

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA EXTRAER PROTEÍNAS
TOTALES DEL FOLLAJE DE AMARANTO (*Amaranthus dubius*)**

Presentado por:

LAURA CRISTINA BÓNOLI CAMACHO

Trabajo de Grado presentado ante la Universidad de Oriente como
requisito parcial para optar al título de Ingeniero Químico

Barcelona, agosto de 2010

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA EXTRAER PROTEÍNAS
TOTALES DEL FOLLAJE DE AMARANTO (*Amaranthus dubius*)**

ASESORES

Ing. Quím. Lucas Álvarez Martínez (Ph.D.)

Asesor académico

Licda. Quím. Susana Lobos (Ph.Sc.)

Asesor industrial

Barcelona, agosto de 2010

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE ANZOÁTEGUI
ESCUELA DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA EXTRAER PROTEÍNAS
TOTALES DEL FOLLAJE DE AMARANTO (*Amaranthus dubius*)**

JURADOS

Ing. Quím. Lucas Álvarez Martínez (Ph.D.)
Asesor académico

Licda. Quím. Ana Ciarfella (Dra.)
Jurado Principal

Ing. Quím. Shirley Marfisi (Dra.)
Jurado Principal

Barcelona, agosto de 2010

RESOLUCIÓN

De acuerdo al artículo 41 del reglamento de trabajos de grado:

“Los trabajos de grado son exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y sólo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, el cual participará al Consejo Universitario”.

RESUMEN

El amaranto es un pseudocereal, nativo de la región andina, de alto valor nutricional por su elevado contenido en proteína, tanto en su grano como en su follaje. La mayoría de los estudios realizados sobre las proteínas de amaranto han sido respecto a las presentes en el grano de la planta, sin embargo, se sabe que las hojas también presentan un contenido notable de proteínas que puede ser aprovechado. Por lo antes expuesto, se llevó a cabo la evaluación del proceso de extracción de proteínas totales del follaje de amaranto, empleando NaOH 0,2% (m/v) como solvente extrayente y harina de hojas de *Amaranthus dubius*, enfocado en el efecto de determinadas variables sobre el rendimiento de extracción. Se diseñó un experimento completamente aleatorizado de tres factores fijos (relación masa de harina de hoja de amaranto/volumen de solvente, carga de solvente y tiempo de agitación) con tres niveles cada uno. Para el factor relación masa de harina/volumen de solvente se establecieron los niveles de dilución 1:10, 1:12 y 1:15. Para el factor carga de solvente se usaron los niveles, una, dos y tres cargas con solvente fresco, empleando, para cada carga, el volumen correspondiente a las relaciones masa/volumen evaluadas. Para el factor tiempo de agitación se emplearon los niveles: 1, 2 y 3 horas. El efecto de los factores se evaluó mediante la prueba factorial de la varianza para modelos lineales de tres factores fijos con tres niveles, generando a partir de las condiciones de extracción un modelo lineal generalizado que fue capaz de explicar el 96,3% de la variación observada en el rendimiento. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo con la dilución 1:15, 2 horas de agitación y 3 cargas de 15 ml cada una (62% de proteínas extraídas en base seca).

Palabras clave: *Amaranthus dubius*, amaranto, extracción, proteínas, análisis factorial.

DEDICATORIA

A mi madre, Ysabel Camacho.

A mi padre Stefano Bónoli, a Mercedes Matos, a mis hermanas Alessandra, Claudia y Adriana, a mis tías Ruth y Gladys y a mi abuela Aura. También está dedicada con mucho cariño a mis amigos, tanto a los más antiguos como a los más recientes, quienes estuvieron conmigo en los momentos felices y en los momentos difíciles; a Zulivis, Quelin, Armi, Eileen, Zoraida Mercedes, Lourdarelys, Maylen, Corelys, Guillermo, José Ángel, Leonel, Freddy, Julio, Hernán, David, Ivan, Kelvin, a todos aquellos que compartieron conmigo a lo largo de la carrera y a Álvaro.

A todo aquel que el contenido de este trabajo le sea de utilidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Oriente, la casa más alta, por permitirme alcanzar la formación como Ingeniero Químico dentro de sus espacios.

A la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), por abrirme sus puertas y permitirme la realización de mi pasantía de grado, además de ofrecerme una experiencia de formación profesional invaluable.

A mi asesor académico Dr. Lucas Álvarez Martínez, por aceptar la asesoría de este trabajo, por haberme apoyado en la búsqueda de mi pasantía de grado en el IDEA y por su ayuda durante todo el proceso de elaboración del presente trabajo.

A mi asesora industrial Dra. Susana Lobos, por su orientación para llevar a cabo el trabajo y todos los ensayos implicados en el mismo, por sus consejos, el conocimiento compartido y la amistad brindada.

A Elevina Pérez y Pablo Rodríguez del Instituto de Tecnología de Alimentos de la UCV.

A mi tía Gladys Camacho y a mi prima Aura Rodríguez, por abrirme las puertas de su casa y facilitar así la realización de mi pasantía de grado.

A Dubrasvka Rodríguez, por el tiempo invertido en darme la explicación de los protocolos necesarios para cumplir con los objetivos planteados, por su orientación,

por estar pendiente de mi desempeño, por su apoyo en los momentos difíciles a lo largo del desarrollo del presente trabajo y por su valiosa amistad.

A Iván Sojo, por sus invaluable consejos y orientación además de su valiosa colaboración y apoyo para llevar a cabo, de la mejor forma posible, los diferentes ensayos requeridos para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo. A Tomás Bonillo, por todos sus consejos y el conocimiento brindado. A Yulissa Antequera y Elisamelis Martínez, por sus consejos y apoyo. A todos los miembros del Laboratorio de Estructura Molecular del Centro de Biociencias de la Fundación IDEA, por ser tan amables, ofrecerme su amistad y estar pendientes de mi buen desempeño en el laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Polimorfismo Genético, por facilitar los equipos para la preparación de la harina de hojas de amaranto.

A mis queridos amigos José Ángel Danglad, Guillermo Linero y Zulivis Vívenes, por la colaboración prestada para poder cumplir con las formalidades de la entrega del proyecto de trabajo de grado a la Comisión de Trabajos de Grado y por su apoyo incondicional, dándome siempre ánimos para no desfallecer en los momentos difíciles a lo largo de la carrera y de la realización de mi pasantía de grado.

A Lizeth Colón, por su ayuda y colaboración brindada para realizar las pruebas en el laboratorio de análisis de alimentos de la Universidad de Oriente Núcleo Anzoátegui.

A Stefano y a Mercedes, por todo el tiempo invertido para que el trabajo de grado se analizara, redactara y presentara de forma impecable.

A Dios, de último por cuestiones de formalidad pero no menos importante, por ser mi pilar de apoyo y por ayudarme a superar los obstáculos que se presentaron a lo largo de la realización de mi pasantía de grado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL	x
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II	6
2. Marco teórico	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Amaranto.....	10
2.2.1. Historia del amaranto	11
2.2.2. Valor alimenticio.....	13
2.2.3. Valor agroclimático.....	17
2.3. Proteínas.....	17

2.3.1. Rol de las proteínas en la nutrición.....	19
2.3.2. Extracción y purificación de proteínas.....	20
2.4. Caracterización y cuantificación de proteínas.....	25
2.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	25
2.4.2. Método del ácido bicinconínico (BCA).....	31
CAPÍTULO III.....	34
3. MARCO METODOLÓGICO.....	35
3.1. Identificación de los grupos de proteínas presentes en la harina de las hojas de amaranto (<i>Amaranthus dubius</i>).....	35
3.2. Cuantificación de las proteínas encontradas en las hojas de amaranto (<i>Amaranthus dubius</i>).....	47
3.3. Evaluación del efecto de las variables relación masa a volumen de sólidos foliares/solvente, número de cargas con solvente fresco y tiempo de agitación, sobre el rendimiento de la extracción de proteínas totales presentes en el follaje del <i>Amaranthus dubius</i>	50
3.4. Comparación del rendimiento de extracción de proteínas totales presentes en el follaje del <i>Amaranthus dubius</i> bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas	52
3.5. Ejemplo de cálculos	52
3.5.1. Cuantificación de la masa de proteína presente en los extractos con NaOH 0,2% m/v	52
3.5.2. Determinación del contenido de proteína cruda en harina de hojas de amaranto mediante el método de determinación de nitrógeno orgánico de Kjeldahl.....	57
3.5.3. Cálculo del rendimiento de extracción de proteína total.....	58
3.6. Tratamiento estadístico de los datos	60

3.7. Equipos, materiales, sustancias y herramientas	64
CAPÍTULO IV	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.1. Identificación de grupos de proteínas presentes en las hojas de amaranto (<i>Amaranthus dubius</i>).....	70
4.2. Cuantificación de las proteínas presentes en las hojas de amaranto (<i>Amaranthus dubius</i>) mediante el método de BCA	91
4.3. Evaluación del efecto de las variables relación masa a volumen de sólidos foliares/solvente, número de cargas con solvente fresco y tiempo de agitación, sobre el rendimiento de la extracción de proteínas totales presentes en el follaje del <i>Amaranthus dubius</i>	98
4.4. Comparación del rendimiento de extracción de proteínas totales presentes en el follaje del <i>Amaranthus dubius</i> bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas	114
CONCLUSIONES	115
RECOMENDACIONES	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO A.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO B	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO C	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO D.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO E	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO F	¡Error! Marcador no definido.

ANEXO G.....;Error! Marcador no definido.
ANEXO H.....;Error! Marcador no definido.
ANEXO I;Error! Marcador no definido.

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Masa de harina de hojas de amaranto y volumen de solvente empleados para la extracción de proteínas.....	37
Tabla 3.2. Identificación de muestras obtenidas con NaOH 0,2% m/v, a las diferentes condiciones de extracción.	38
Tabla 3.2. Identificación de muestras obtenidas con NaOH 0,2% m/v, a las diferentes condiciones de extracción (continuación).....	39
Tabla 3.3. Volumen medido de extractos obtenidos con NaOH.....	40
Tabla 3.3. Volumen medido de extractos obtenidos con NaOH (continuación).....	41
Tabla 3.4. Descripción de muestras obtenidas mediante extracción con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na ₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v DTT y posterior precipitación con 10% m/v TCA – 0,2% m/v DTT.	43
Tabla 3.5. Preparación y distribución de muestras y marcadores moleculares en geles de poliacrilamida–SDS para identificación de proteínas.	46
Tabla 4.1. Promedio de volúmenes (ml) de extracto medidos para las diferentes condiciones de extracción.	72
Tabla 4.2. Análisis de varianza para un solo factor. Variación del volumen medido en función del tiempo de agitación, para los tres niveles de dilución evaluados.....	75
Tabla 4.3. Promedio de volúmenes (ml) de extracto medidos para las condiciones de extracción relación masa de harina/volumen de solvente y de cargas de solvente.....	75
Tabla 4.4. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:10.	77

Tabla 4.5. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:12.	77
Tabla 4.6. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:15.	78
Tabla 4.7. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para una carga de solvente.	79
Tabla 4.8. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para dos cargas de solvente.	79
Tabla 4.9. Prueba de la t de <i>Student</i> para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para tres cargas de solvente.	79
Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2%.	92
Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2% (Continuación).	93
Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2% (Continuación).	94
Tabla 4.11. Promedio de masas totales extraídas para las diferentes condiciones de extracción.	95
Tabla 4.12. Efecto de las condiciones de extracción sobre la masa total de proteína extraída.	97

Tabla 4.13. Prueba de la t de Student para muestras independientes. Efecto del número de cargas sobre la masa total de proteína extraída.	97
Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75%.....	99
Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75% (Continuación).....	100
Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75% (Continuación).....	101
Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44%.....	102
Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44% (Continuación).....	103
Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44% (Continuación).....	104
Tabla 4.16. Coeficientes del modelo lineal del análisis de varianza.....	105
Tabla 4.17. Pruebas de los efectos inter-sujetos; variable dependiente: rendimiento de extracción de proteínas (Tabla generada por el programa SPSS).	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ejemplos de diferentes especies del género <i>Amaranthus</i> . De izquierda a derecha se observa: <i>A. caudatus</i> , <i>A. hypochondriacus</i> y <i>A. dubius</i> (Hirt's Gardens, s/f; Wikipedia, s/f a; Seeds of Change, s/f).....	10
Figura 2.2. Estructura de las proteínas (Nelson y Cox, 2000)	18
Figura 2.3. Cromatografía de intercambio catiónico para purificación	23
Figura 2.4. Cromatografía de exclusión para purificación de proteínas (Nelson y Cox, 2000).....	24
Figura 2.5. Cromatografía de afinidad para purificación de proteínas (Nelson y Cox, 2000).	25
Figura 2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (Nelson y Cox, 2000).....	27
Figura 2.7. Polimerización y entrecruzamiento de la acrilamida (Thermo Scientific, 2008).	28
Figura 2.8. Estructura de la molécula de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sodium Dodecyl Sulphate, en inglés) (Nelson y Cox, 2000).....	29
Figura 2.9. Identificación de una muestra de proteína desconocida. (A) Determinación del peso molecular de una muestra de proteína desconocida empleando como patrón proteínas de peso molecular conocido (McKee y McKee, 2003). (B) Estimación del peso molecular en función de la movilidad electroforética. La línea trazada a través de los puntos negros corresponde a las movilidades de proteínas de peso molecular conocido. Al graficar la movilidad de una proteína de peso molecular desconocido (punto de color rojo) se obtiene un peso molecular de 25 000 Da (Bohinski, 1991).	31

Figura 2.10. Esquema de la reacción para la cuantificación de proteínas empleando ácido bicinonínico (BCA) (Pierce Biotechnology, 2004).	32
Figura 3.1. Esquema seguido para la extracción de proteínas a partir de harina de hojas de amaranto, empleando como solvente extrayente NaOH al 0,2% m/v.	36
Figura 3.2. Protocolo alternativo para la extracción de proteínas de la harina de hojas de amaranto.....	44
Figura 3.3. Protocolo alternativo de extracción. Precipitación de proteínas partiendo de extracto obtenido con NaOH 0,2% m/v.	45
Figura 3.4. Cuantificación de proteínas con BCA en microplacas (Thermo Scientific, 2004).	49
Figura 4.1. Gel 1. Proteínas en extractos con NaOH 0,2% m/v en gel de poliacrilamida-SDS al 10% m/v.El gel fue teñido con plata. Los pesos moleculares de las proteínas del marcador molecular de BioLabs se muestran en el extremo izquierdo y los del marcador de Promega en el extremo derecho. Las muestras cargadas son S4, S6 y S8.	81
Figura 4.2. Gel 1 analizado mediante la herramienta “análisis de geles” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra S4 y al marcador molecular de Promega (MM2). .	84
Figura 4.3. Gel 1 modificado con filtro de imagen que muestra sólo el componente azul y analizado mediante la herramienta “análisis de geles” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra S4 y al marcador molecular de Promega (MM2).....	85
Figura 4.4. Gel 2. Proteínas en extractos con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na ₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% DTT y en resuspensiones luego de precipitar con solución 10% TCA – 0,2% DTT en acetona fría, en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel fue teñido con plata. Los pesos moleculares de las proteínas del marcador	

molecular de Promega se muestran en el extremo izquierdo y los del marcador de BioLabs en el extremo derecho. Las muestras cargadas fueron A, B y C. 86

Figura 4.5. Gel 2 analizado mediante la herramienta “análisis de geles” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra B y al marcador molecular de Promega (MM2). ... 89

Figura 4.6. Gráficas de las medias marginales estimadas del modelo factorial de la interacción tiempo–dilución–carga obtenidas mediante el programa SPSS. En el eje X se representa el tiempo, en el eje Y se representa el rendimiento para las diferentes diluciones en cada uno de niveles de carga: una carga (A), dos cargas (B) y tres cargas (C). 109

Figura 4.7. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción dilución-carga, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. Las cargas se muestran como datos categóricos (1, 2 y 3 cargas) y la dilución como datos continuos entre $1:10 = 0,100$ y $1:15 = 0,067$. Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran como datos continuos en el eje vertical (Z). 111

Figura 4.8. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción dilución-tiempo, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. El tiempo como datos continuos entre 1 y 3 horas y la dilución como datos continuos entre $1:10 = 0,100$ y $1:15 = 0,067$. Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran como datos continuos en el eje vertical (Z). 112

Figura 4.9. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción tiempo-carga, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. El tiempo se muestran como datos continuos entre 1 y 3 horas y las cargas como datos categóricos

(1, 2 y 3 cargas). Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran comodatos continuos en el eje vertical (Z). 113

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), ubicada en terrenos de la nación, en el Valle de Sartenejas del Municipio Baruta, Distrito Capital, desempeña actividades en el ámbito de la investigación científica, tecnológica y social, y desde su creación en 1979 viene perfilando una gestión comprometida con las necesidades de desarrollo que exige el país, por lo cual el instituto busca aportar soluciones concretas a las realidades del agro, la salud integral, el sector energético, el acontecer socio-político y el sistema de Educación Superior (IDEA, 2009a).

