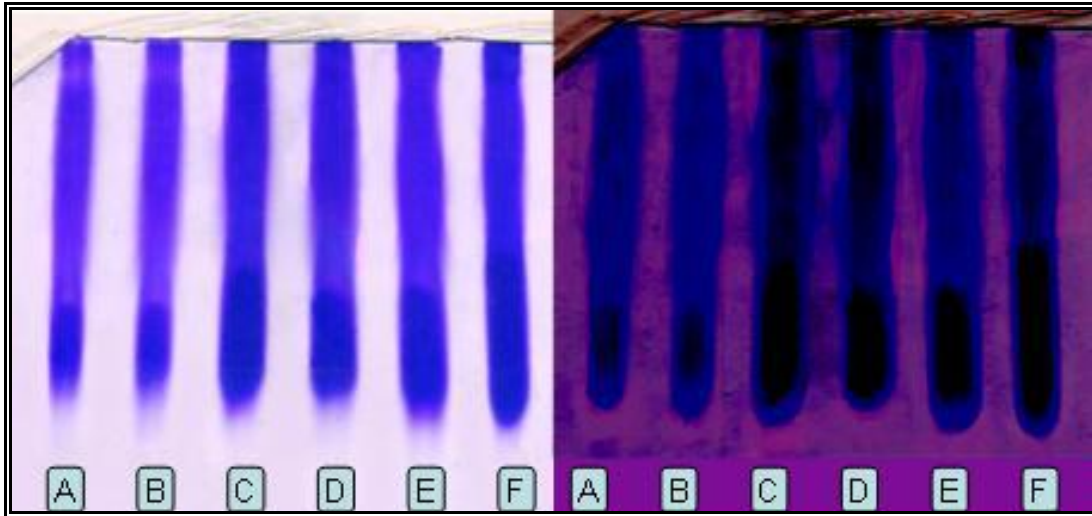


**Figura 30.** Extractos después de 24 horas en refrigeración:

A) NaCl 0.5 M, y B) 1 M, C) Buffer pH 4.5, D) pH 5.6, E) pH 6.5, y F) pH 7.5

Cada extracto fue homogenizado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), mostrando diferente intensidad en la identificación de tres fracciones proteicas (figura 31). Con las soluciones de cloruro de sodio se encontraron prácticamente puras proteínas de bajo peso molecular (fracción coagulante de la SMO), pero con poca intensidad, confirmando que el método de extracción con cloruro de sodio propuesto por Ghebremichael y cols. (2006) es útil para la separación rápida de ésta fracción como lo sugieren. Sin embargo, con el buffer fosfato de sodio pH 6.5 se encontró la mayor cantidad de las mismas. Los extractos con buffer a pH 4.5 y 5.6 mostraron mayor intensidad en la fracción intermedia.

La mejor extracción para los fines de este estudio, resultó ser con el buffer a pH 7.5, ya que están bien diferenciadas las tres fracciones proteicas principales en concentración considerable y tuvo el menor grado de precipitación, por lo que se hicieron repetidas extracciones recolectando 170 ml en total, este mismo buffer fue empleado por Gassenschmidt y cols (1995).



**Figura 31.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con doudecil sulfato de sodio. Carril: A) NaCl 0.5 M, B) NaCl 1 M, C) Buffer pH 4.5, D) pH 5.6, E) pH 6.5, F) pH 7.5

#### 4.3. Aislamiento de proteínas

Al someter a diálisis los extractos proteínas para eliminar solutos, se evaluó el proceso mediante cuantificación de cenizas, encontrando una reducción del 88.2 % en el contenido de minerales del extracto durante primer recambio de agua, como se muestra en la tabla 7, esto demuestra la efectividad de la eliminación de solutos, ya que prácticamente se alcanza el equilibrio en el interior y exterior de la membrana.

El proceso de liofilización del extracto duró casi 36 horas, partiendo de 170 ml del extracto de SMO dializado, y se obtuvieron 550 mg de una masa blanca con aspecto algodonoso presuntamente las proteínas totales, considerando 3.2 mg/ml, mientras Ghebremichael y cols. (2006) reportan haber obtenido 2.3-2.4 mg/ml a partir de 5 g de SMO desgrasado con 100 ml de acetato de amonio (figura 32).

**Tabla 7.** Concentración de minerales del extracto proteico antes y después de dializar, y el agua de dializado

Repetición	Extracto crudo	Interior de membrana	Agua exterior
1	12.82 mg/ml	1.43 mg/ml	1.42 mg/ml
2	12.91 mg/ml	1.61 mg/ml	1.40 mg/ml
3	13.18 mg/ml	1.54 mg/ml	1.48 mg/ml
<b>Promedio</b>	12.97 mg/ml	1.53 mg/ml	1.43 mg/ml

Al analizar el extracto liofilizado en diferentes concentraciones por electroforesis, no se encontraron pérdidas de fracciones y la mejor resolución en la imagen del gel fue a 20 mg/ml del liofilizado, (figura 33), ya que si la muestra está muy diluida no se aprecian las bandas, pero si está muy concentrada se generan corrimientos debido a la saturación de proteínas, además la eliminación de iones disminuye las posibles interferencias en el campo eléctrico (Andrews, 1981).



**Figura 32.** Proteína de SMO liofilizada

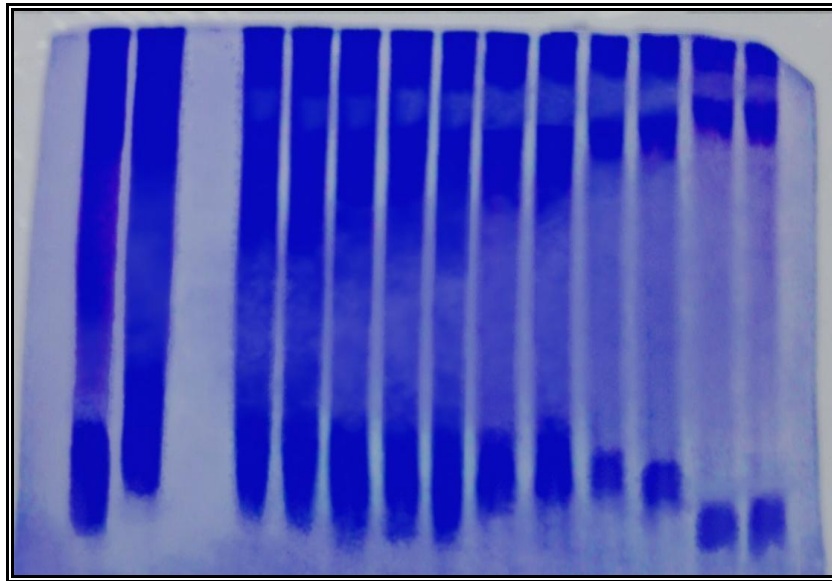
#### 4.4. Fraccionado de proteínas

La absorbancia a 280 nm, registrada para cada fracción durante la separación fue graficada en orden consecutivo, y se consideró el cromatograma de elución, Las primeras dos fracciones no mostraron absorbancia a 280 nm debido al tiempo que tardan las proteínas en cruzar la columna, las siguientes 10 fracciones tuvieron