Dentro del contexto de los objetivos de la institución, ésta pretende abarcar las actividades previstas en investigación, desarrollo y transferencia tecnológica e innovación en materia agrícola. En este sentido, estima dar respuesta a las demandas y necesidades sectoriales planteadas en el área de la producción agrícola y el desarrollo sostenible, a modo de contribuir con la seguridad agroalimentaria de la nación a través de la implementación de los resultados producto de las investigaciones desarrolladas (IDEA, 2009b).

En la actualidad, cada vez se hace más difícil satisfacer las necesidades alimentarias y nutricionales de la población en general, siendo más marcadas en la población infantil y en aquella sujeta a regímenes específicos de alimentación; por lo que es necesaria la búsqueda de fuentes alternativas o no tradicionales de alimentos ricos, principalmente en proteínas.

El cultivo de especies de amaranto, un pseudocereal de cultivo anual (Galindo, 2001), representa una excelente alternativa para complementar los cultivos considerados tradicionales a nivel mundial, tales como trigo, arroz, soya, maíz, entre otros, debido a su valor nutricional y condiciones favorables de cultivo. Entre las especies de amaranto comúnmente empleadas para la siembra están el *Amaranthus cruentus*, y el *A. hypochondriacus*, entre otras. En países como México y Estados Unidos de América, ya se ha implementado la siembra de amaranto para la elaboración de diferentes productos alimenticios de gran valor nutricional (Pantanelli, 2001). En Venezuela, el amaranto o pira, como también se le llama, es conocido por la población más por sus propiedades medicinales, que por las nutricionales y, en el país, no se ha desarrollado un sistema que fomente su cultivo para su uso como fuente de alimento. En años recientes, se llevó a cabo el proyecto denominado PIRA (Proyecto Innovador Revolucionario Alimentario) que tenía por objetivo incentivar la siembra y elaboración de productos derivados del amaranto (Gobierno en línea, 2006); sin embargo, éste no tuvo continuidad y el amaranto sigue siendo destinado a un uso prácticamente artesanal, por parte de la población que conoce sus propiedades.

Según diversas investigaciones y estudios realizados sobre las características y propiedades del amaranto (Acevedo y col., 200; Juan y col., 2007; Martínez, Añón, 1996; Teutonico, Dietrich, sin fecha), principalmente de su semilla, éste constituye un alimento altamente nutritivo debido a su elevado contenido de proteínas, el cual es superior al de alimentos como arroz, maíz y trigo, e incluso al de algunas carnes. Si bien los estudios realizados se enfocan en el aprovechamiento de las proteínas presentes en el grano, también se sabe que en las hojas de la planta existe un contenido de proteínas que puede ser aprovechado como complemento o fortificante en otros alimentos (Teutonico, Dietrich, sin fecha).

Para tener acceso a las proteínas presentes en las estructuras del amaranto, éstas deben ser sometidas a un proceso de extracción, empleando solventes adecuados de

acuerdo con las propiedades de solubilidad de éstas. En diferentes trabajos de investigación publicados (Martínez, Añón, 1996; Konishi y col., 1991; Barba y col., 1992), se hace referencia a las condiciones empleadas para la extracción de proteínas a partir del grano de amaranto; no obstante, como se mencionó anteriormente, no se tienen suficientes referencias acerca de las condiciones requeridas para extraer las proteínas de las estructuras foliares del amaranto. Por lo antes expuesto, surgió la necesidad de estudiar los procesos que permitan la extracción eficiente de las proteínas presentes en las diferentes estructuras de la planta, en especial en aquellas especies cuyos follajes contengan cantidades relevantes de proteínas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el proceso para la extracción de proteínas totales a partir de hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*).

1.2.2. Objetivos específicos

1. Identificar los grupos de proteínas presentes en las hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*).
2. Cuantificar las proteínas encontradas en las hojas de la misma especie de amaranto.
3. Evaluar el efecto de las variables: relación masa a volumen de sólidos foliares/solvente, número de cargas con solvente fresco y tiempo de agitación, sobre el rendimiento en la extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius*.

4. Comparar el rendimiento de extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius* bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se presentan los antecedentes y bases teóricas que dan sustento al trabajo realizado y que permiten la comprensión de los datos obtenidos, el establecimiento de las condiciones experimentales y el análisis de los resultados.

2.1. Antecedentes

Konishi y col. (1991) emplearon dos métodos para la extracción de dos fracciones de albúminas a partir de harina desgrasada de granos de *Amaranthus hypochondriacus* y de *Amaranthus cruentus*. En el primer método, emplearon la secuencia de solventes NaCl 0,5 M – agua – NaCl 0,5 M, obteniendo que el contenido total de albúminas (hidrosolubles) y globulinas (no hidrosolubles) en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* fue de 107,9 mg/g y 97,7 mg/g, respectivamente. Para el segundo método emplearon la secuencia agua – NaCl 0,5 M – agua, encontrando un contenido total de proteínas de 113,8 mg/g en *A. hypochondriacus* y 99,7 mg/g en *A. cruentus*.

Barba y col. (1992) probaron varios agentes de extracción para la solubilización de las proteínas de semillas de *A. hypochondriacus* según la clasificación de Osborne (Edwards, 2007). Estos investigadores encontraron que el mejor agente para la extracción de albúminas y globulinas fue Na_2HPO_4 (fosfato de sodio) a pH 7, mientras que para la extracción de glutelinas el mejor agente fue $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (borato de sodio) + 1% (p/v) SDS (dodecil sulfato de sodio) + 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol a pH 10. La mayor y menor fracción proteica identificada fueron albúmina y prolamina, respectivamente.

Martínez y Añón (1996) extrajeron las proteínas presentes en granos de *A. hypochondriacus* a través de: a) extracción a pH variable (pH 8, 9, 10 y 11) y posterior precipitación a pH 5, y b) extracción a pH constante (pH 9) y posterior precipitación a pH variable (pH 3, 4, 5, 6 y 7). Encontraron que de acuerdo al pH de extracción (método a), los aislados obtenidos presentaron una concentración de proteína en el rango de 80-90 g de proteína por 100 g de aislado y que el rendimiento de la extracción, expresado en gramos de aislado por gramos de harina, incrementó de $4,9 \pm 1,1$ a pH 8 a $12,4 \pm 1,1$ a pH 11. Con respecto al segundo método, encontraron que el mayor rendimiento de extracción se obtiene a valores de pH entre 3 y 5, disminuyendo a valores de pH mayores. Para separar los diferentes grupos de proteínas presentes en los extractos se valieron del segundo método propuesto por Konishi y col. (1991) con ciertas modificaciones. En lugar de emplear NaCl 0,5 M emplearon el tampón K_2HPO_4 (fosfato monoácido de potasio) 32,5 mM – KH_2PO_4 (fosfato diácido de potasio) 2,6 mM (a pH 7,5) con NaCl 0,4 M.

Acevedo y col. (2007) estudiaron el valor nutritivo de las diferentes estructuras (hojas, tallos e inflorescencias) de especies de *Amaranthus spp* mas abundantes y frecuentes identificados en el Municipio Morán del Estado Lara en Venezuela. Los investigadores identificaron tres especies de amaranto como las más abundantes: *A. dubius*, *A. spinosus* y *A. gracilis*; y dos de ellas como las más frecuentes: *A. dubius* y *A. spinosus* . En las especies identificadas, determinaron que contenían una alta concentración de proteína cruda (18%), bajo contenido de fibra cruda, además de alto contenido de minerales, principalmente en las hojas.

Olivares y Peña (2009) evaluaron el factor de Bioconcentración (FB) de nutrientes y de metales no esenciales, en la especie *Amaranthus dubius* colectada en tres sitios del Estado Miranda, Venezuela: El Jarillo, la Escuela Técnica Agropecuaria Carrizal y La Maitana. Encontraron que el FB de K fue elevado y que hubo bioconcentración de N, P, K, Mg, Ca y Cd en las hojas de la planta. También,

compararon *A. dubuis* de tallos verdes con los de tallos rojizos y no encontraron diferencias en la composición elemental de ambas plantas. El *A. dubius* resultó ser muy rico en N, P, K, Ca, Mg, Fe y Zn, elementos que interesan en la dieta animal; sin embargo, alertan sobre la necesidad de un control de los elementos no esenciales que pueden presentarse en concentraciones no recomendadas para el consumo, tal como ocurrió con Cd, Al, Cr y Pb en las muestras que analizaron.

Urdaneta y Zambrano (2009) estudiaron tres métodos para la extracción de proteínas a partir de la harina de hoja de *A. dubius*. En el primer y segundo método, el solvente utilizado fue agua destilada empleando una relación harina a solvente de 1:10 (p/v) y de 1:12 (p/v), respectivamente. En el tercer método el solvente empleado fue una solución de NaOH al 0,2 % (p/v) manteniendo una relación harina-solvente de 1:12 (p/v). Encontraron un alto rendimiento en la extracción de proteína total empleando como solvente una solución de NaOH al 0,2 % (p/v), mientras que el uso de agua destilada a las diferentes relaciones harina-solvente dio como resultado un bajo rendimiento.

El presente trabajo está relacionado con los anteriormente mencionados (Martínez y Añón, 1996; Konishi y col., 1991; Barba y col., 1992) en cuanto al estudio de las condiciones y solventes para extraer proteínas de amaranto. Sin embargo, este trabajo se diferencia de los otros, en que se enfoca en el uso de las estructuras foliares del amaranto, específicamente de *A. dubius*, para la obtención de las proteínas totales. Además, el trabajo se apoya en los resultados de Urdaneta y Zambrano (2009), enfatizando en la evaluación del efecto de diferentes variables sobre el rendimiento de la extracción de proteína total.

2.2. Amaranto

El amaranto es un pseudocereal de cultivo anual. Es una planta herbácea de 1 a 1,5 metros de altura, con hojas de pecíolo largo, oblongo-elípticas u ovales, angostadas en ambos extremos y de color que va del verde al rojo o morado (figura 2.1). Las flores son pequeñas de color carmesí, naranja, púrpura, amarillo o verde, dependiendo de la especie, y se presentan en espigas muy apretadas o panículas, que van de totalmente erectas hasta decumbentes (caídos). Las flores son escariosas, es decir sin corola y presentan 5 estambres. Las semillas son lenticulares o globosas, con bastante endospermo, cuyo color va del negro al blanco (Galindo, 2001).



Figura 2.1. Ejemplos de diferentes especies del género *Amaranthus*. De izquierda a derecha se observa: *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. dubius* (Hirt's Gardens, s/f; Wikipedia, s/f a; Seeds of Change, s/f).

El amaranto pertenece a la familia Amaranthaceae; un género de hierbas ampliamente distribuido en las regiones templadas y tropicales. Aunque persiste algo de confusión sobre su exacta taxonomía, existen alrededor de 60 especies, muchas de las cuales se cultivan como verduras, cereales o plantas ornamentales (Wikipedia, sin fecha b).

La palabra amaranto significa inmarcesible, que no se marchita; y viene del griego *Amarantón*, de *a* (sin) y *marainein* (marchitar, palidecer). Los indígenas de Suramérica lo llamaban *huautli* o *huauquilitl*, y los europeos lo denominaron bledo (Hernández y Herrerías, 1998).

Los nombres más usados para el amaranto en los países de la zona andina son (Tejera, Arenas, 2001):

- Coime, ataco, aroma, coimi, cuimi o millmi, en Bolivia.
- Amaranto, bledo blanco o abanico, en Colombia.
- Amaranto, ataco, quinua negra o sangoroche, en Ecuador.
- Kiwicha, en Argentina.
- Hierba Caracas, pira o amaranto, en Venezuela.

En Venezuela, una de las especies de amaranto más abundante es el *Amaranthus dubius* (bledo o pira) el cual puede medir hasta un metro de altura. Sus hojas son ligeramente pecioladas y sus flores son verdes o blancuzcas, agrupadas en espigas terminales de 10 a 25 cm. Otras especies de amaranto presentes en Venezuela son: *Amaranthus viridis* o pira blanca y *Amaranthus spinosus* o pira brava. Aún cuando existen otras plantas en Venezuela que reciben el nombre de pira, tales como pira de puerco o pira de guacharaca, éstas no pertenecen a la familia Amaranthacea. Dichas plantas reciben el nombre científico de *Rumex crispus* y *Trichostigma octandrum*, respectivamente (Schnee, 1973).

2.2.1. Historia del amaranto

El grano de amaranto fue uno de los alimentos básicos de las culturas precolombinas del Nuevo Mundo, casi tan importante como el maíz y el frijol. Se

empleaban miles de hectáreas de tierra para su cultivo, tanto para fines alimenticios como religiosos (Ruskin, 1984). Según los indicios existentes, cada año las 17 provincias sojuzgadas por el Emperador Moctezuma, enviaban a éste, como tributo a la Gran Tenochtitlán, más de 20.000 toneladas de grano de amaranto, de lo que se puede entender que este grano llegó a representar un verdadero elemento de comercio, con gran valor de cambio (San Miguel, 2006).

El amaranto, al ser considerado como un símbolo de la inmortalidad, era empleado en diferentes rituales en honor a los difuntos y los dioses. Las mujeres preparaban una pasta de amaranto amasado con miel y sangre humana que llamaban *tzoalli*, y con ella elaboraban sofisticadas imágenes, a pequeña y gran escala, de sus principales dioses, las cuales eran consumidas por el pueblo como culminación del ritual sagrado, en una comunión religiosa llamada *teocualo* que significa “comer a los dioses” (Hernández y Herrerías, 1998).

Al parecer, el uso del amaranto en rituales religiosos y sacrificios humanos provocó su censura por parte de los conquistadores españoles, quienes estaban en contra de tales rituales, causando así que el cultivo del amaranto fuera abandonado durante el periodo de la conquista (Tejera, Arenas, 2001). Existen autores que señalan que con la finalidad de erradicar estas prácticas, consideradas el equivalente pagano del sacramento de la comunión cristiana, los conquistadores prohibieron la siembra del amaranto, imponiendo fuertes castigos a quien lo cultivara y a quien simplemente lo poseyera, razón por la que casi desapareció de Mesoamérica, conservándose solamente en unas cuantas regiones. Otros estudiosos señalan que nadie ha mostrado el decreto de erradicación del amaranto como tal, pero que al haberse prohibido los rituales religiosos en los que se utilizaba, lo mismo se consideró extensivo al cultivo (Hernández y Herrerías, 1998).

En la actualidad, el amaranto se consume en países como México y Perú, tradicionalmente en forma de dulces denominados “alegría” y otras preparaciones. Su cultivo ha sido retomado e intensificado gracias a los descubrimientos que se han hecho sobre sus propiedades altamente nutritivas para el humano. Aparte de producirse en países en donde su cultivo es tradicional, como México, Perú o Bolivia, también ha comenzado a cultivarse en otros países como China, Estados Unidos o la India (San Miguel, 2006).

2.2.2. Valor alimenticio

El valor alimenticio del grano de amaranto fue reconocido por las personas desde México hasta Perú y Nepal, mucho tiempo antes de que se hubiese llevado a cabo cualquier análisis nutricional. Debido a que es fácil de digerir, el amaranto era tradicionalmente dado a aquellos que se estaban recuperando de una enfermedad o de un periodo de ayuno (Kauffman, Weber, 1990).