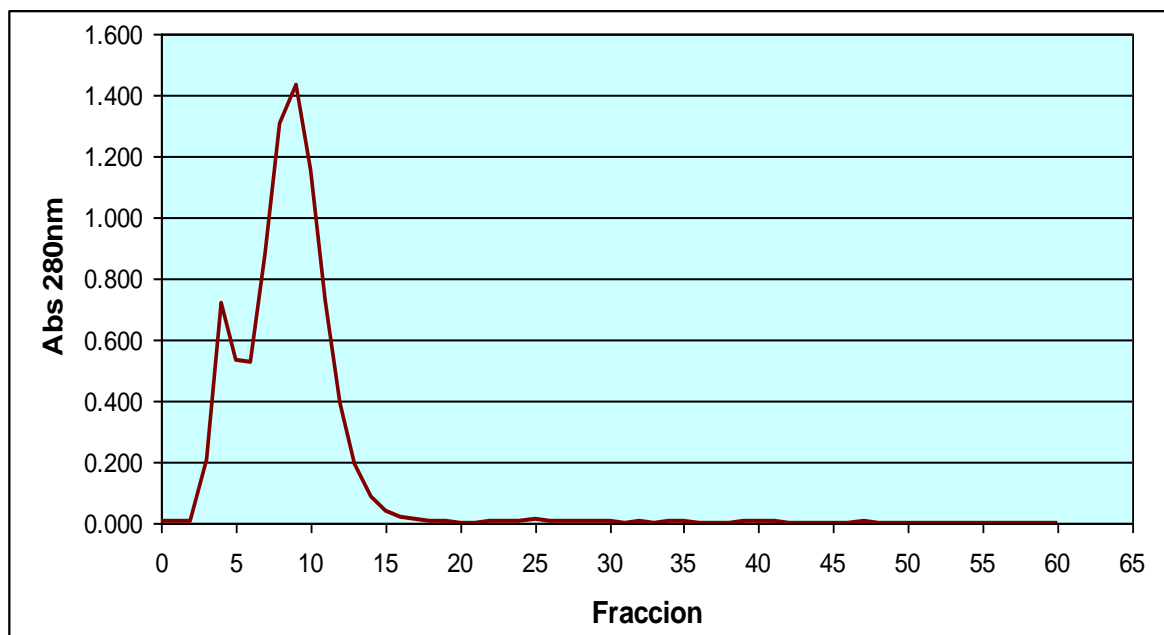
---

---

la mayor absorbancia presentando la máxima en la fracción 9 y decayó hasta valores erráticos cercanos al cero a partir de la fracción 17 (figura 34), eso sugiere que la cantidad de proteína eluyendo ya es mínima.



**Figura 33.** Separación de diferentes concentraciones de EPMO

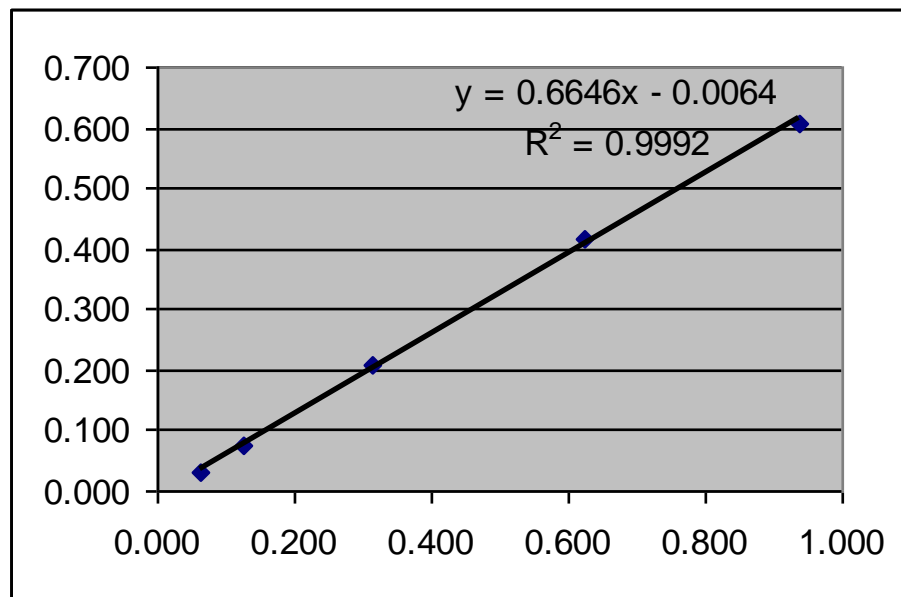


**Figura 34.** Cromatografía de exclusión molecular o permeación en gel

---

---

La concentración de proteína en cada fracción evaluada por el método Bradford, se presenta en la tabla 8, valores estimados a partir de la ecuación de la curva de calibración (figura 35), los valores obtenidos coinciden de manera proporcional con el cromatograma de exclusión molecular, pero solo hasta la fracción 9 caen dentro del rango de linealidad, sin embargo se encontró un ligero incremento en la fracción 13 por lo que se decidió continuar con su análisis.