El amaranto tiene un alto nivel de proteínas; el contenido de proteínas del maíz, trigo y arroz mejorados genéticamente oscila entre 10 y 13%; el de amaranto sin mejoramiento *ex profeso* varía de 15 a 18 % y la calidad es mejor, comparada en varios parámetros a la de la proteína de la leche, la caseína, que se considera nutricionalmente la proteína por excelencia. Las principales fracciones proteicas presentes en el amaranto son albúminas, globulinas y glutelinas. Las dos últimas constituyen las principales proteínas de reserva del grano, las cuales se encuentran localizadas en el embrión y en el endospermo de la semilla. Respecto a la fracción de globulinas, se sabe que participan de la misma las globulinas de reserva clásicas de muchos granos, tipo 7S (minoritaria desde el punto de vista cuantitativo) y 11S y las globulinas-P, características del amaranto (Avanza, Añón, s/f).

En las últimas décadas, se han realizado diferentes estudios referidos al valor nutricional del amaranto, en los cuales el aspecto nutricional más estudiado es la identificación de aminoácidos limitantes presentes en las proteínas del amaranto (Kauffman, Weber, 1990). Las proteínas presentes en el amaranto tienen un buen equilibrio a nivel de aminoácidos, incluyendo la lisina, esencial en la alimentación humana y que no suele encontrarse, o hay en poca cantidad, en la mayoría de los cereales (López, 2008). El contenido de lisina de las especies de amaranto es relativamente alto (3,2 – 6,4 %), comparado con la mayoría de los cereales (2,2 – 4,5 %); y las concentraciones de aminoácidos azufrados (2,6-5,5 %), como el triptófano, son más elevadas que en la mayoría de las leguminosas. Presenta ligeras limitaciones en valina, isoleucina y treonina, siendo más deficiente en leucina. Aún con estas limitaciones, las proteínas de amaranto cumplen satisfactoriamente con los requerimientos de aminoácidos indispensables para una óptima nutrición humana, recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO, por sus siglas en inglés) (Soriano, 2006).

Según la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre un valor proteico ideal de 100, el amaranto posee 75, la leche vacuna 72, la soya 68, el trigo 60 y el maíz 44. Además, la digestibilidad de su grano es muy alta, alcanzando valores de entre 80 y 92% (Hernández y Herrerías, 1998). Las reducidas dimensiones de estos granos facilitan su digestión, que resulta de 2 a 5 veces más rápida que la del maíz. Cuando se realizan mezclas de harina de amaranto con harina de maíz, la combinación resulta excelente, llegando a índices cercanos de 100, porque el aminoácido que es deficiente en uno, abunda en el otro. Otro aspecto resaltante en cuanto al valor nutritivo del amaranto, es que su grano no posee gluten, lo que lo hace apto para celíacos (personas con enfermedad inmunológica causada por la intolerancia al gluten) (López, 2008).

Del amaranto no sólo se consumen las semillas, también las hojas, puesto que son comestibles. Usualmente se consumen como ensalada o hervidas, formando parte de sopas y otras preparaciones; se comparan en textura y sabor con las espinacas. Al igual que el grano, éstas son altamente nutritivas en cuanto al contenido de minerales, proteínas y fibra. En la tabla 2.1, se muestra el contenido de proteína cruda en diferentes especies de amaranto identificadas en tres parroquias del Municipio Morán del estado Lara. En la tabla 2.2, se compara el valor alimenticio del amaranto con el de la espinaca.

Tabla 2.1. Valores promedios del contenido de Proteína Cruda (%) en las diferentes estructuras de diferentes especies de amaranto (Acevedo y col., 2007).

Estructuras de la planta	Parroquias								
	Humocaro Alto			Humocaro Bajo			Anzoátegui		
	<i>Amaranthus spinosus</i>	<i>Amaranthus dubius Mart</i>	<i>Amaranthus gracilis</i>	<i>Amaranthus spinosus</i>	<i>Amaranthus dubius Mart</i>	<i>Amaranthus gracilis</i>	<i>Amaranthus spinosus</i>	<i>Amaranthus dubius Mart</i>	<i>Amaranthus gracilis</i>
Hoja	26,04	28,51	32,79	27,14	23,00	24,26	25,18	24,82	26,73
Tallo	15,25	19,54	9,89	15,22	16,29	16,38	17,84	19,17	17,77
Inflores.*	26,74	23,40	24,59	22,59	26,43	23,06	21,59	27,47	19,99

* Inflores.: inflorescencia

Tabla 2.2. Valor alimenticio del amaranto en hoja. Tabla comparativa del amaranto con espinaca en base a 100 g de hoja fresca (Hernández y Herrerías, 1998).

	Amaranto	Espinaca
Humedad (g)	86,9	90,7
Proteína (g)	3,5	3,2
Calcio (g)	0,262	0,093
Fósforo (g)	0,067	0,0519
Hierro (g)	0,0039	0,0031
Vitamina A (U.I.)	6 100	8 100
Acido ascórbico (g)	0,080	0,051

Además de su importante contenido de proteína, el grano de amaranto contiene entre un 6 y un 10% de grasa, la cual se encuentra principalmente en el embrión. Las grasas presentes son principalmente insaturadas y son ricas en ácido linoleico, el cual es uno de los ácidos grasos esenciales para la nutrición del ser humano. En estudios realizados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Unites States Department of Agriculture, USDA, por sus siglas en ingles), se encontró que el 7% de la grasa presente en el amaranto corresponde a escualeno, lo que representa una cantidad mayor a la encontrada en otras grasas de origen vegetal. El escualeno es un compuesto orgánico natural, de alto valor comercial, obtenido originalmente para uso en cosméticos o como adyuvante en vacunas a partir del aceite de hígado de tiburón (Ruskin, 1984).

Debido a que el grano de amaranto tiene un alto contenido de proteína, así como de grasas insaturadas, éste presenta un potencial para su uso en alimentos energéticos. En estudios de alimentación humana se encontró que la digestión y absorción es elevada al emplear productos a base de amaranto, tanto molidos como tostados. El balance de carbohidratos, grasas y proteínas en el amaranto permite una absorción

adecuada de nutrientes con el consumo de cantidades menores, en comparación con otros cereales (Ruskin, 1984).

2.2.3. Valor agroclimático

El cultivo de amaranto se adapta a diferentes altitudes, climas y tipos de tierra, desde el caluroso nivel del mar, hasta las montañas templadas o semifrías. Se produce en regiones semiáridas, con lluvia desde 400 milímetros anuales, hasta zonas tropicales con 1.300 milímetros de precipitación anual (Hernández y Herrerías, 1998).

El amaranto se siembra desde el nivel del mar hasta cerca de 3.000 metros de altitud, aunque es muy sensible a fríos excesivos, por lo que proporciona un mayor rendimiento creciendo en temperaturas elevadas. El amaranto también es resistente a las sequías, por lo que, con prácticas adecuadas de cultivo, se puede cosechar en tierras de poca disponibilidad de agua (Hernández y Herrerías, 1998).

2.3. Proteínas

Las proteínas son un tipo de moléculas orgánicas que cumplen una gran variedad de funciones en los organismos y, desde el punto de vista estructural, se definen como cadenas polipeptídicas constituidas por muchos aminoácidos (o residuos), unidos entre sí por enlaces peptídicos (Hicks, 2001). Una cadena polipeptídica promedio de una proteína contiene alrededor de 500 aminoácidos, y algunas tienen más de 2.000. Los pesos moleculares de las cadenas sencillas de polipéptido oscilan entre los 5.000 y 300.000 Da. Para determinar el número aproximado de aminoácidos en una proteína se divide su peso molecular entre 110 (o

100, si no se requiere mucha exactitud). Este valor (110 Da) es la masa molecular promedio de un aminoácido en una proteína promedio (Roskoski, 1998).

En el caso de macromoléculas de gran tamaño como las proteínas, la descripción y comprensión de su estructura se lleva a cabo a diferentes niveles de complejidad. La estructura de las moléculas proteicas ha sido dividida en cuatro niveles estructurales: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, figura 2.2 (Hicks,2001).

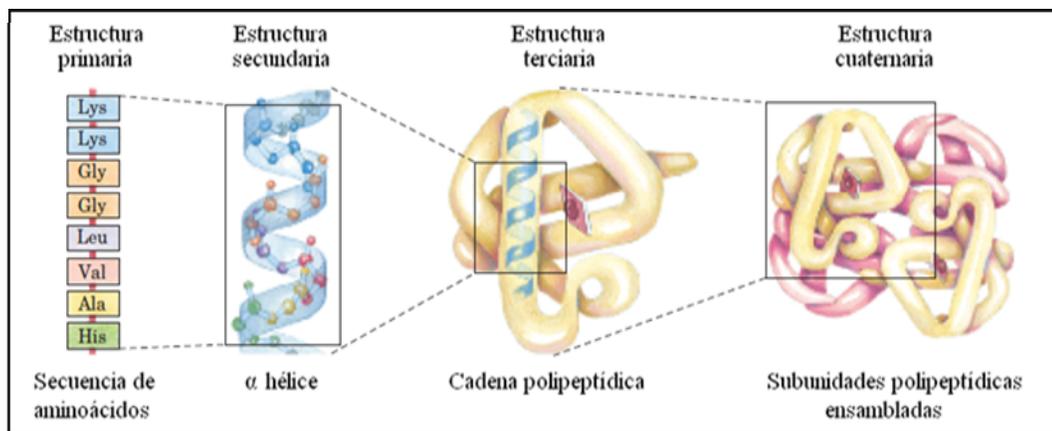


Figura 2.2. Estructura de las proteínas (Nelson y Cox, 2000)

La estructura primaria corresponde a la descripción de todos los enlaces covalentes, principalmente enlaces peptídicos y disulfuro, que unen a los aminoácidos para formar la estructura lineal de la proteína, es decir, se refiere a la secuencia de los aminoácidos en la estructura de la molécula proteica. La estructura secundaria se refiere a los arreglos de los aminoácidos que dan lugar a arreglos espaciales característicos de las moléculas proteicas. La estructura secundaria está dada por la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico dando lugar a dos tipos principales de estructuras, la alfa hélice y la lámina beta plegada. Algunos autores reconocen un tipo adicional de estructura, llamada

supersecundaria o motivo, que se refiere a secuencias de estructuras secundarias que son frecuentes en ciertos tipos de proteínas. La estructura terciaria describe el modo en el que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio; se refiere a la forma que adopta la molécula en el espacio tridimensional, esencialmente globulinas o filamentosas. Cuando una proteína está conformada por dos o más cadenas polipeptídicas, su arreglo en el espacio se denomina estructura cuaternaria (Nelson y Cox, 2000).

2.3.1. Rol de las proteínas en la nutrición

Las proteínas son un nutriente esencial, ya que a partir de ellas el organismo obtiene las moléculas necesarias para sintetizar nuevas proteínas y otras moléculas que son requeridas para el normal y correcto funcionamiento del mismo (Rinzler, 2006).

Cerca de la mitad de las proteínas que se consumen a diario a través de los alimentos se destinan a la producción de enzimas, las cuales catalizan las reacciones metabólicas a través de las cuales se rompen moléculas complejas para posteriormente sintetizar otras de interés para el organismo. Las proteínas consumidas también son empleadas para la síntesis de neurotransmisores y para la síntesis de nuevas proteínas a partir de los aminoácidos que las forman, las cuales pasan a formar parte de los tejidos y otras estructuras del cuerpo, tales como los músculos, los huesos, los glóbulos rojos (la hemoglobina), entre otros (Rinzler, 2006).

Como regla general, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que las personas saludables necesitan obtener entre 10 y 15% de sus calorías diarias de las proteínas y la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos indica que se necesitan entre el 10 y el 35%. Un hombre adulto o una mujer adulta saludables,

requieren aproximadamente 0,8 gramos diarios de proteína de alta calidad (proteínas de origen animal, las cuales son ricas en aminoácidos esenciales para el hombre) por cada kilogramo de peso corporal para poder satisfacer sus requerimientos (Rinzler, 2006).

2.3.2. Extracción y purificación de proteínas

Para llevar a cabo un estudio detallado de la estructura y función de una determinada proteína o de un conjunto de ellas, el investigador debe ser capaz de separarla o separarlas de otras proteínas y debe contar con técnicas que le permitan determinar sus propiedades. El primer paso en cualquier procedimiento para la purificación de una proteína es liberarla de la estructura que la contiene (células animales o vegetales, microorganismos, etc.), lo cual se realiza rompiendo tales estructuras, de forma tal que las proteínas queden en una solución denominada extracto crudo (Nelson y Cox, 2000).

Son muchos los procedimientos que pueden emplearse para obtener el extracto crudo, y uno de ellos es la extracción sólido-líquido o lixiviación. Este método se emplea cuando no es posible aplicar procesos de destrucción mecánica o de congelación-descongelación que podrían causar daños a las proteínas. La lixiviación permite separar la fracción soluble (proteínas), en forma de solución o suspensión, a partir de la fase sólida permeable e insoluble que la contiene (estructuras celulares). Por lo general, los solventes son selectivos con respecto al soluto (proteína) que se desea separar para aumentar la eficiencia del proceso (Perry y col., 2001).

Una vez que se obtiene el extracto, se dispone de diferentes métodos para purificar una o más proteínas contenidas en el mismo. Generalmente, el extracto es

sometido a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones, basándose en propiedades como el tamaño de las moléculas y la carga eléctrica; dicho proceso se denomina fraccionamiento. Una de las formas más antigua, simple y bastante eficaz para llevar a cabo la separación de una mezcla de proteínas se basa en la diferencia de la solubilidad de éstas, la cual es una función compleja del pH, temperatura, concentración de sales y otros factores. La solubilidad de las proteínas generalmente es baja en medios con una elevada concentración de sales, por lo que tienden a precipitar en esos medios. A este efecto se le denomina *salting out*. La adición de una sal en la cantidad adecuada puede inducir la precipitación selectiva de algunas proteínas, mientras que otras permanecen en solución. Usualmente, se emplea el sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) para tal propósito, debido a su elevada solubilidad en agua y a que pueden conseguirse fuerzas iónicas bastante elevadas sin dañar las proteínas (Nelson y Cox, 2000).

Muchas veces, una solución que contenga la proteína de interés debe recibir un tratamiento antes de que se pueda continuar con el proceso de purificación. Por ejemplo, la diálisis es un procedimiento que separa las proteínas de un solvente en función del tamaño molecular de las proteínas. El extracto parcialmente purificado se coloca en un empaque o tubo elaborado con una membrana semipermeable. Cuando la solución contenida en el empaque o tubo se suspende en un gran volumen de solución tampón con la fuerza iónica apropiada, la membrana permite el intercambio entre la sal y la solución tampón pero no de las proteínas. Así, por medio de la diálisis, se retienen las proteínas dentro del empaque o tubo de membrana, siempre y cuando sean de mayor tamaño que los poros de la membrana, los cuales varían de acuerdo a las necesidades de separación, al mismo tiempo que permite que la concentración de otros solutos en la solución, que contiene las proteínas, varíe hasta alcanzar un equilibrio con la solución que se encuentra por fuera de la membrana de diálisis. La diálisis pudiera ser usada, por ejemplo, para remover el sulfato de amonio agregado a una solución con contenido de proteínas (Nelson y Cox, 2000).

Los métodos más eficientes para el fraccionamiento de proteínas hacen uso de columnas de cromatografía, las cuales se valen de las diferencias en la carga, tamaño o afinidad de enlace de las proteínas, además de otras propiedades. Algunos de estos métodos son la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión, cromatografía de afinidad y cromatografía líquida de alta resolución o High Performance Liquid Chromatography (HPLC por sus siglas en inglés). Esta última hace uso de bombas de alta presión que aceleran el paso de las moléculas de proteínas a través de la columna, así como de materiales cromatográficos de alta calidad, capaces de soportar la presión ejercida por las bombas. Al reducir el tiempo que tardan en pasar las moléculas de proteínas a través de la columna, se limita la difusión de las bandas de las diferentes proteínas separadas, mejorando así la resolución (Nelson y Cox, 2000).

La cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en el signo y magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas, a un valor de pH determinado. La fase estacionaria está formada por un polímero sintético que presenta grupos cargados unidos a su estructura; aquellas que poseen grupos aniónicos son llamadas intercambiadores catiónicos, y aquellas que poseen grupos catiónicos son llamadas intercambiadores aniónicos (Nelson y Cox, 2000).

En la figura 2.3 se representa una cromatografía con intercambiadores catiónicos. La afinidad de cada proteína por los grupos cargados presentes en la fase estacionaria de la columna cromatográfica se ve afectada por el pH, el cual determina el estado de ionización de la molécula proteica, y por la concentración de iones de sales presentes en el medio circundante. La separación se puede optimizar cambiando de forma gradual el pH y/o la concentración de sales de la fase móvil de forma tal que se cree un gradiente, bien sea de pH o de concentración (Nelson y Cox, 2000).