**Figura 35.** Recta de calibración método Bradford

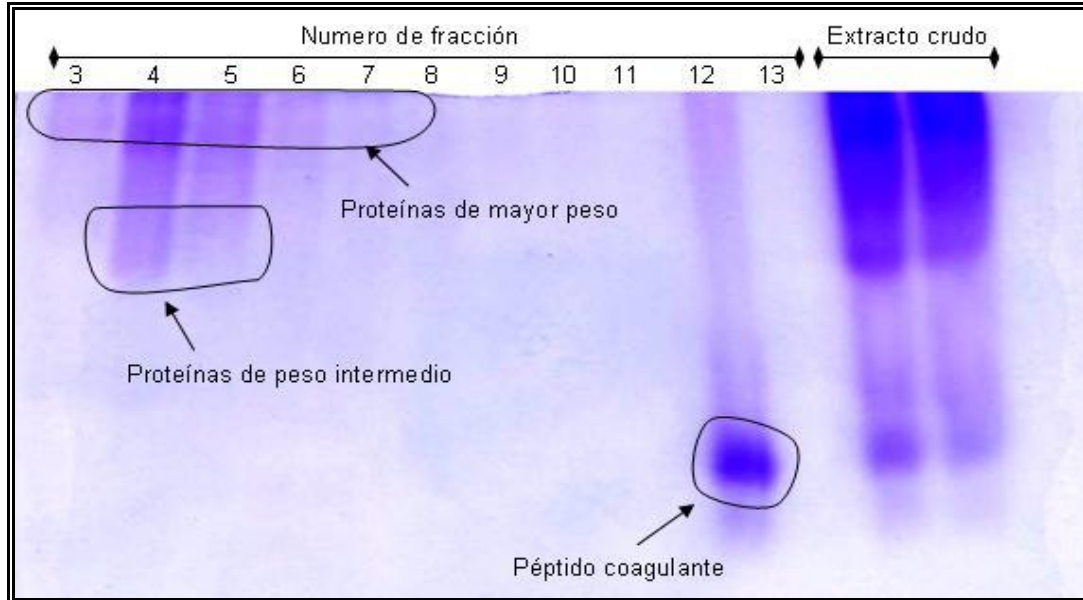
Al analizar estas fracciones por electroforesis, se encontró una separación muy clara, en las fracciones 3, 6 y 7 solo se encontraron proteínas de peso molecular elevado, pero en diferente concentración, mientras en la fracción 4 y 5 estaban combinadas con proteínas de peso intermedio, y los péptidos de bajo peso molecular aparecieron hasta la fracción número 12 prácticamente puras; las fracciones de la 8 a 11, no mostraron rastros de proteínas, sin embargo por la absorbancia probablemente hayan sido aminoácidos libres (figura 36), esto confirma que la columna de gel funcionó para separar las proteínas por su tamaño tal como lo sugieren los principios de cromatografía por exclusión molecular.

**Tabla 8.** Contenido de proteínas obtenido mediante el método de Bradford

<b>Fracción</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración mg/ml</b>	<b>Contenido proteico (mg)</b>
3	0.144	0.207	0.31
4	0.432	0.641	0.96
5	0.296	0.436	0.65
6	0.172	0.250	0.37
7	0.081	0.112	0.17
8	0.061	0.082	0.12
9	0.049	0.064	0.10
10	0.044	0.057	0.08
11	0.043	0.055	0.08
12	0.027	0.031	0.05
13	0.047	0.061	0.09
			Total = 3.00 mg

Se encontró que la separación del péptido coagulante se logra en 60 min, y el volumen de buffer necesario fue menor a 40 ml incluyendo el acondicionamiento de la columna, mientras que para la separación con resina de intercambio iónico, Gebremichael y cols. (2006) utilizaron 219 ml de buffer por 110 min.

Considerando el contenido de las proteínas con bajo peso molecular estimado por el método de Bradford, se calcula que conforman cerca del 2 % de la proteína total del extracto, mientras Foidl y cols. (2005) mencionan que la fracción del péptido coagulante representa tan solo alrededor del 1 %.



**Figura 36.** Confirmación de la separación de las fracciones de EPMO

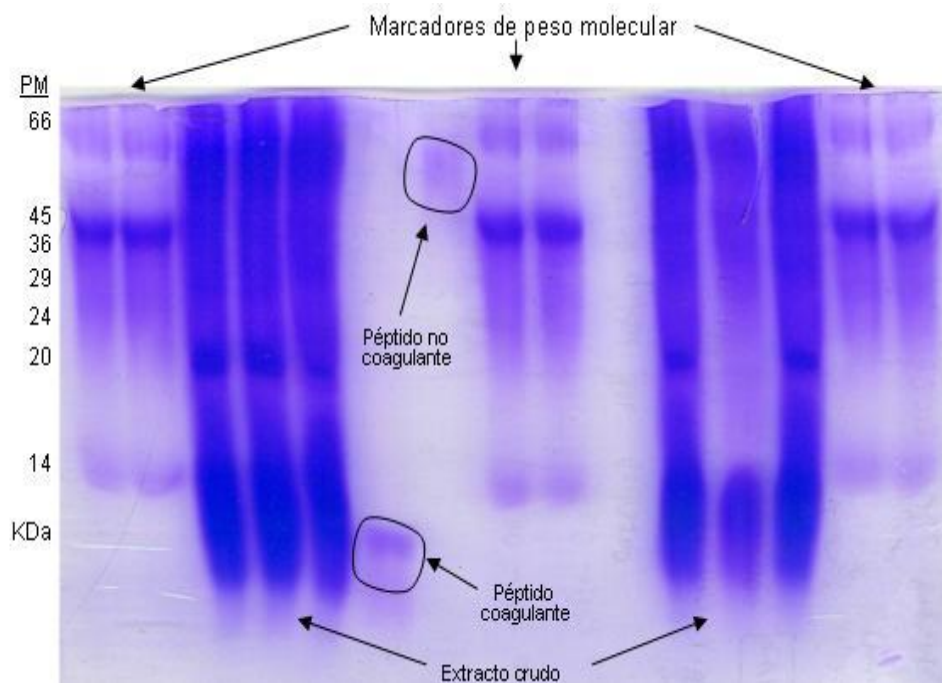
El peso molecular se estimó mediante la comparación del recorrido de cada fracción proteica del extracto con los marcadores de la mezcla SDS7, confirmando que el peso molecular de la fracción de menor peso es inferior a los 14 KDa, como lo sugieren Ndabigengesere. y Gassenschmidt (1995), la de mayor peso oscila alrededor de los 60 KDa, y la peso intermedio cerca de 20 KDa coincidiendo con Santos (2005) y Katre (2008) (figura 37).