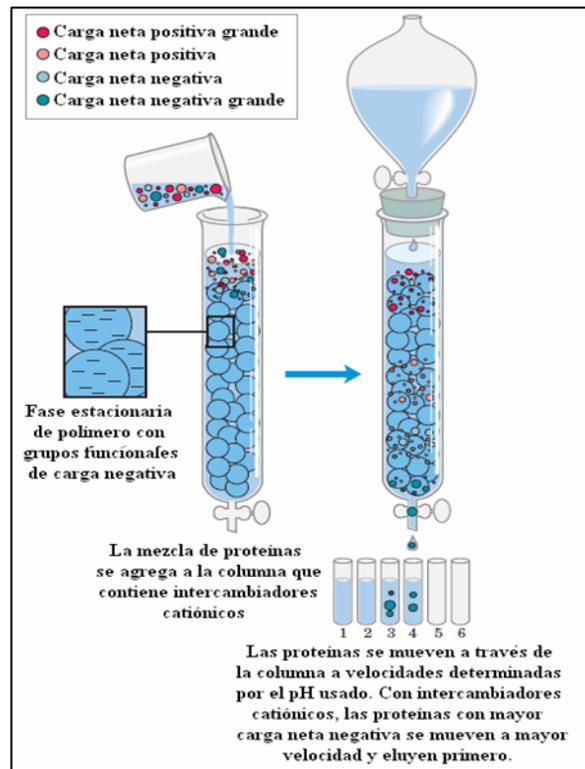


Figura 2.3. Cromatografía de intercambio catiónico para purificación de proteínas (Nelson y Cox, 2000).

La cromatografía de exclusión por tamaño molecular (figura 2.4), también llamada filtración con gel, separa las proteínas de acuerdo a su tamaño. La fase estacionaria es una matriz de polímero entrecruzado con poros de un tamaño determinado, dependiendo de la mezcla de proteínas que se esté estudiando. Las proteínas de mayor tamaño migran a mayor velocidad que las de menor tamaño debido a que son muy grandes para entrar por los poros de la fase estacionaria y por lo tanto, toman un camino más directo a través de la columna. Las proteínas pequeñas pasan a través de los poros de la fase estacionaria, por lo que el camino que siguen es mucho más complejo que el seguido por las proteínas de mayor tamaño, haciendo que la velocidad de migración de éstas sea baja (Nelson y Cox, 2000).

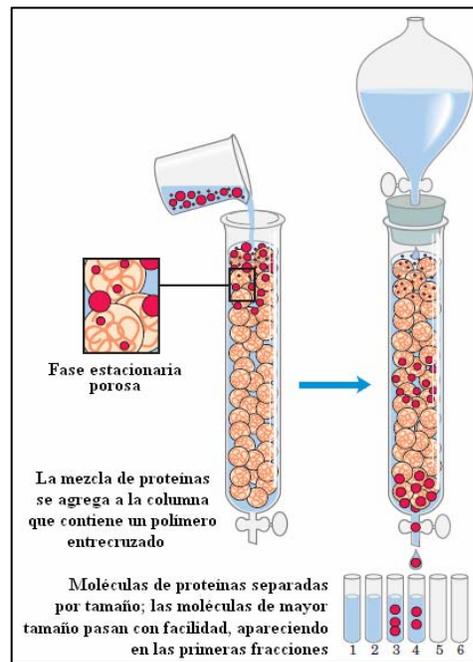


Figura 2.4. Cromatografía de exclusión para purificación de proteínas (Nelson y Cox, 2000).

La cromatografía de afinidad utiliza las propiedades biológicas singulares de cada proteína, es decir, utiliza una afinidad de unión no covalente especial entre la proteína y una molécula especial denominada ligando (en bioquímica, el término ligando es usado para referirse a un grupo de moléculas que se unen a macromoléculas como lo son las proteínas). El ligando se encuentra unido de forma covalente a una matriz insoluble (fase estacionaria), que se coloca en la columna cromatográfica. A medida que la mezcla de proteínas pasa a lo largo de la columna, las proteínas de interés quedan unidas al ligando mientras que las otras eluyen sin dificultad. Después de que las proteínas que no se unieron al ligando han eluido por completo de la columna, se provoca la elución de las proteínas de interés (unidas al ligando) agregando una solución que contiene ligandos en forma libre. En la figura 2.5 se muestra un esquema de este tipo de cromatografía (Nelson y Cox, 2000).

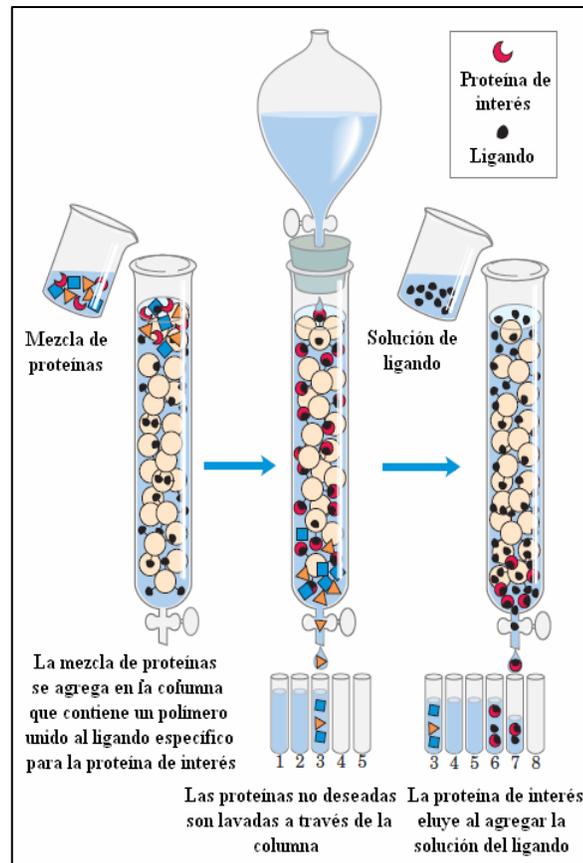


Figura 2.5. Cromatografía de afinidad para purificación de proteínas (Nelson y Cox, 2000).

2.4. Caracterización y cuantificación de proteínas

2.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis consiste en mover partículas cargadas (iones) dentro de un campo eléctrico. El desplazamiento ocurre en un medio líquido sostenido por una sustancia sólida inerte, por ejemplo, un papel o un gel. El líquido, una solución salina

amortiguadora con pH y fuerza iónica conocidos, sirve como medio conductor de electricidad en el momento en que se aplica un voltaje externo (Bohinski, 1991).

La electroforesis es un método analítico de gran utilidad debido a que permite la visualización de las proteínas al mismo tiempo que las separa, por lo que el investigador puede estimar de forma rápida el número de proteínas diferentes que se encuentran en una mezcla o el grado de pureza de una preparación proteica en particular. Además, la electroforesis permite determinar propiedades como el punto isoeléctrico o el peso molecular de una proteína (Nelson y Cox, 2000).

Cuando se aplica la corriente eléctrica, las proteínas migran hacia abajo a través de la matriz que sirve de soporte a la electroforesis, creando carriles en los cuales se formarán bandas separadas que corresponden a las diferentes proteínas que se encuentran presentes en la mezcla estudiada (Thermo Scientific, 2008). En la figura 2.6 se muestra un esquema del proceso de electroforesis, indicando la disposición de las muestras y la dirección de migración de las proteínas presentes por efecto de la carga aplicada.

La electroforesis de proteínas generalmente se lleva a cabo sobre un gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), el cual actúa como un tamiz molecular en el que las proteínas migran, bien sea en forma proporcional a su carga eléctrica o a su peso molecular. La migración de la proteína a través del gel también puede verse afectada por la forma de la misma (Nelson y Cox, 2000).

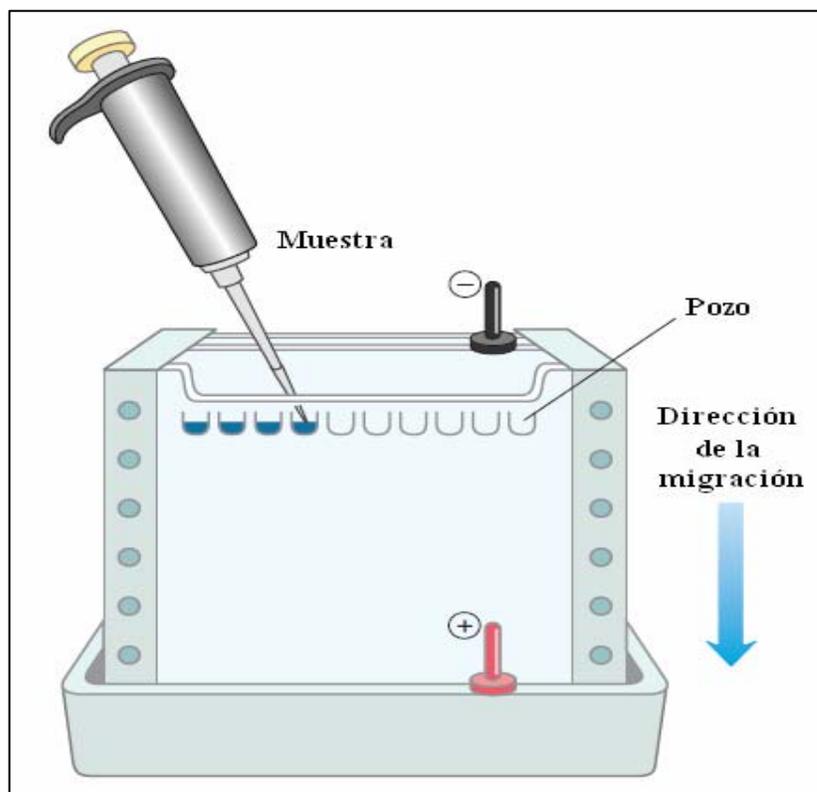


Figura 2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (Nelson y Cox, 2000).

La acrilamida mezclada con bisacrilamida forma una matriz de polímero entrecruzado cuando se agrega el agente polimerizante persulfato de amonio (figura 2.7). El persulfato de amonio produce radicales libres con mayor rapidez en presencia de TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina), que actúa como catalizador del proceso de polimerización. El tamaño de los poros creados en el gel, es inversamente proporcional a la cantidad de acrilamida empleada; así, un gel con 7% de acrilamida tendrá poros de mayor tamaño que uno con 12% de acrilamida. Por lo general, los geles con poros de mayor tamaño son empleados para el estudio de moléculas grandes de proteínas, mientras que los de poros de menor tamaño son empleados en el estudio de proteínas pequeñas (Thermo Scientific, 2008).

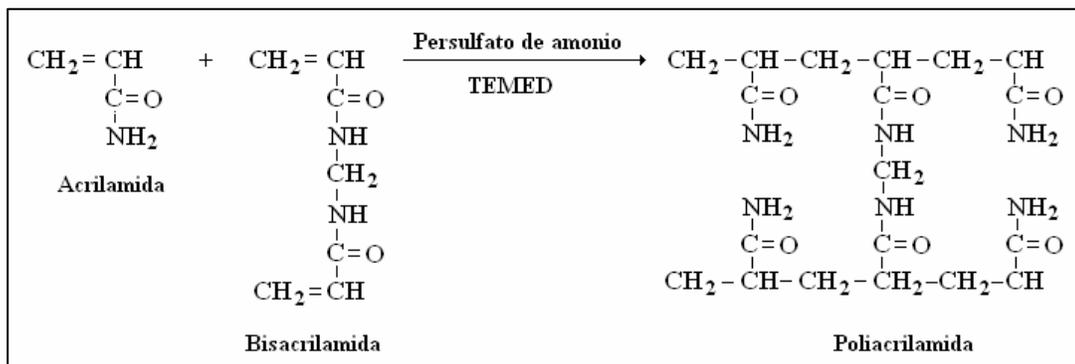


Figura 2.7. Polimerización y entrecruzamiento de la acrilamida (Thermo Scientific, 2008).

En la electroforesis, la fuerza que impulsa al movimiento de las macromoléculas es el potencial eléctrico, E . La movilidad electroforética de una molécula, μ , se determina por la relación de la velocidad de la molécula, V , y el potencial eléctrico. La movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula, Z , dividida entre el coeficiente de fricción, f , el cual refleja, en parte, la forma de la proteína. Lo antes expuesto se expresa según la siguiente ecuación (Nelson y Cox, 2000):

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Un método electroforético comúnmente empleado para la estimación de la pureza y peso molecular de proteínas, emplea el surfactante SDS (dodecil sulfato de sodio). El SDS (figura 2.8) se une a la mayoría de las proteínas en una cantidad proporcional al peso molecular de éstas, alrededor de una molécula de SDS por cada dos residuos aminoácidos. La unión con el SDS aporta una gran carga neta negativa

provocando que la carga intrínseca de las proteínas sea insignificante y confiriendo a cada proteína una relación de carga a masa similar. Adicionalmente, la conformación nativa de las proteínas es alterada cuando se unen al SDS, es decir, se alteran las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria (de existir éstas), por lo que la mayoría de las proteínas adoptan una forma similar. En consecuencia, la electroforesis en presencia de SDS separa las proteínas casi exclusivamente con base en su peso molecular, siendo los péptidos de menor tamaño los que migran con mayor rapidez a lo largo del gel (Nelson y Cox, 2000).

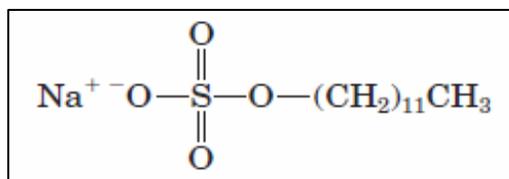


Figura 2.8. Estructura de la molécula de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sodium Dodecyl Sulphate, en inglés) (Nelson y Cox, 2000).

La electroforesis de una proteína en su estado nativo, es decir, sin agregar SDS, se basa en la carga intrínseca de la proteína y en su masa. Para que una proteína migre en el gel hacia el ánodo, ésta debe poseer una carga neta negativa al pH del sistema gel/solución tampón. Por tal razón, la electroforesis en gel de poliacrilamida, a condiciones nativas, comúnmente se realiza a un pH ligeramente básico, en el que las proteínas con un punto isoeléctrico (pI) neutro o ácido presentarán la carga neta negativa requerida para la electroforesis. De forma alternativa, el proceso puede realizarse a la inversa, empleando un pH ácido, para que la mayoría de las proteínas adquiera una carga neta positiva. Este método requiere que se reviertan el ánodo y el cátodo, puesto que las proteínas con carga positiva migrarán hacia el cátodo. La

movilidad electroforética en este tipo de electroforesis también se verá afectada por el tamaño y la forma de las proteínas estudiadas (Thermo Scientific, 2008).

Para mantener la integridad de las proteínas durante la electroforesis, es importante mantener a una baja temperatura el equipo en donde ésta se realiza y así minimizar los efectos de la desnaturalización y la proteólisis. También deben evitarse los valores extremos de pH en la electroforesis en condiciones nativas, puesto que éstos pueden provocar cambios irreversibles, como desnaturalización y agregación, en las proteínas de interés (Thermo Scientific, 2008).

Luego de la electroforesis, se visualizan las proteínas añadiendo un colorante, tal como el azul brillante de Coomassie, el cual se une a las proteínas pero no al gel, de forma tal, que pueden observarse las diferentes bandas que representan a las proteínas o subunidades proteicas presentes en la muestra estudiada. Otra técnica ampliamente empleada, es la tinción con plata. Cuando dichas bandas se comparan con la posición que alcanzan proteínas con peso molecular conocido, empleadas como referencia al migrar en el gel, la posición de una proteína no identificada puede proveer una excelente medida de su peso molecular, lo cual conlleva a su identificación (figura 2.9 A) [30]. El peso molecular de una proteína desconocida también puede determinarse en función de su movilidad electroforética, tomando como patrón las movilidades conocidas de otras proteínas (figura 2.9 B) (Bohinski, 1991).