#### 4.5. Análisis de aminoácidos

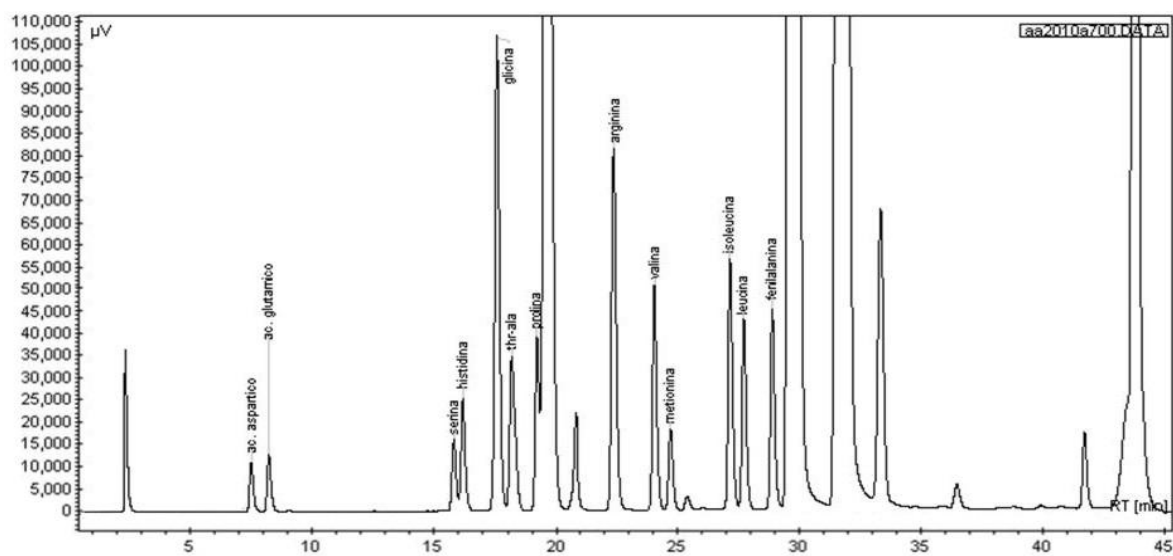
La identificación de los aminoácidos en los cromatogramas del HPLC se basó en la comparación de los tiempos de retención de las muestras con los patrones que se muestran en la figura 38, y su abundancia se estimó con el promedio de las áreas bajo los picos representativos de cada fracción.

En la figura 39 se muestra el cromatograma obtenido a partir de la fracción de menor peso molecular aislada del gel de poliacrilamida utilizado en electroforesis, posteriormente se obtuvo la proporción de aminoácidos que se muestra en la figura 40.

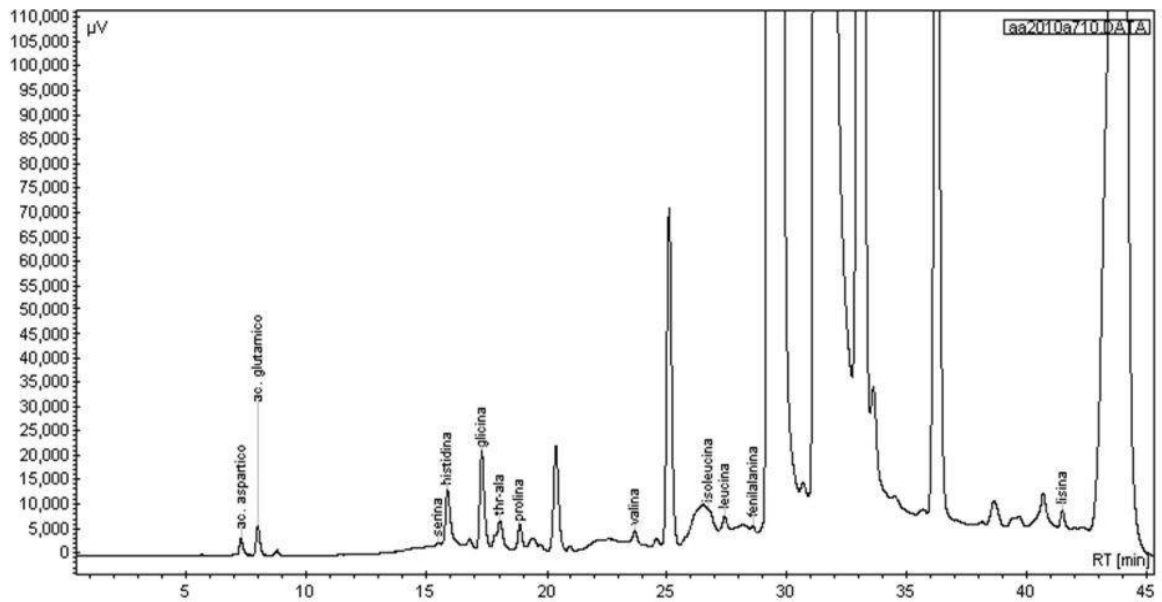




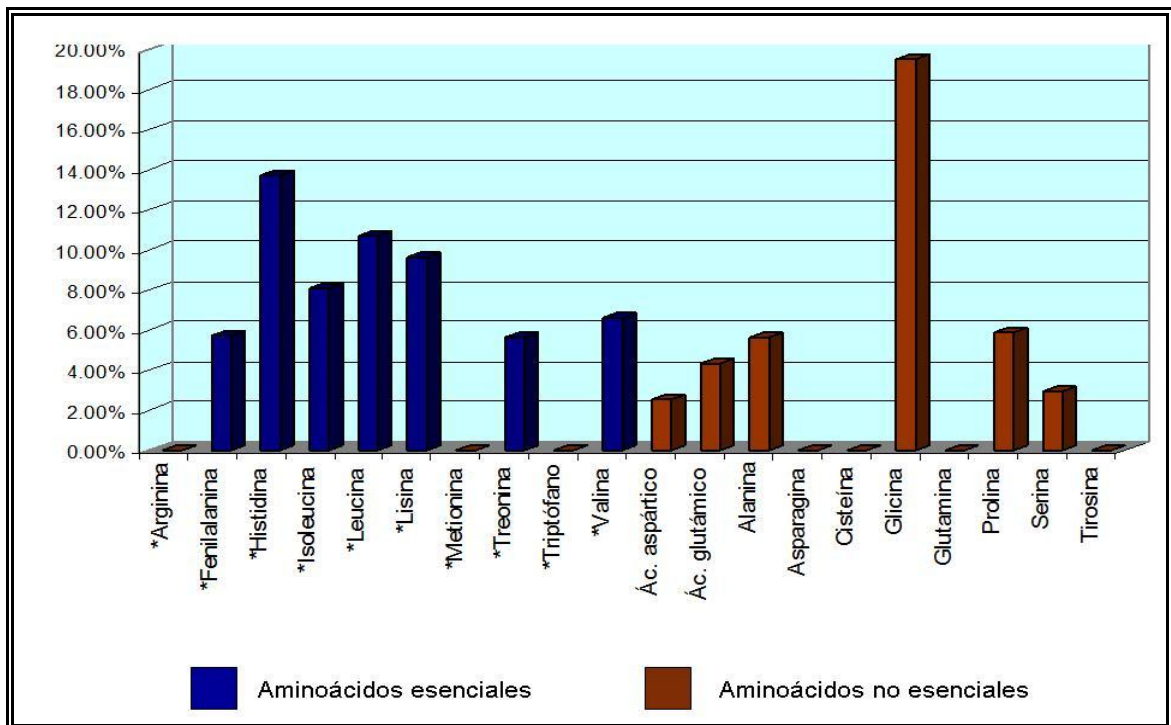
**Figura 37.** Peso molecular de las fracciones proteicas de SMO



**Figura 38.** Cromatograma de la mezcla de estándares de aminoácidos



**Figura 39.** Cromatograma de los aminoácidos de la fracción coagulante de SMO



**Figura 40.** Distribución de los aminoácidos en la fracción coagulante de SMO

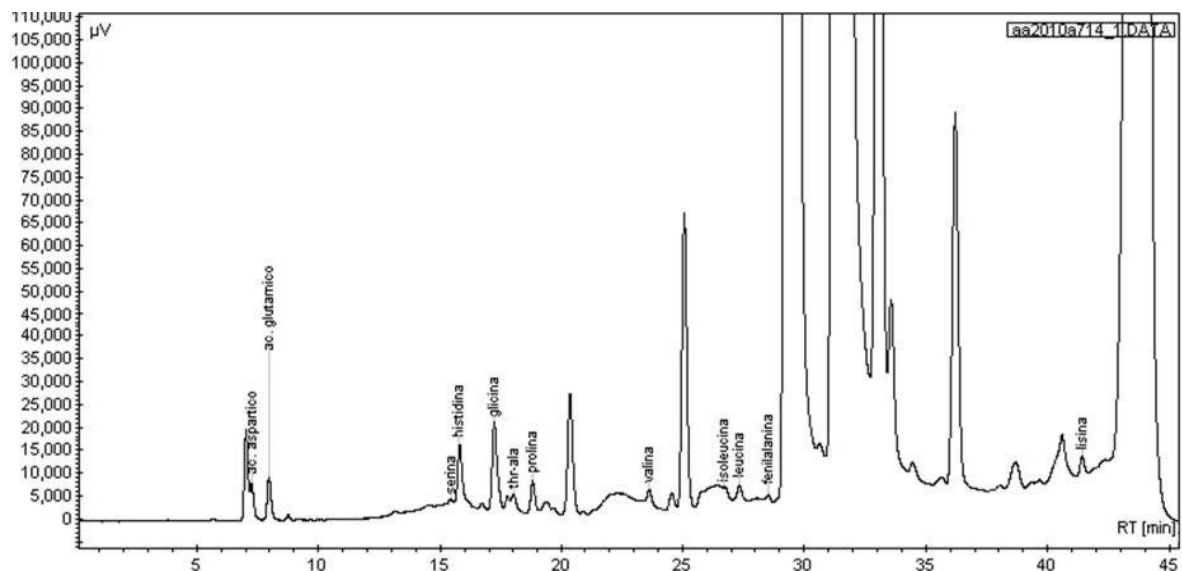
---

---

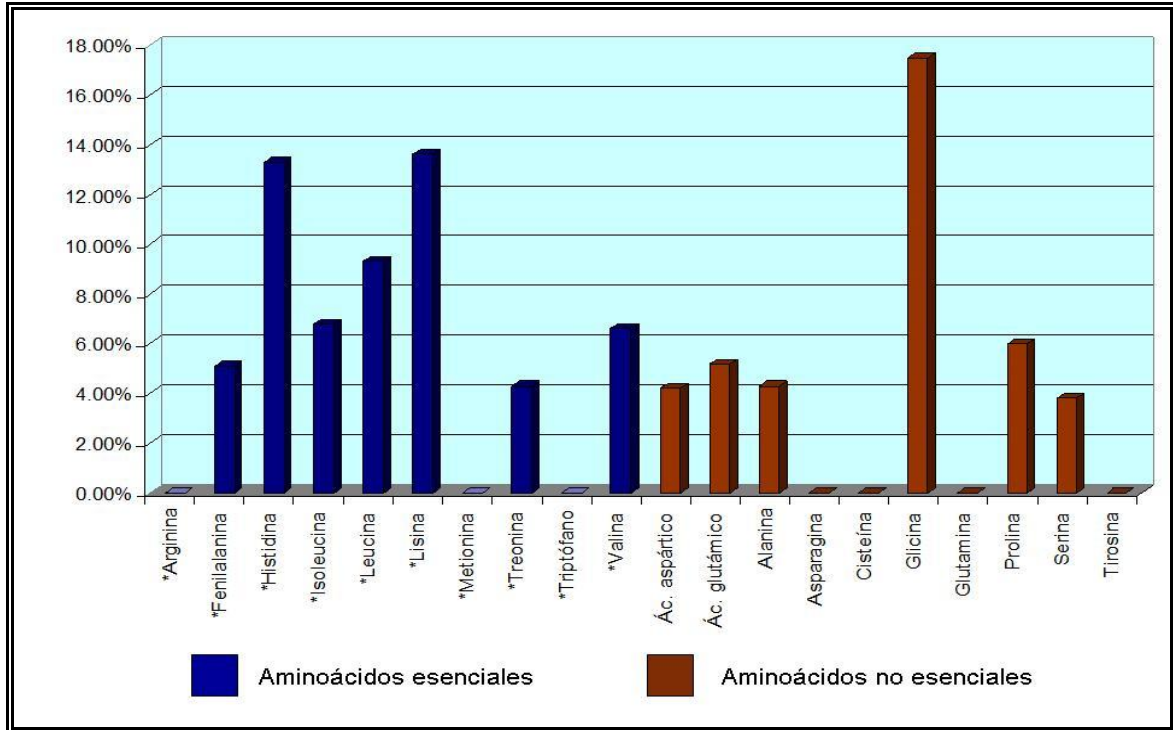
En todas las muestras fueron encontrados siete aminoácidos esenciales: histidina, lisina, leucina, isoleucina, treonina, valina y fenilalanina. También se identificaron 6 aminoácidos no esenciales: alanina, glicina, serina, prolina, ácido glutámico y ácido aspártico.