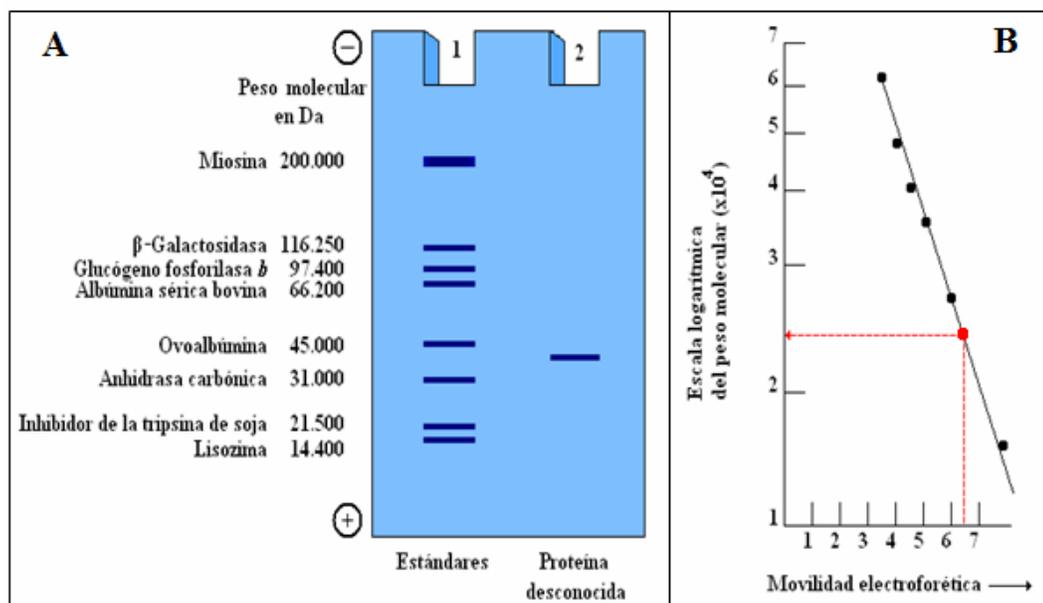


Figura 2.9. Identificación de una muestra de proteína desconocida. (A) Determinación del peso molecular de una muestra de proteína desconocida empleando como patrón proteínas de peso molecular conocido (McKee y McKee, 2003). (B) Estimación del peso molecular en función de la movilidad electroforética. La línea trazada a través de los puntos negros corresponde a las movilidades de proteínas de peso molecular conocido. Al graficar la movilidad de una proteína de peso molecular desconocido (punto de color rojo) se obtiene un peso molecular de 25 000 Da (Bohinski, 1991).

2.4.2. Método del ácido bicinonínico (BCA)

Es el método más empleado para la detección y cuantificación de proteínas puesto que tiene la ventaja sobre otros métodos, como el método de Bradford, de que es compatible con muestras que presentan hasta 5% de surfactantes (detergentes). El método de Bradford es muy sensible a tales sustancias (Bradford, 1976; Gallardo, 2006; Pierce Biotechnology, 2004).

Este método se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos (Cu^{+2}) a iones cuprosos (Cu^{+}) bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico (BCA, en inglés), de color verdoso, para formar un color morado el cual es proporcional al contenido proteico de la muestra en estudio (figura 2.10). La primera etapa de la reacción es la quelación del cobre con la proteína, en un medio alcalino, para formar un complejo de color azul. En esta reacción, conocida como la reacción de Biuret, los péptidos que contienen tres o más aminoácidos forman un complejo quelado coloreado con iones cúpricos en un medio alcalino que contenga tartrato de potasio o de sodio, o tartrato mixto de potasio y sodio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). La reacción recibe el nombre de reacción de Biuret debido a que se forma un complejo similar al formado entre el compuesto de Biuret ($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$) y el ión cúprico (Pierce Biotechnology, 2004).

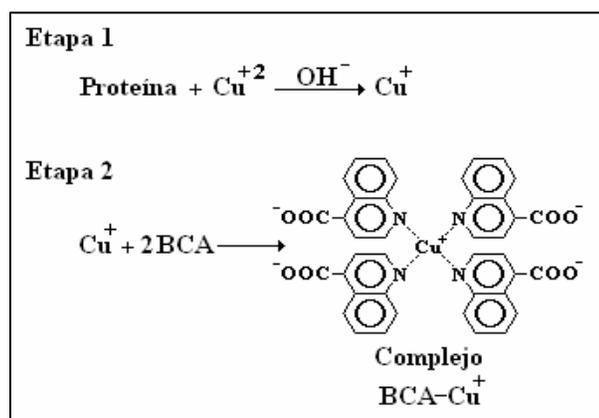


Figura 2.10. Esquema de la reacción para la cuantificación de proteínas empleando ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology, 2004).

En la segunda etapa de la reacción, el BCA, un reactivo altamente sensitivo y selectivo para la detección colorimétrica, reacciona con los cationes cuprosos (Cu^{+})

que se formaron en la primera etapa. El producto de la reacción es un compuesto de color morado, producto de la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso (figura 2.10). El complejo BCA-cobre es soluble en agua y exhibe una fuerte correlación lineal entre la absorbancia medida a 562 nm y la concentración de las proteínas. La coloración morada puede medirse en cualquier intervalo de longitud de onda entre 550 y 570 nm con desviación mínima en la medición (menos del 10%). La reacción entre el BCA y el producto de la reducción de los iones cúpricos está fuertemente influenciada por la presencia de los aminoácidos cisteína o cistina (dímero de la cisteína), tirosina y triptófano, en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, lo que puede derivar en interferencias en la determinación de la concentración de proteínas empleando BCA (Pierce Biotechnology, 2004).

A diferencia de métodos colorimétricos basados en la combinación del azul de Coomassie con las proteínas, que requieren la presencia de una cantidad mínima de proteína para que se una al colorante, la presencia de un solo aminoácido en la muestra resultará en la formación del quelato coloreado BCA-Cu^+ . Esto es cierto para cualquiera de los aminoácidos mencionados anteriormente. Estudios realizados con dipéptidos y tripéptidos indican que la cantidad total de color producida es mayor que la producida por un solo aminoácido. Por lo tanto, la estructura de los péptidos también debe contribuir a la reducción de los iones de cobre (Pierce Biotechnology, 2004).

La rapidez a la cual se produce la coloración empleando BCA depende de la temperatura de incubación, los tipos de proteína presentes en la muestra y la cantidad relativa de aminoácidos reactivos que presenten las proteínas. En los protocolos empleados, los períodos de incubación se escogen de forma tal que se obtenga el mayor rendimiento en la respuesta de coloración en un rango de tiempo razonable (los períodos de incubación van de 30 a 60 minutos) (Pierce Biotechnology, 2004).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo se explica la metodología empleada para desarrollar los objetivos planteados en el presente trabajo.

3.1. Identificación de los grupos de proteínas presentes en la harina de las hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*)

Previo a la identificación de los grupos de proteínas presentes en las hojas de amaranto, éstas fueron sometidas a un proceso de extracción bajo diferentes condiciones de relación masa de harina de hojas de amaranto/volumen de solvente (1:10, 1:12 y 1:15), número de cargas con solvente fresco (1, 2 y 3) y tiempo de agitación (1, 2 y 3 horas). El solvente extrayente empleado para tal fin fue una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0,2% m/v, tomando como base el trabajo realizado por Urdaneta y Zambrano (2009).

Las extracciones fueron realizadas a partir de harina de hojas secas de amaranto, cuya preparación y conservación se explican en el anexo A. Para cada ensayo realizado, se pesó aproximadamente un gramo de la misma (entre 1,0000 y 1,0003 g), en vasos de precipitado de 50 ml a los cuales se les agregó, posteriormente, el volumen de solvente correspondiente a las diferentes condiciones de extracción evaluadas. Para cada carga sucesiva con solvente fresco se agregó la misma cantidad de volumen que la agregada para la primera carga, dependiendo de la relación masa/volumen analizada (10, 12 o 15 ml). Todas las extracciones se realizaron por duplicado. En la tabla 3.1 se recogen las condiciones respecto a masa de harina y volumen de solvente empleados.

Las extracciones se realizaron en planchas de agitación magnética Cimarec modelo SP131325, a velocidad constante de 350 rpm, para todas las condiciones evaluadas. Para

minimizar posibles daños a las proteínas durante el proceso de extracción, éste se realizó a una temperatura de 6 a 8 °C, colocando los vasos de precipitado dentro de recipientes con hielo. Los extractos obtenidos fueron separados del material sólido mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 15 min, a 4 °C, en una centrífuga refrigerada de alta velocidad marca Beckman, modelo J2-21M. Dichos extractos fueron almacenados en tubos tipo Falcon de 15 ml de capacidad, a 4 °C. En el anexo B se muestran fotografías de estos procedimientos.

En la figura 3.1 se muestra el esquema seguido para llevar a cabo las extracciones a las diferentes condiciones empleadas y en la tabla 3.2 se presenta la identificación de las muestras obtenidas para cada condición de extracción.

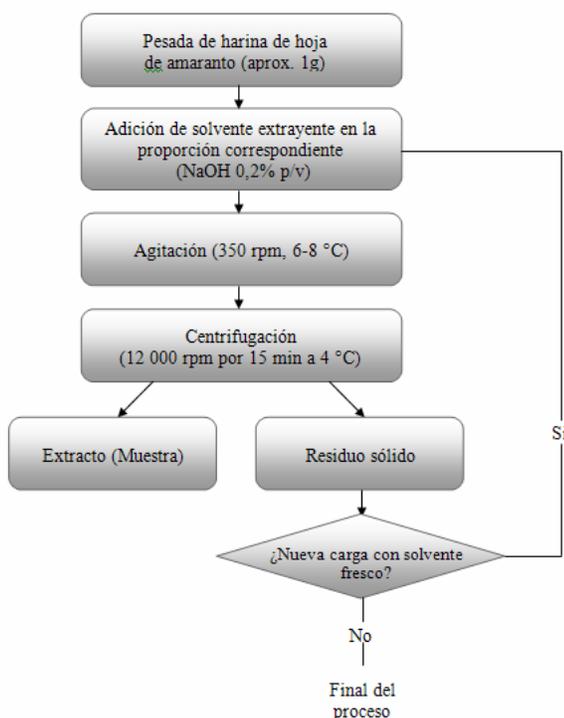


Figura 3.1. Esquema seguido para la extracción de proteínas a partir de harina de hojas de amaranto, empleando como solvente extrayente NaOH al 0,2% m/v.

Tabla 3.1. Masa de harina de hojas de amaranto y volumen de solvente empleados para la extracción de proteínas.

Condición de extracción*	Masa de harina (g)		Volumen de solvente por carga (ml)
	1	2	
1:10, 1h, 1c	1,0001	1,0001	10
1:10, 1h, 2c	1,0001	1,0001	10
1:10, 1h, 3c	1,0001	1,0001	10
1:10, 2h, 1c	1,0001	1,0002	10
1:10, 2h, 2c	1,0001	1,0001	10
1:10, 2h, 3c	1,0001	1,0001	10
1:10, 3h, 1c	1,0000	1,0001	10
1:10, 3h, 2c	1,0001	1,0001	10
1:10, 3h, 3c	1,0001	1,0001	10
1:12, 1h, 1c	1,0001	1,0001	12
1:12, 1h, 2c	1,0001	1,0003	12
1:12, 1h, 3c	1,0001	1,0002	12
1:12, 2h, 1c	1,0001	1,0001	12
1:12, 2h, 2c	1,0001	1,0001	12
1:12, 2h, 3c	1,0001	1,0001	12
1:12, 3h, 1c	1,0001	1,0001	12
1:12, 3h, 2c	1,0001	1,0001	12
1:12, 3h, 3c	1,0000	1,0000	12
1:15, 1h, 1c	1,0001	1,0001	15
1:15, 1h, 2c	1,0001	1,0001	15
1:15, 1h, 3c	1,0001	1,0001	15
1:15, 2h, 1c	1,0001	1,0001	15
1:15, 2h, 2c	1,0001	1,0001	15
1:15, 2h, 3c	1,0001	1,0001	15
1:15, 3h, 1c	1,0001	1,0001	15
1:15, 3h, 2c	1,0001	1,0001	15
1:15, 3h, 3c	1,0001	1,0001	15

*La condición de extracción se refiere a la relación harina de hoja de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1, 2 y 3 c).

Tabla 3.2. Identificación de muestras obtenidas con NaOH 0,2% m/v, a las diferentes condiciones de extracción.

Condición de extracción*	Cargas de solvente fresco	Código de muestra	
		1	2
1:10, 1h	1	S27	S28
1:10, 1h	1	S35	S36
	2	S37	S38
1:10, 1h	1	S39	S40
	2	S41	S42
	3	S43	S44
1:10, 2h	1	S23	S24
1:10, 2h	1	S79	S80
	2	S81	S82
1:10, 2h	1	S83	S84
	2	S85	S86
	3	S87	S88
1:10, 3h	1	S25	S26
1:10, 3h	1	S95	S96
	2	S97	S98
1:10, 3h	1	S61	S115
	2	S63	S116
	3	S65	S117
1:12, 1h	1	S4	S5
1:12, 1h	1	S10	S11
	2	S12	S13
1:12, 1h	1	S14	S15
	2	S16	S17
	3	S18	S19
1:12, 2h	1	S6	S7
1:12, 2h	1	S107	S108
	2	S109	S110

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hoja de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Tabla 3.2. Identificación de muestras obtenidas con NaOH 0,2% m/v, a las diferentes condiciones de extracción (continuación).

Condición de extracción*	Cargas de solvente fresco	Código de muestra	
		1	2
1:12, 2h	1	S55	S56
	2	S57	S58
	3	S59	S60
1:12, 3h	1	S8	S9
1:12, 3h	1	S99	S100
	2	S101	S102
1:12, 3h	1	S67	S68
	2	S69	S70
	3	S71	S72
1:15, 1h	1	S33	S34
1:15, 1h	1	S45	S46
	2	S47	S48
1:15, 1h	1	S49	S50
	2	S51	S52
	3	S53	S54
1:15, 2h	1	S31	S32
1:15, 2h	1	S111	S112
	2	S113	S114
1:15, 2h	1	S89	S90
	2	S91	S92
	3	S93	S94
1:15, 3h	1	S29	S30
1:15, 3h	1	S103	S104
	2	S105	S106
1:15, 3h	1	S73	S74
	2	S75	S76
	3	S77	S78

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hoja de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Una vez obtenidas todas las muestras de proteínas extraídas con solución de NaOH al 0,2%, se procedió a realizar la medición del volumen obtenido de las mismas, empleando

cilindros graduados de 10 y 25 ml con apreciación de 0,1 y 0,2 ml, respectivamente. En la tabla 3.3 se muestra el volumen medido para cada una de las muestras obtenidas.

Tabla 3.3. Volumen medido de extractos obtenidos con NaOH.

Condición de extracción*	Cargas solvente fresco	Código de muestra		Volumen (ml)	
		1	2	1	2
1:10, 1h	1	S27	S28	5,2 ± 0,1	4,9 ± 0,1
1:10, 1h	1	S35	S36	4,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1
	2	S37	S38	8,5 ± 0,1	8,9 ± 0,1
1:10, 1h	1	S39	S40	4,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1
	2	S41	S42	10,4 ± 0,2	8,2 ± 0,1
	3	S43	S44	8,9 ± 0,1	8,7 ± 0,1
1:10, 2h	1	S23	S24	4,5 ± 0,1	3,8 ± 0,1
1:10, 2h	1	S79	S80	4,5 ± 0,1	4,7 ± 0,1
	2	S81	S82	10,8 ± 0,2	8,1 ± 0,1
1:10, 2h	1	S83	S84	4,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1
	2	S85	S86	8,3 ± 0,1	7,8 ± 0,1
	3	S87	S88	9,6 ± 0,1	10,8 ± 0,1
1:10, 3h	1	S25	S26	4,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1
1:10, 3h	1	S95	S96	5,0 ± 0,1	4,5 ± 0,1
	2	S97	S98	9,0 ± 0,1	8,7 ± 0,1
1:10, 3h	1	S61	S115	3,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1
	2	S63	S116	9,8 ± 0,1	8,9 ± 0,1
	3	S65	S117	9,8 ± 0,1	9,9 ± 0,1
1:12, 1h	1	S4	S5	5,2 ± 0,1	4,8 ± 0,1
1:12, 1h	1	S10	S11	9,7 ± 0,1	9,3 ± 0,1
	2	S12	S13	10,8 ± 0,2	11,4 ± 0,2
1:12, 1h	1	S14	S15	6,8 ± 0,1	5,7 ± 0,1
	2	S16	S17	11,8 ± 0,2	11,2 ± 0,2
	3	S18	S19	10,6 ± 0,2	11,0 ± 0,2
1:12, 2h	1	S6	S7	6,0 ± 0,1	5,2 ± 0,1
1:12, 2h	1	S107	S108	6,0 ± 0,1	6,7 ± 0,1
	2	S109	S110	11,2 ± 0,2	11,0 ± 0,2

*La condición de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Tabla 3.3. Volumen medido de extractos obtenidos con NaOH (continuación).

Condición de extracción*	Cargas solvente fresco	Código de muestra		Volumen (ml)	
		1	2	1	2
1:12, 2h	1	S55	S56	6,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1
	2	S57	S58	11,4 ± 0,2	12,0 ± 0,2
	3	S59	S60	11,6 ± 0,2	12,6 ± 0,2
1:12, 3h	1	S8	S9	11,4 ± 0,2	10,8 ± 0,2
1:12, 3h	1	S99	S100	6,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1
	2	S101	S102	11,6 ± 0,2	12,8 ± 0,2
1:12, 3h	1	S67	S68	7,0 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	2	S69	S70	10,0 ± 0,2	11,8 ± 0,2
	3	S71	S72	10,8 ± 0,2	11,8 ± 0,2
1:15, 1h	1	S33	S34	9,6 ± 0,1	9,1 ± 0,1
1:15, 1h	1	S45	S46	9,8 ± 0,1	9,0 ± 0,1
	2	S47	S48	13,0 ± 0,2	13,8 ± 0,2
1:15, 1h	1	S49	S50	9,5 ± 0,1	8,6 ± 0,1
	2	S51	S52	9,3 ± 0,1	14,0 ± 0,2
	3	S53	S54	13,6 ± 0,2	14,6 ± 0,2
1:15, 2h	1	S31	S32	9,7 ± 0,1	9,5 ± 0,1
1:15, 2h	1	S111	S112	9,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1
	2	S113	S114	14,4 ± 0,2	14,6 ± 0,2
1:15, 2h	1	S89	S90	9,3 ± 0,1	8,7 ± 0,1
	2	S91	S92	14,0 ± 0,2	14,0 ± 0,2
	3	S93	S94	15,0 ± 0,2	14,8 ± 0,2
1:15, 3h	1	S29	S30	10,6 ± 0,2	9,4 ± 0,1
1:15, 3h	1	S103	S104	9,8 ± 0,1	9,5 ± 0,1
	2	S105	S106	13,2 ± 0,2	13,6 ± 0,2
1:15, 3h	1	S73	S74	9,3 ± 0,1	10,6 ± 0,2
	2	S75	S76	13,4 ± 0,2	14,8 ± 0,2
	3	S77	S78	14,8 ± 0,2	14,6 ± 0,2

*La condición de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

A fin de identificar los grupos de proteínas, se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) siguiendo el protocolo de Laemli (1970) (anexo C). Dichos geles fueron preparados a una concentración de 10% m/v de acrilamida (gel de resolución) para permitir la visualización de proteínas de alto peso molecular. La concentración de los geles de apilamiento fue de 5% m/v de acrilamida. La longitud total de los geles fue de 7,5 cm (gel de apilamiento junto con el gel de resolución); esto de acuerdo a las dimensiones de las placas de vidrio donde se elaboraron los geles.

Para la electroforesis se seleccionaron al azar muestras de los extractos obtenidos con hidróxido de sodio, además de las muestras obtenidas mediante un protocolo alternativo de extracción con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA·Na₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v ditioneitol (DTT) y posterior precipitación de las proteínas con 10% m/v de ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*, TCA, en inglés) y 0,2% m/v DTT en acetona fría, siguiendo el procedimiento descrito en la figura 3.2 (Vertommen y col., 2010), a fin de lograr la mejor visualización de las proteínas presentes en las muestras de hojas de amaranto estudiadas.

También se realizó la electroforesis, usando uno de los extractos obtenidos con NaOH (muestra S67), luego de hacer precipitar las proteínas presentes con 10% TCA y 0,2% DTT en acetona fría, para poder realizar comparaciones en cuanto a las bandas de proteínas que se pudieran visualizar. El procedimiento seguido se muestra en la figura 3.3.

En la tabla 3.4 se muestra una descripción detallada de las muestras obtenidas mediante los protocolos alternativos de extracción mencionados anteriormente.

Tabla 3.4. Descripción de muestras obtenidas mediante extracción con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v DTT y posterior precipitación con 10% m/v TCA – 0,2% m/v DTT.

Código de muestra	Descripción
A	Sobrenadante obtenido al centrifugar el extracto con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na ₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v DTT a partir de harina de hojas de amaranto
B	Resuspensión de proteínas, contenidas en muestra A, precipitadas con solución 10% m/v TCA – 0,2% m/v DTT en acetona y posteriormente lavadas con 0,2% m/v DTT en acetona
C	Resuspensión de proteínas, contenidas en muestra S67, precipitadas con solución 10% m/v TCA – 0,2% m/v DTT en acetona y posteriormente lavadas con 0,2% m/v DTT en acetona

La electroforesis para identificación de las proteínas fue llevada a cabo en una cámara de electroforesis de BioRad Laboratories, modelo Mini-PROTEAN Tetra Cell, con capacidad para cuatro geles, a un voltaje constante de 60 V para el apilamiento de las muestras y a 120 V para la resolución de las mismas. Se emplearon dos marcadores moleculares de amplio rango como referencia para la estimación de los pesos moleculares de las proteínas presentes en los extractos, siendo éstos de 2–212 kDa (marca BioLabs) y de 10–225 kDa (marca Promega), descritos en el anexo D. En la tabla 3.5 se muestra la preparación de las muestras y la distribución de éstas en los geles elaborados.

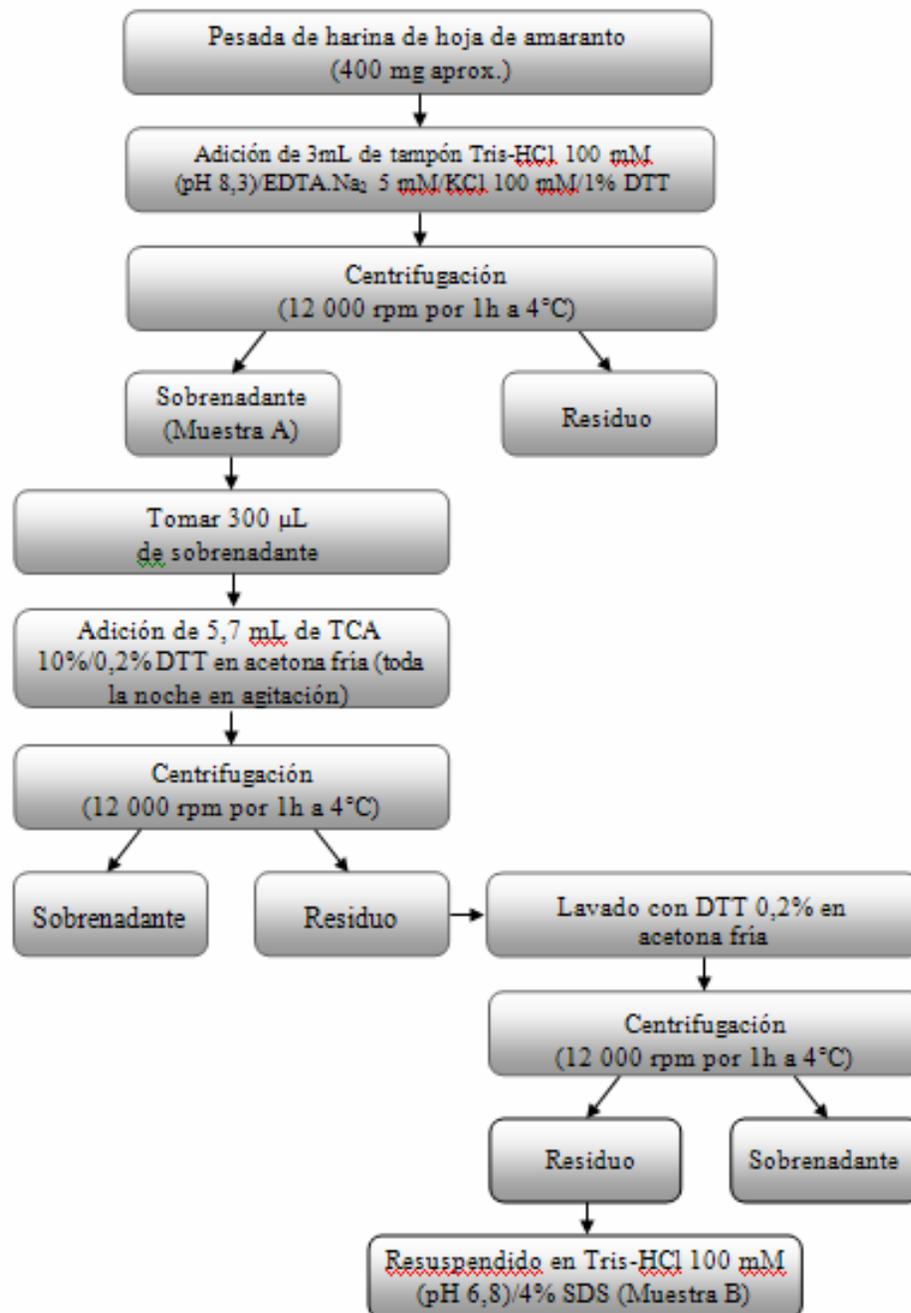


Figura 3.2. Protocolo alternativo para la extracción de proteínas de la harina de hojas de amaranto.

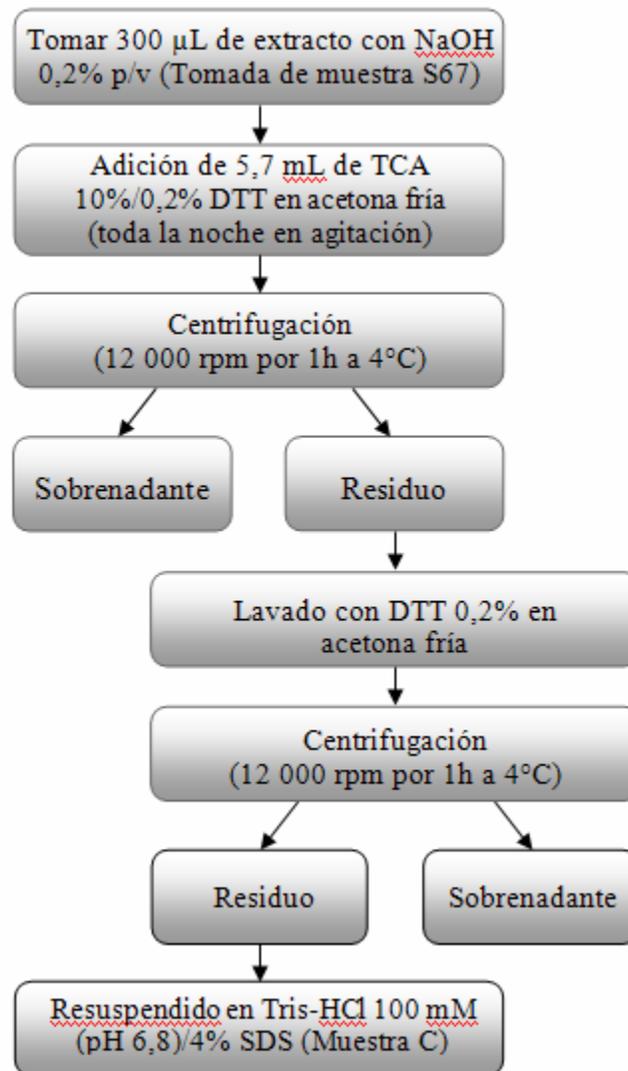


Figura 3.3. Protocolo alternativo de extracción. Precipitación de proteínas partiendo de extracto obtenido con NaOH 0,2% m/v.

Tabla 3.5. Preparación y distribución de muestras y marcadores moleculares en geles de poliacrilamida–SDS para identificación de proteínas.

Gel N°	Código de muestra	Preparación	Pozo
1	MM ₁ *	12 µL marcador, 3 µL Buffer muestra5X con β-mercaptoetanol (Anexo C)	1
	S4	12 µL muestra, 3 µL Buffer muestra 1X sin β-mercaptoetanol (Anexo C)	2
	S6	12 µL muestra, 3 µL Buffer muestra 1X sin β-mercaptoetanol	3
	S8	12 µL muestra, 3 µL Buffer muestra 1X sin β-mercaptoetanol	4
	MM ₂ †	5 µL marcador, 7 µL H ₂ O desionizada, 3 µL Buffer muestra 5X con β-mercaptoetanol	5
2	MM ₂	5 µL marcador, 7 µL H ₂ O desionizada, 3 µL Buffer muestra 5X con β-mercaptoetanol	1
	A	8 µL muestra, 16 µL H ₂ O desionizada, 6 µL Buffer muestra5X sin β-mercaptoetanol	2
	C	8 µL muestra, 16 µL H ₂ O desionizada, 6 µL Buffer muestra5X sin β-mercaptoetanol	3
	B	8 µL muestra, 16 µL H ₂ O desionizada, 6 µL Buffer muestra5X sin β-mercaptoetanol	4
	MM ₁	12 µL marcador, 3 µL Buffer muestra5X con β-mercaptoetanol (Anexo C)	5

* Marcador molecular de amplio rango (2-212 kDa) de BioLabs. † Marcador molecular de amplio rango (10-225 kDa) de Promega.

Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron teñidos siguiendo el protocolo de tinción con plata (anexo E), deteniendo el proceso de tinción cuando se consideró que los geles adquirieron la coloración adecuada evitando así que el reactivo tiñera en exceso los geles y se perdiera la información contenida en ellos.

Las imágenes de los geles obtenidos fueron digitalizadas, mediante un *scanner* (*Epson Stylus TX100*) con resolución de 300 puntos por pulgada. La identificación de las bandas de proteínas se llevó a cabo mediante la herramienta “análisis de geles” del programa procesador de imágenes *ImageJ 1.38X*, la cual mide el perfil de densidad óptica de la imagen analizada. En los perfiles de densidad óptica, los picos de la gráfica representan zonas de mayor densidad óptica, las cuales corresponden a bandas de proteínas identificadas. La herramienta analiza secciones del gel determinadas por el investigador. También se usó la opción de aplicación de filtro, específicamente el filtro azul-verde-rojo, a fin de lograr una mejor definición de las imágenes digitalizadas de los geles.

3.2. Cuantificación de las proteínas encontradas en las hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*)

La cuantificación de las proteínas encontradas en los extractos con NaOH a partir de harina de hojas de amaranto, se hizo mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) (Pierce Biotechnology, 2004).

Se empleó el *kit* para cuantificación de proteínas con BCA de Thermo Scientific, el cual se basa en un cambio de coloración de las muestras al agregar el reactivo BCA, y posterior medición de la absorbancia de tales muestras, la cual es proporcional a la concentración de las proteínas presentes. En el anexo F se describe el protocolo seguido y la preparación de los reactivos requeridos.

Se prepararon soluciones patrón de albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) siguiendo lo establecido en el protocolo de cuantificación con BCA (anexo F), empleando como diluyente solución de NaOH al 0,2% m/v, de forma tal, que hubiera uniformidad en las soluciones correspondientes entre las muestras y los patrones, es decir, las lecturas de absorbancia se hicieron con los patrones y las muestras disueltos en las mismas soluciones. El rango de concentración de BSA de los patrones empleados fue de 25 a 2 000 µg/ml.

A fin de asegurar que la concentración de las muestras se encontrara dentro del rango medido por los patrones empleados, todas las muestras originales, es decir, todos los extractos obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción, se diluyeron en una relación 1:10 con solución de NaOH 0,2% m/v. Se tomaron 20 µl de cada muestra y se agregó NaOH al 0,2% m/v, hasta completar un volumen final de 200 µl.