Se puede apreciar que entre los aminoácidos más abundantes de la fracción coagulante se encuentran, histidina y lisina, estos poseen grupos funcionales amino, que le confieren una carga neta positiva al péptido como mencionan Bathia y cols., (2007). Glicina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, alanina y prolina se consideran no polares, mientras los que poseen carga negativa (Krause, 2000), se presentan en baja proporción.

Los tiempos de retención y composición de aminoácidos de la fracción de 20 KDa se ilustran en las figuras 41 y 42 respectivamente, presenta la mayor proporción del aminoácido lisina, pero esta fracción también ha sido reportada como un posible factor antinutricional (Santos y cols., 2005).



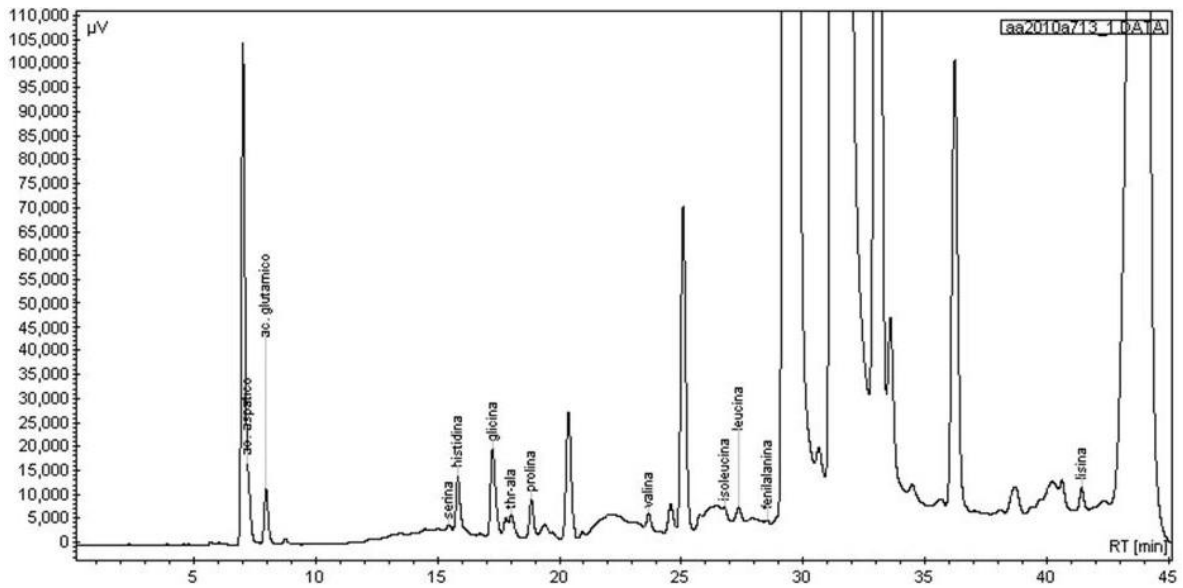
**Figura 41.** Cromatograma de los aminoácidos de la fracción de 20 KDa de SMO



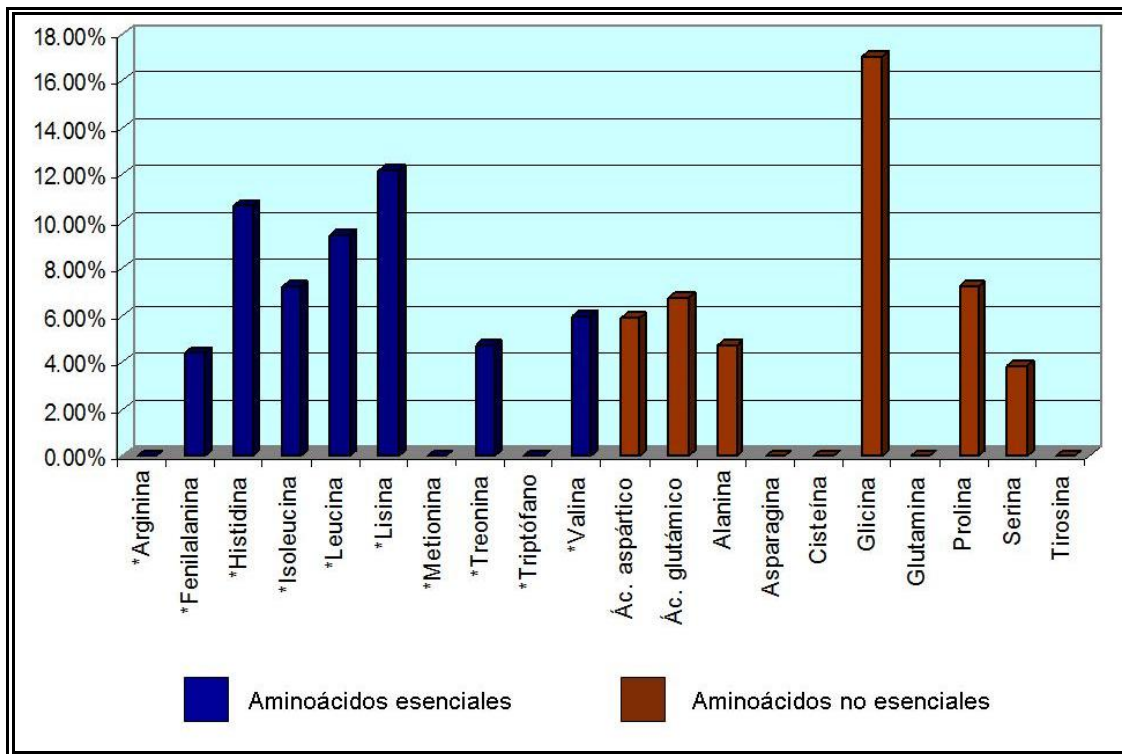
**Figura 42.** Distribución de aminoácidos en la fracción de 20 KDa

Los tiempos de retención de los aminoácidos de la fracción de mayor peso molecular se pueden apreciar en la figura 43, presenta una mayor cantidad de ácido glutámico, ácido aspártico, prolina y serina que las otras fracciones, y una distribución más uniforme en la proporción de aminoácidos esenciales (figura 44), por lo que puede llegar a considerarse como materia prima para suplementos nutricionales, dependiendo de futuras investigaciones sobre biodisponibilidad y toxicidad.

El aminoácido más abundante fue glicina para las tres fracciones proteicas, este tiene importancia fisiológica ya que forma complejos con muchos metabolitos y fármacos para su eliminación, y es importante en la hematopoyesis. Histidina es precursor de histamina que influye en el desempeño físico y posee actividad hipotensiva (Harper, 2004), esta información coincide con algunas de las propiedades que se le atribuyen a la planta.