Las cuantificaciones fueron llevadas a cabo en microplacas de fondo plano (figura 3.4) para cuantificación de proteínas marca Greinerbio-one, de noventa y seis pozos en las cuales se colocaron 25 µl, tanto de las soluciones patrón como de las muestras diluidas y se agregaron posteriormente 200 µl de solución trabajo (reactivo de BCA), según lo establecido en el protocolo de cuantificación. Siguiendo este protocolo, una vez agregada la solución de trabajo, las placas se incubaron en oscuridad a 37°C durante 30 min, para permitir el desarrollo de la coloración. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar, a temperatura ambiente, por espacio de 5 min para proceder a la lectura de la absorbancia a 562 nm, empleando un lector de microplacas Multi-Detection Microplate Reader marca Bio-Tek, modelo Sinergy HT. La concentración de proteína presente en cada una de las muestras diluidas se determinó a partir de las curvas de calibración y los valores de absorbancia medidos (anexo G). Todas las cuantificaciones se realizaron por duplicado.

Para evitar posibles alteraciones producidas por el almacenamiento prolongado de las muestras en el solvente (NaOH 0,2% m/v), la cuantificación se realizó a medida que se dispuso de suficientes muestras para el empleo de una microplaca. Por lo tanto, las cuantificaciones se realizaron en tres ocasiones diferentes, por lo que fue necesario realizar tres curvas de calibración (anexo G).

Las muestras diluidas fueron las empleadas para los ensayos de cuantificación y a partir de ellas, se realizaron los cálculos para determinar las concentraciones de las muestras originales (anexo G). La cantidad de proteína presente en cada una de las muestras sin diluir (originales), se determinó empleando la concentración calculada a partir de las muestras diluidas y el volumen medido de las muestras originales. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.10 de la sección de resultados.

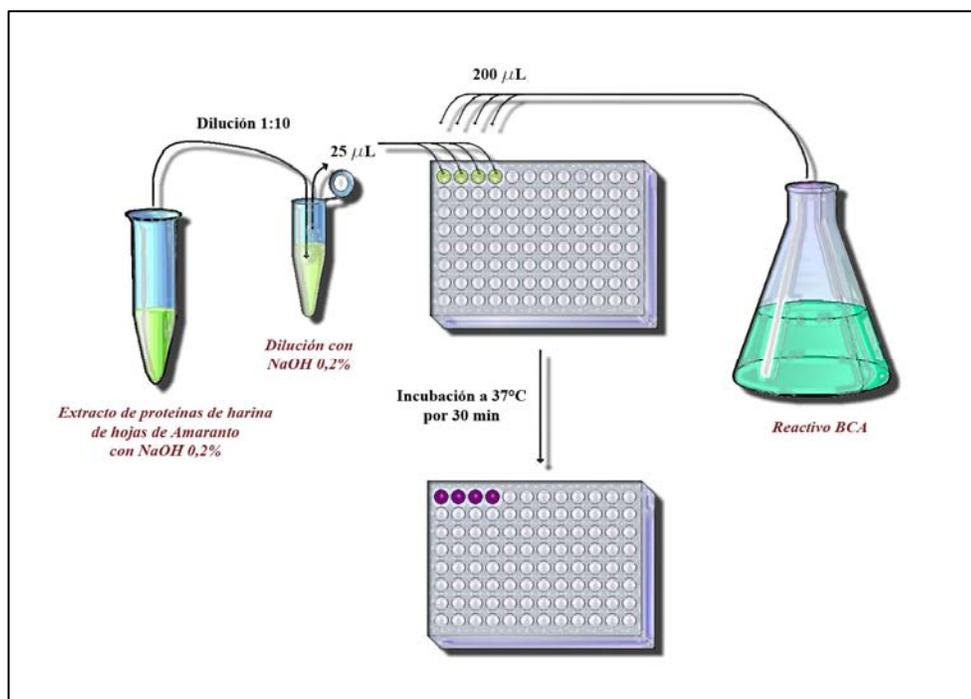


Figura 3.4. Cuantificación de proteínas con BCA en microplacas (Thermo Scientific, 2004).

La cantidad de proteína cruda presente en la harina de hojas de amaranto se determinó empleando el método de cuantificación de nitrógeno orgánico de Kjeldahl, empleando como factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda el valor de 6,25 (Pattacini y col., 2000; Pond, Lehmann, 1989; Abeye y col., 2003), siguiendo la norma venezolana COVENIN 1195–80 (1980) con modificaciones.

Para determinar el contenido de nitrógeno orgánico según el método de Kjeldahl en la muestra de harina empleada para realizar las extracciones, se siguió el protocolo especificado en el anexo H. La determinación de nitrógeno en la harina empleada se realizó por triplicado, pesando muestras de harina de 0,1002 g en cada caso, la cual se encontraba totalmente seca (muestra empleada para determinar la humedad de la harina de amaranto usada en las extracciones), de forma que los resultados obtenidos se encuentran en base seca.

Las muestras, luego del proceso de digestión y destilación, fueron tituladas con solución de HCl 0,1081 N. El volumen gastado en la titulación de cada una de las muestras fue de 3,15; 3,25 y 3,05 ml, respectivamente.

3.3. Evaluación del efecto de las variables relación masa a volumen de sólidos foliares/solvente, número de cargas con solvente fresco y tiempo de agitación, sobre el rendimiento de la extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius*

El rendimiento de extracción de proteínas se expresó como la razón de la cantidad de proteínas presentes en los extractos, respecto a la proteína cruda presente en la harina de hojas de amaranto expresada como porcentaje m/m en base seca. Los valores obtenidos se presentan en las tablas 4.14 y 4.15 de la sección de resultados.

Para determinar el rendimiento a las diferentes condiciones evaluadas se empleó como valor de contenido de proteína cruda presente en la harina de hojas de amaranto el obtenido mediante el método de Kjeldahl (tal como se explica en la sección anterior), al igual que el valor del contenido de proteína cruda reportado por Acevedo y col. (2007) mostrado en la tabla 2.1. Estos autores emplearon el método de Kjeldahl siguiendo las normas de la *Association of Official Agricultural Chemistry* (AOAC, por sus siglas en inglés).

La evaluación del efecto de cada una de las variables seleccionadas sobre el rendimiento en la extracción de las proteínas totales de la harina de hoja de amaranto se realizó estableciendo un diseño experimental completamente aleatorizado de tres factores fijos (relación masa de harina de hoja de amaranto/volumen de solvente, carga de solvente y tiempo de agitación) con tres niveles cada uno. En cada tratamiento, se empleó una muestra de aproximadamente 1 g de harina, a la cual se le añadió el solvente, agitando a velocidad constante de 350 rpm y a una temperatura de 6 a 8°C. Para el factor relación masa de harina/volumen de solvente se establecieron los niveles de dilución 1:10, 1:12 y 1:15. Para el factor carga de solvente se usaron los niveles: una, dos y tres cargas con solvente fresco; con un volumen de solvente por carga igual al establecido por la relación harina/volumen correspondiente. Para el factor tiempo de agitación, se emplearon los niveles: una, dos y tres horas. Para cada uno de los 27 tratamientos, resultantes de todas las combinaciones posibles entre los niveles de los factores, se hicieron dos réplicas o repeticiones (tablas 4.14 y 4.15). Este experimento factorial se analizó estadísticamente mediante un análisis factorial de la varianza como se describe en el apartado 3.6.

3.4. Comparación del rendimiento de extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius* bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas

La comparación del rendimiento de extracción a las diferentes condiciones evaluadas (tablas 4.14 y 4.5) se realizó mediante una prueba de análisis factorial de la varianza de un experimento factorial de tres factores y tres niveles de efectos fijos (27 tratamientos), con dos réplicas por tratamiento, empleando el programa SPSS versión 15.0 (Ferrán, 2001). El procedimiento seguido se detalla en la sección 3.6.

3.5. Ejemplo de cálculos

Los cálculos de la masa de proteínas presentes en los extractos con NaOH y del rendimiento de extracción a las diferentes condiciones evaluadas, se realizaron en una hoja de cálculo del programa *Microsoft Office*® *Excel* 2007 para *Windows*, conservando 3 a 4 cifras significativas, de acuerdo con la sensibilidad de las medidas de absorbancia y el rendimiento final de la extracción de proteínas. Los resultados se expresaron con 2 cifras significativas, debido a la sensibilidad del instrumento de medición de volumen. Cuando se expresaron valores promedio, éste se acompañó del valor de la desviación estándar correspondiente.

3.5.1. Cuantificación de la masa de proteína presente en los extractos con NaOH 0,2% m/v

Siguiendo lo establecido en el protocolo para la cuantificación de proteínas con BCA (anexo F), se procedió a construir la curva de calibración de absorbancia a 562 nm en función de la concentración de proteína (en µg/ml), a partir de los patrones de BSA (albúmina) empleados en cada ensayo de cuantificación. En el anexo G se

muestran las tablas de las absorbancias medidas y corregidas, para los duplicados de los patrones de diferentes concentraciones de BSA y las gráficas de las curvas de calibración de los tres ensayos que se realizaron para cuantificar las proteínas.

Para construir las curvas de calibración, se debe restar al valor de absorbancia medido para cada uno de los patrones y su réplica respectiva, el valor promedio de absorbancia medida para el blanco.

A fin de disminuir el error que se introduce al realizar aproximaciones para ajustar el número de cifras significativas, el valor de absorbancia corregida, respecto a la absorbancia promedio del blanco, para cada uno de los patrones y muestras, con sus respectivas réplicas, se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$A_{ci} = A_{562nmi} - \left(\frac{A_{562nmb} + A_{562nibr}}{2} \right) \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde:

A_{Ci} = absorbancia de cada uno de los patrones y muestras, con sus réplicas respectivas, corregida respecto al blanco.

A_{562nmi} = absorbancia de cada uno de los patrones y muestras, con sus réplicas respectivas, medida a 562 nm.

A_{562nmb} = absorbancia del blanco, medida a 562 nm.

$A_{562nibr}$ = absorbancia de la réplica del blanco, medida a 562 nm.

Para el patrón A (2 000 µg/ml), empleado en el primer ensayo de cuantificación, sustituyendo los valores de la tabla G.1 en la ecuación 3.1 se tiene que la absorbancia corregida fue:

$$A_{CA} = 1,896 - \left(\frac{0,093 + 0,096}{2} \right)$$

$$A_{CA} = 1,802$$

Este cálculo se realizó para la réplica del patrón A y para todos los patrones y sus réplicas en los tres ensayos de cuantificación realizados. Una vez calculada la absorbancia corregida respecto al blanco, para los patrones empleados y sus réplicas, se calculó la absorbancia promedio de los mismos. Los valores obtenidos fueron reportados en las tablas G.1, G.2 y G.3 del anexo G.

Los cálculos anteriores se realizaron también para cada una de las muestras de extractos, usando el blanco que le correspondió en cada uno de los tres ensayos realizados. Los valores fueron reportados en las tablas G.4, G.5 y G.6 del anexo G.

Con los valores de absorbancia promedio y de concentración de las soluciones patrón se construyeron las curvas de calibración correspondientes a cada ensayo de cuantificación, mostradas en las figuras G.1, G.2 y G.3 del anexo G. A partir de las curvas de calibración se determinaron las ecuaciones que rigen el comportamiento lineal de las mismas y que se emplearon para el cálculo de la concentración de cada una de las muestras diluidas de extracto de hojas de amaranto.

Por ejemplo, para el primer ensayo de cuantificación realizado, la ecuación que rige la curva de calibración es la siguiente:

$$A_{Ci} = 0,001C_{di} + \quad \text{(Ec. 3.2)}$$

donde:

C_{di} = concentración de proteína en cada una de las muestras diluidas en relación 1:10 y sus réplicas ($\mu\text{g/ml}$).

Para la muestra S36 (primer ensayo de cuantificación que se hizo), sustituyendo los valores de la tabla G.4 en la ecuación 3.2 se tiene:

$$1,103 = 0,001C_{dS36} + 0,023$$

$$C_{dS36} = 1,08 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$$

La concentración de cada una de las muestras diluidas en relación 1:10 se calculó de la misma forma en el primer ensayo de cuantificación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla G.4. La concentración de las muestras diluidas en los dos ensayos restantes, fue calculada empleando la ecuación correspondiente a sus curvas de calibración (figuras G.2 y G.3). Una vez calculada la concentración de cada una de las muestras diluidas y sus réplicas se calculó el valor promedio de las mismas y todos los resultados obtenidos se muestran en las tablas G.4, G.5 y G.6.

La concentración de las muestras sin diluir, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$C_{oi} = \frac{C_{di} \cdot V_{di}}{V_{oi}} \cdot 10 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde:

C_{oi} = concentración de proteína en cada una de las muestras sin diluir y sus réplicas (g/ml).

V_{di} = volumen de la muestra diluida. Para todas las muestras, el volumen final de la dilución fue de 200 μ l.

V_{oi} = volumen de la muestra sin diluir. Para todas las muestras, el volumen empleado para realizar la dilución fue de 20 μ l.

1×10^{-6} = factor de conversión de μ g/ml a g/ml.

Para la muestra S36, sustituyendo el valor promedio de la concentración de la muestra diluida en relación 1:10 (tabla G.4) en la ecuación 3.3 se tiene:

$$C_{oS36} = \frac{1,10 \times 10^3 \mu\text{g/mL} \cdot 200 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}} \cdot 1 \times 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{g}}$$

$$C_{oS36} = 0,0110 \text{ g/mL}$$

La concentración sin diluir de cada una de las muestras en los tres ensayos de cuantificación realizados, fue calculada de la misma forma y los resultados se muestran en la tabla 4.11.

La masa de proteína presente en cada una de las muestras, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$M_{pi} = C_c \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde:

M_{pi} = masa de proteína presente en cada una de las muestras sin diluir (g).

V_i = volumen medido de las muestras (ml), disponible en la tabla 4.1.

Para la muestra S36, sustituyendo los valores de las tablas 4.1 y 4.10 se tiene:

$$M_{pS36} = 0,0110 \text{ g/mL} \cdot 4,3 \text{ mL}$$

$$M_{pS36} = 0,047 \text{ g}$$

La masa de proteína calculada para todas las muestras analizadas en los ensayos de cuantificación realizados, al igual que la masa total extraída bajo las distintas condiciones de extracción evaluadas, se presentan en la tabla 4.10 de la sección de resultados.

3.5.2. Determinación del contenido de proteína cruda en harina de hojas de amaranto mediante el método de determinación de nitrógeno orgánico de Kjeldahl

El contenido de nitrógeno presente en cada muestra se calculó mediante la ecuación H.1. Por ejemplo, para la primera muestra analizada, se determinó que el contenido de nitrógeno en base seca fue de:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{3,15 \text{ mL} \times 0,1081 \text{ N} \times 0,014 \times 100}{0,1002 \text{ g}} = 4,76\%$$

El porcentaje de nitrógeno en base seca determinado para las muestras restantes fue de 4,91 y 4,61%, respectivamente.

El porcentaje de nitrógeno orgánico se llevó a porcentaje de proteína cruda empleando el factor de conversión de 6,25, puesto que, en diversas fuentes bibliográficas consultadas (Pattacini y col., 2000; Pond, Lehmann, 1989; Abeye y col., 2003) de determinación de proteína cruda en hojas de distintas especies de amaranto, se usó dicho factor de conversión para el cálculo. El resultado del contenido de proteína cruda determinada mediante este método se presenta en la sección 4.4.

3.5.3. Cálculo del rendimiento de extracción de proteína total

El cálculo del rendimiento de extracción de proteína total, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$RExt = \frac{mpext}{mpc} ; \quad (Ec. 3. 5)$$

donde:

RExt = rendimiento de extracción de proteína total, expresado en base seca (%).

mpext = masa total de proteína extraída a las diferentes condiciones de extracción evaluadas (g).

mpc = masa de proteína cruda presente en las muestras de harina empleadas para las extracciones, expresada en base seca (g).

Considerando que la humedad de la harina empleada para las extracciones permaneció sin variaciones significativas a lo largo del tiempo, y que tuvo un valor, en base seca, igual a 9,5 g de agua/g de STS (sólido totalmente seco), el STS correspondiente para las muestras de harina empleadas en las extracciones se determinó según la siguiente ecuación:

$$STS = \quad \quad \quad (Ec. 3.8)$$

donde:

STS = masa de sólido totalmente seco de la muestra de harina empleada para cada condición de extracción.

SH = masa de harina pesada para cada condición de extracción (1,0001; 1,0002 y 1,0003 g).

X = humedad en base seca, expresada de forma fraccional (0,095).