**Figura 43.** Cromatograma de aminoácidos de la fracción no coagulante de SMO con mayor peso molecular



**Figura 44.** Distribución de aminoácidos de la fracción no coagulante de SMO con mayor peso molecular

---

---

No se encontraron los aminoácidos esenciales arginina, triptófano y metionina, los últimos dos son termolábiles y pudieron perderse durante la hidrólisis con ácido ya que dura 24 h a 110 °C. De los aminoácidos dispensables, no se encontró a asparagina, glutamina, tirosina y cisteína, los últimos dos también termolábiles.

El resto podría estar por debajo de los límites de detección, y tal vez se perdieron en la electroforesis como aminoácidos libres, ya que en los frutos predominan en dicho estado (Roy y cols., 2007), y su análisis no se realizó con las fracciones directo de la columna, sino que se recortaron del gel.

Por otra parte lisina se detectó en alta proporción, a pesar de que se considera el más termolábil y es un aminoácido limitante en algunas dietas, principalmente las que se basan en cereales (Krause, 2001).

---

---

## V. CONCLUSIONES

La extracción más efectiva de las proteínas de la semilla de *Moringa oleifera* se llevó a cabo con el buffer de fosfatos como solvente.

El proceso de diálisis mejora la resolución de los análisis y procedimientos específicos para las proteínas ya que se eliminan sales y otros compuestos indeseables de los extractos.

Liofilizar los extractos permite utilizarlos en concentraciones conocidas para evaluar sus diferentes propiedades.

El desarrollo de columnas con gel de poliacrilamida pulverizado facilita separación rápida de las fracciones proteicas.

Por medio del perfil de aminoácidos de las proteínas no coagulantes se encontró que glicina, lisina e histidina son los más abundantes.

Las proteínas de mayor peso molecular presentan mejor distribución de los aminoácidos.

---

---

## REFERENCIAS

1. Abdulkarim S., Long K., Lai O., Muhammad S., Ghazali H., (2005). Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry*. 93, 253–263.
2. Agrawal Deepti, Patidar Pankaj, Banerjee Tushar, Patil Shridhar, (2004). Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 39 977–981.
3. Amaglo Newton K., Bennett Richard N., Lo Curto Rosario B., Rosa Eduardo A.S., Lo Turco Vincenzo, (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*. 122, 1047–1054.
4. Andrews A.T., *Electrophoresis Theory, Techniques and Biochemical and clinical applications*, 1981, 2<sup>nd</sup> Edition, Oxford Science Publication.
5. Anwar Farooq, Hussain Abdullah Ijaz, Iqbal Shahid, Iqbal Bhangar Muhammad, (2007). Enhancement of the oxidative stability of some vegetable oils by blending with *Moringa oleifera* oil. *Food Chemistry* 103 1181–1191.
6. Badui Dergal Salvador. *Química de los alimentos*, 2006, Ed. Pearson. México, D.F. pp 119-236.
7. Bhatia Subhash, Othman Zalina, Latif-Ahmad Abdul, (2007). Coagulation flocculation process for POME treatment using *Moringa oleifera* seeds extract: Optimization studies. *Chemical Engineering Journal*. 133, 205–212.
8. Bhuptawat Hitendra, Folkard G.K., Chaudhari Sanjeev, (2007). Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. *Journal of Hazardous Materials*. 142, 477-482.
9. Burriel Marti F., Lucena Conde F., Arribas Jimeno S., Hernández Méndez J., *Química analítica Cualitativa*, 1985, Editorial Thompson.
10. Chang Raymond, *Fisicoquímica*, 2000, 3<sup>a</sup> Ed, Editorial Mc Graw Hill.
11. Chumark Pilaipark, Khunawat Panya, Sanvarinda Yupin, Phornchirasilp Srichan, Phumala-Morales Noppawan, Phivthong-ngam Laddawal, Srisawat Supath, Ratanachamnong Piyanee, Klai-upsorn S. Pongrapeeporn, (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 116, 439–446.
12. Dongmeza Euloge, Siddhuraju Perumal, Francis George, Becker Klaus, (2006). Effects of dehydrated methanol extracts of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves and three of its fractions on growth performance and feed nutrient assimilation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Aquaculture*. 261, 407–422.



- 
- 
13. Fakurazi S., Hairuszah I., Nanthini U., (2008). *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2611–2615.
  14. Foidl N, Makkar H., Becker Klaus, (2001). The potential of moringa oleifera for agricultural and industrial uses. *Dar Es Salaam*.
  15. Garritz A., Chamizo J., Química 1998. Editorial Pearson.
  16. Gassenschmidt Ursula, Jany Klaus D., Tauscher Bernhard, Niebergall Heinz, (1995). Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1243, 477-481.
  17. Ghebremichael Kebreab A., Gunaratna K.R., Henriksson Hongbin, Brumer Harry, Dalhammar Gunnel, (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*. 39, 2338–2344.
  18. Ghebremichael Kebreab A., Gunaratna K.R., Dalhammar Gunnel, (2006). Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70, 526–532.
  19. Gómez-Amores Lucía, Mate Alfonso, Miguel-Carrasco José L., Jiménez Luis, Jos Ángeles, Cameàn Ana M., Revilla Elisa, Santa-María Consuelo, Vázquez Carmen M., (2007). L-Carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 18, 533–540.
  20. Harper Harold Antony, *Bioquímica ilustrada*, 16ª edición, (2004), Editorial el manual moderno.
  21. Harris, Daniel C. *Análisis Químico Cuantitativo*, 5ª. edición, 1999, Editorial Revertè, Barcelona.
  22. Horton H. Robert. *Principios de Bioquímica*, 4ª Edición. 2008, Editorial Pearson Educación, México.
  23. Izadi Mojtaba, Cheraghydocheshmeh Maryam, Khorshidi Davood, Kiani Fatemeh, (2009). The effect of chronic L-carnitine tartarate supplementation on glucose and lactate concentration and aerobic capacity. *Procedia Social and Behavioral Sciences*. 1, 2692–2695.
  24. Hussein Abdelrazik, Rakesh Sharma, Reda Mahfouz, Ashok Agarwal, (2009). L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and Sterility*. 91, 589-596.
  25. Jaiswal Dolly, Kumar Rai Prashant, Kumar Amit, Mehta Shikha, Geeta Watal, (2009). Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 123, 392–396.

- 
- 
26. Karadi Ravindra V., Gadgeb Navneet B., Alagawadi K., Savadi Rudraprabhu V., (2006). Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethyleneglycol induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 105, 306–311.
  27. Katayon S., Megat Mohd Noor M.J., Asma M., Abdul Ghani L.A., Thamer A.M., Azni I., Ahmad J., Khor B.C., Suleyman A.M., (2006). Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. *Bioresource Technology*. 97, 1455–1460.
  28. Katre Uma V., Suresh C.G., Khan M. Islam, Gaikwad Sushama M., (2008). Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 203–207.
  29. Knüttel-Gustavsen Seline, Harmeyer Johein, (2007). The determination of L-carnitine in several food samples. *Food Chemistry*. 105, 793–804.
  30. Krause Mendelson Marie, *Nutrición y dietoterapia de Krause*, 10<sup>a</sup> edición, 2000, Editorial Mc Graw Hill, Madrid.
  31. Kumar Reddy D. Harikishore, Seshaiaha K., Reddy A.V.R., Madhava Rao M., Wang M.C., (2010). Biosorption of Pb<sup>2+</sup> from aqueous solutions by *Moringa oleifera* bark: Equilibrium and kinetic Studies. *Journal of Hazardous Materials*, 174, 831-838.
  32. Kumari Pushpa, Sharma Parul, Srivastava Shalini, Srivastava M., (2005). Arsenic removal from the aqueous system using plant biomass: a bioremedial approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32, 521–526.
  33. Ladizinsky G., Hymowitz T., (1979). Seed Protein Electrophoresis in Taxonomic and Evolutionary Studies. *Theoretical and Applied Genetic*. 54, 145-151.
  34. Maikokera R., Kwaambwa H., (2007). Interfacial properties and fluorescence of a coagulating protein extracted from *Moringa oleifera* seeds and its interaction with sodium dodecyl sulphate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 55, 173–178.
  35. Makkar H.P.S., Becker K., (1996). Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Science Technology*. 63, 211-228
  36. Muyibi Suleyman Aremu, Okuofu Charles A., (1995). Coagulation of low turbidity surface water with *Moringa oleifera* seeds. *International Journal Environment Studies*. 48, 263-273.
  37. Muyibi Suleyman Aremu, Evison Lilian M., (1999). Floc settling characteristics of turbid water coagulated with *Moringa Oleirifera* seeds. *International Journal Environment Studies*. 56, 483-495.

- 
- 
38. Muyibi Suleyman Aremu, Megat Johari Megat Mohd, Noor, Fakhrul-Razi Ahmadun, Ameen Emad S.M, (2002). Bench Scale Studies for Pretreatment of Sanitary Landfill Leachate with *Moringa oleifera* Seeds Extract. International Journal Environment Studies. 59, 513-525.
  39. Ndabigengesere Anselme, Narasiah K. Subba, Talbot Brian G. (1995). Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. Water Research. 29-2, 703-710
  40. Ndabigengesere Anselme, Narasiah K. Subba, (1998). Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. Water Research. 32, 781-791
  41. Rashid Umer, Anwar Farooq, Moser Bryan R., Knothe Gerhard, (2008). *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. Bioresource Technology. 99, 8175–8179.
  42. Rastogi Trapti, Ghorpade Deepali S, Deokate U, Khadabadi S, (2009). Studies on Antimicrobial Activity of *Boswellia serrata*, *Moringa oleifera* and *Vitex negundo*: A comparison. Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry. 1, 75-77.
  43. Raven Peter H., Berg Linda R., Environment, 4<sup>th</sup>Ed. 2004, Editorial Wiley. pp 104-110
  44. Reyes-Sánchez Nadir, Ledin Stig, Ledin Inger, (2006). Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua. Agroforestry Systems. 66, 231–242.
  45. Reyes-Sánchez Nadir, Spöndly Eva, Ledin Inger, (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. Livestock Science. 101, 24–31.
  46. Richter Nahid, Siddhuraju Perumal, Becker Klaus, (2003). Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture 217 599– 611
  47. Rodríguez-Núñez Jesús Rubén, (2008). Capacidad de coagulación-adsorción de cobre, del péptido de Semilla de *Moringa oleifera* y Quitosano en el tratamiento de aguas. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Sonora.
  48. Roy Sadhan K., Chandra Krishnendu, Ghosh Kaushik, Mondal Subhas, Maiti Debabrata, Ojha Arnab K., Das Debsankar, Mondal Soumitra, Chakraborty Indranil and Islam Syed S., (2007). Structural investigation of a heteropolysaccharide isolated from the pods (fruits) of *Moringa oleifera* (Sajina). Carbohydrate Research. 342, 2380–2389.
  49. Sánchez-Machado D., López-Cervantes J., Ríos-Vázquez N., (2006). High performance liquid chromatography method to measure  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. Journal of Chromatography A. 1105, 111–114.

- 
- 
50. Santos A., Argolo A., Coelho L., Paiva P., (2005). Detection of water soluble lectin and antioxidant component from Moringa oleifera seeds. *Water Research*. 39, 975–980.
  51. Skoog Douglas A., West Donald M., Holler F. James, Crouch Stanley R., (2005). *Fundamentos de Química Analítica*, 8ª edición, Editorial Thompson.
  52. Verma Arti R., Vijayakumar M., Mathela Chandra S., Rao Chandana V., (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2196–2201.
  53. Wilson Andrew D.H., Hart Andrew, Wiberg Mikael, Terenghi Giorgio, (2010). Acetyl-L-carnitine increases nerve regeneration and target organ reinnervation - A morphological study. 63, 1186-1195.
  54. Yu-Hui Tuan, Dixon Phillips R., Dove C. Robert,(1999). Predicting integrated protein nutritional quality Part 2: Integrated protein nutritional quality predicted from Amino Acid Availability Corrected Amino Acid Score (AACAAAS). *Animal Study*. 12, 1807-1816.

#### **DIGITOGRAFIA**

55. <http://www.fai-son.org/programas/moringa/index.php>, (2008), Consultado 14/10/2009
56. <http://www.lafuerzadelvalle.com/vernoticias.php?artids=1995&categoria=15> consultado 04/08/2010
57. <http://www.moringaexports.com> Consultado 12/05/2011
58. <http://www.botanical-online.com/hojastipos.htm>. Consultado 12/05/2011
59. [www.beeglorious.com/moringa-oil.html](http://www.beeglorious.com/moringa-oil.html). Consultado 20/08/2011