Para el caso en que se pesó 1,0001 g de harina para realizar las extracciones, la masa de STS correspondiente fue:

$$STS = \frac{1,0001 \text{ g}}{1 + 0,095} = 0,913 \text{ g}$$

La masa de sólido totalmente seco correspondiente para muestras de harina de 1,0002 y de 1,0003 g también fue de 0,913 g, al conservar tres cifras significativas.

Considerando el contenido de proteína cruda en la harina de hoja de amaranto de 29,75% en base seca, obtenido en este trabajo, la masa de proteína presente en las muestras de harina empleadas para las extracciones, fue de 0,272 g en base seca, es decir, por cada gramo de STS de harina empleada para una extracción, existía un

máximo de 0,272 g de proteína a extraer. Al usar 25,44% (promedio de las determinaciones en base seca de tres muestras reportadas para *Amaranthus dubius* por Acevedo y col. (2007), como valor del contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto, la masa de proteína cruda que estaría presente en las muestras de harina sería de 0,232 g, es decir, que por cada gramo de STS de harina empleada existiría un máximo de 0,232 g de proteína por extraer.

Tomando como ejemplo el rendimiento calculado para la primera réplica a las condiciones de extracción de relación harina/solvente de 1:10, 1h de agitación y 1 carga con solvente fresco (muestra S27), para ambos valores de referencia de contenido de proteína cruda se obtuvo:

$$RE_{Ext} = \frac{0,048 \text{ g}}{0,272 \text{ g}} \times 100 = 18\%$$

$$RE_{Ext} = \frac{0,048 \text{ g}}{0,232 \text{ g}} \times 100 = 21\%$$

En las tablas 4.15 y 4.16 se muestra el rendimiento calculado para las réplicas de cada una de las condiciones de extracción evaluadas y el rendimiento promedio de éstas usando ambos valores de referencia de contenido de proteína cruda, respectivamente.

3.6. Tratamiento estadístico de los datos

Los cálculos fueron realizados con un número de cifras significativas que estuviera de acuerdo con la sensibilidad de los instrumentos de medición.

Cuando fue necesario, los promedios y los porcentajes se expresaron acompañados de su desviación estándar, escribiéndose como promedio \pm desviación estándar o como porcentaje \pm desviación estándar.

Para comparar dos porcentajes entre sí, se empleó la prueba de comparación de proporciones para muestras independientes (Scheffler, 1981; Glass, Stanley, 1974). La prueba se llevó a cabo con el paquete estadístico *Primer of Biostatistics V 3.01* (Glantz, 1992).

Para comparar los promedios de dos muestras dependientes de datos (datos pareados), se empleó la prueba de la t de *Student* para datos pareados, en la cual se contrasta si la diferencia entre los valores correspondientes en cada muestra es significativamente diferente de cero (Scheffler, 1981; Glass, Stanley, 1974). La prueba se llevó a cabo con el paquete estadístico *Primer of Biostatistics V 3.01* (Glantz, 1992).

Para comparar los promedios de dos muestras independientes de datos, se empleó la prueba de la t de *Student* para datos no pareados (Scheffler, 1981; Glass, Stanley, 1974). La prueba se llevó a cabo con el paquete estadístico *Primer of Biostatistics V 3.01* (Glantz, 1992).

Para comparar los promedios de tres o más muestras independientes de datos, se empleó el análisis de varianza de un factor. Si esta prueba indicaba diferencia estadísticamente significativa, para determinar entre cuáles pares de promedios había diferencia, se empleó la prueba de la t de *Student* para muestras independientes

(Scheffler, 1981; Glass, Stanley, 1974). La prueba se llevó a cabo con el paquete estadístico *Primer of Biostatistics* V 3.01 (Glantz, 1992).

Para la evaluación y comparación de los factores y los diferentes niveles considerados para determinar el rendimiento de la extracción de las proteínas totales de la harina de hoja de amaranto, se realizó una prueba de análisis factorial de la varianza de un experimento factorial de tres factores y tres niveles de efectos fijos (27 tratamientos), con dos réplicas por tratamiento, empleando el programa SPSS versión 15.0 (Ferrán, 2001).

El análisis factorial de la varianza contrasta si los datos se ajustan al denominado modelo lineal general, que se genera a partir de un experimento factorial de las características antes descritas. En este caso el modelo lineal general para tres factores y tres niveles (27 tratamientos), con dos réplicas por tratamiento se expresa matemáticamente como:

$$y_{ijkp} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkp}$$

donde:

μ = efecto de la media global,

α_i = efecto del i-ésimo nivel del primer factor (factor α),

β_j = efecto del j-ésimo nivel del segundo factor (factor β),

γ_k = efecto del k-ésimo nivel del tercer factor (factor γ),

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre α_i y β_j ,

$(\alpha\gamma)_{ik}$ = efecto de la interacción entre α_i y γ_k ,

$(\beta\gamma)_{jk}$ = efecto de la interacción entre β_j y γ_k ,

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción entre α_i , β_j y γ_k ,

ε_{ijk_r} = error (aleatorio) de las r réplicas de cada factor y sus correspondientes niveles, $i = 1, 2, 3$; $j = 1, 2, 3$ y $k = 1, 2, 3$.

Los coeficientes correspondientes al modelo matemático antes descrito se presentan en la tabla 4.16.

Este modelo debería cumplir con tres condiciones: normalidad, homoscedasticidad (varianzas homogéneas) y aleatoriedad de las muestras empleadas. Sin embargo, a) la no normalidad tiene muy pocos efectos sobre el análisis de varianza, b) el efecto de las varianzas heterogéneas (no homoscedásticas) sobre el análisis de varianza se minimiza cuando los tamaños muestrales, en los distintos tratamientos, son iguales (en este caso, dos en cada tratamiento) y c) se asignaron aleatoriamente las muestras de harina a cada tratamiento de extracción. Por lo anterior, se puede decir que se cumplen las condiciones suficientes para realizar satisfactoriamente el análisis factorial de la varianza del modelo planteado (Ferrán, 2001).

El modelo generado por el análisis factorial se puede representar tridimensionalmente como una superficie de respuesta, donde los ejes X y Y, corresponden a los pares de factores dilución–tiempo, dilución–carga y tiempo–carga, o cualquier otra combinación que contenga pares de factores que abarquen los tres factores. En el eje vertical (Z) se presentan los promedios de los rendimientos de extracción generados por el modelo factorial, son las llamadas medias marginales estimadas del modelo factorial. La observación de los tres gráficos de superficie permitiría determinar visualmente las mejores y peores condiciones de rendimiento de la extracción de proteínas. Además, como las condiciones tiempo y dilución son variables continuas, aunque para la realización del experimento se tomaron algunos niveles específicos, este tipo de gráfico permite evaluar visualmente

aquellos tiempos y diluciones cuyos valores son intermedios entre los extremos usados para ambos factores (Montgomery, 1991). Las gráficas se muestran en la figuras 4.7, 4.8 y 4.9 de la sección de resultados.

En todas las pruebas realizadas, se consideraron como significativas aquellas diferencias con $p < 0,05$. Para estas mismas pruebas, cuando se consideró necesario, se reportó también el valor de la prueba (z, t o F).

3.7. Equipos, materiales, sustancias y herramientas

Equipos

- Estufa, marca *Memmert*; modelo UNB-500 de 108 litros de capacidad.
- Molino eléctrico de granos de café, marca *MAXI-MATIC*[®]; modelo TS-630.
- Tamizador, marca *Cole Parmer*; modelo RX-812.
- Unidad automática de destilación para determinación de proteínas, marca *Velp Scientifica*, modelo UDK 130D.
- Balanza analítica, marca *Ohaus*; modelo *Adventurer* AR2140. Capacidad de 210 g. Apreciación de 0,0001 g.
- Balanza de medición de humedad, marca *Ohaus*; modelo MB200. Capacidad de 200 g. Apreciación de 0,1 g.
- Digestor de proteínas para análisis de Kjeldahl, marca *Velp Scientifica*; modelo DK 6.
- Medidor de pH, marca *Corning*; modelo 125. Rango de medición: 0 a 14 UpH. Resolución de 0,01 UpH.
- Plancha de agitación magnética con calentamiento, marca *Cimarec*; modelo SP131325. Rango de agitación de 60 a 1.200 rpm. Rango de temperatura: 5-540°C.

- Plancha de agitación, marca *Cole-Parmer*; modelo K-51401-00. Rango de velocidad: 4 a 160 oscilaciones por minuto.
- Mezclador, marca *Scientific Industries*, modelo Vortex Genie 2 G-560.
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad, marca *Beckman*; modelo J2-21M. Velocidad máxima: 21.000 rpm. Rango de temperatura hasta -30°C a baja velocidad y de 0 a 40 °C a máxima velocidad, Rotor JA-20.
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios, marca *Bio-Rad Laboratories*; modelo *MiniPROTEAN Tetra Cell*. Capacidad para cuatro geles. Dimensiones (largo x ancho x alto): 16x12x18 cm. Límite de voltaje: 600 VCD y 30 W.
- Fuente de poder, marca *Bio-Rad Laboratories*, modelo *PowerPac Basic*. Posee 4 pares de terminales dispuestos en paralelo. Rango de voltaje: 10 a 300 V. Rango de corriente: 4 a 400 mA. Potencia máxima: 75 W. Control de tiempo ajustable de 1 a 999 minutos.
- Plancha de secado al vacío de geles, marca *Hofer, Amersham Biosciences*; modelo GD 2000, 80-6428-84. Dimensiones (largo x ancho x alto): 55,0 x 43,5 x 8,5 cm.
- Incubador de baja temperatura. Marca *Shel-Lab, Sheldon Manufacturing Inc*; modelo 2005. Rango de temperature de -10 a 45°C.
- Lector de microplacas *Multi-Detection Microplate Reader*. Marca *Bio-Tek*; modelo *Sinergy HT*. Medición de absorbancia, fluorescencia y luminiscencia.
- Escaner *Epson Stylus TX 100*.

Materiales

- Micropipetas, marca *Gilson*; modelos *Pipetman*, P20, P100, P200, P1000, P5000, P10 ml.
- Micropipetas, marca *Rainin*; modelo *Pipet-Plus Latch-Mode*, R10, R20.

- Micropipeta multicanal, marca *Gilson*; modelo *Pipetman Ultra*. Capacidad de 300 μ l.
- Tubos para digestión de proteína.
- Bureta graduada de 10 ml.
- Matraces *erlenmeyer* de 250 ml.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 150, 250, 500 y 1000 ml.
- Cilindros graduados de 10, 100, 500 y 1000 ml.
- Tubos tipo *Falcon* de fondo cónico de 15 y 50 ml.
- Tubos tipo *Eppendorf* de 0,6 y 1,5 ml.
- Tubos de policarbonato para centrifugación.
- Microplacas de fondo plano para cuantificación de proteínas, marca *Greinerbio-one*; modelo 655101.
- Tubos de vidrio para digestión de proteína.

Sustancias

- Harina de hoja de *Amaranthus dubius* seca y molida.
- Agua destilada.
- Agua desionizada.
- Hidróxido de sodio. Pureza aproximadamente de 97%.
- Acrilamida para electroforesis. Pureza mayor o igual a 99%.
- Bis N, N- Metileno-bis-acrilamida (bisacrilamida) para electroforesis.
- Dodecil sulfato de sodio para electroforesis. Pureza aproximada de 99%.
- Persulfato de amonio (APS) para electroforesis. Pureza mayor igual a 98%.
- Tetrametiletildiamina (TEMED). Grado biología molecular.
- Tris (hidroximetil) aminometano (Trizma Base) para electroforesis.
- Glicina. Grado biología molecular.
- Marcador molecular de amplio rango (2-212 kDa) #P7702S de *New England Bio Labs*.

- Marcador molecular de amplio rango (10-225 kDa) #V8401 de *Promega*.
- Acetona. Pureza de 95-98%.
- Tris (hidroximetil) aminometano, sal ácida (Tris-HCl). Grado biología molecular.
- Ditioneitol (DTT). Grado biología molecular.
- Ácido tricloroacético (TCA). grado biología molecular.
- Ácido etilendiaminotetraacético monosódico (EDTA·Na₂). Grado biología molecular.
- Cloruro de potasio. Grado biología molecular.
- Ácido acético glacial. Pureza de 95-98%.
- Etanol. Pureza de 95%.
- Formaldehído. Solución al 37%.
- Ditionito de sodio purificado.
- Nitrato de plata. Pureza de 99%.
- Carbonato de sodio. Pureza mayor o igual a 99,5%.
- Tiosulfato de sodio. Pureza mayor o igual a 99,5%.
- Kit para la cuantificación de proteínas empleando ácido cicinconínico (BCA) de *Thermo Scientific*. Producto #23227.
- Ácido bórico. Pureza de 99,5%.
- Ácido sulfúrico concentrado. Pureza de 95-97%.
- Catalizador para digestión de proteína (KSO₄– CuSO₄).
- Rojo de metilo.
- Verde de bromocresol.

3.7.4. Herramientas

- *ImageJ* 1.38X del *National Institute of Health*, Estados Unidos.

- *Microsoft Office Excel* de la suite ofimática *Microsoft Office 2007* (*Microsoft Corporation*. Redmond, WA, Estados Unidos).
- *Primer of Biostatistics*. Versión 3.01, desarrollado por Stanton A. Glantz (Copyright < C >, McGraw-Hill, Inc, 1992).
- SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versión 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, Estados Unidos). 2006.
- *SigmaPlot* versión 10.0. *Systat Software, Inc.*

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de grupos de proteínas presentes en las hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*)

Con respecto al volumen obtenido de cada una de las muestras de extractos de proteínas a las diferentes condiciones de extracción evaluadas, aunque en 31 de las 54 muestras evaluadas, el volumen medido de las primeras réplicas (muestras denotadas como 1 de la tabla 3.3) fue mayor que el volumen medido de las segundas réplicas (muestras denotadas como 2 de la tabla 3.3), el porcentaje de muestras con mayor volumen medido en la primera réplica (57,41%) no fue significativamente diferente del porcentaje de muestras con mayor volumen en la segunda réplica (40,74%, 22 de 54 muestras) ($z = 1,540$; $p = 0,124$).

Además, al contrastar si el promedio de las diferencias entre los volúmenes de ambas réplicas era diferente de cero (prueba de la *t* de *Student* para muestras dependientes o datos pareados), se encontró que esta diferencia no era estadísticamente significativa ($t = 0,100$; $p > 0,20$), es decir, que el volumen de las primeras réplicas no era significativamente diferente del volumen de las segundas réplicas.

Para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el volumen de extracto medido, se procedió al análisis por separado de cada una de ellas. En la tabla 4.1 se muestran los promedios de los volúmenes de extracto medido para las diferentes condiciones de extracción.

Al comparar los volúmenes en función del tiempo de agitación, para la relación de harina/volumen de solvente de 1:10 y 1 carga de solvente (tabla 4.1), el análisis de varianza para un solo factor no mostró diferencia significativa entre los promedios de los volúmenes medidos después de 1, 2 ó 3 horas de agitación ($F = 1,31$; $p = 0,336$); tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se usaron 2 cargas de solvente ($F = 0,15$; $p = 0,865$). En el caso de 3 cargas no se pudo realizar la prueba estadística, porque se contaba sólo con valores individuales y no con promedios y sus desviaciones estándar; sin embargo, observando los valores de la tabla 4.1, se encontró que las diferencias en los volúmenes medidos no fueron muy grandes y que no hubo una tendencia definida para los datos.

Tabla 4.1. Promedio de volúmenes (ml) de extracto medidos para las diferentes condiciones de extracción.

Relación de dilución	Tiempo de agitación	Número de cargas	Volumen	Relación de dilución	Tiempo de agitación	Número de cargas	Volumen	Relación de dilución	Tiempo de agitación	Número de cargas	Volumen
1:10	1h	1c	4,72±0,29 [†]	1:12	1h	1c	6,92±2,32 [†]	1:15	1h	1c	9,27±0,19 [†]
1:10	1h	2c	9,00±0,42 ^{††}	1:12	1h	2c	11,30±0,28 ^{††}	1:15	1h	2c	12,53±1,24 ^{††}
1:10	1h	3c	8,80 ^{†††}	1:12	1h	3c	10,80 ^{†††}	1:15	1h	3c	14,10 ^{†††}
1:10	2h	1c	4,53±0,35 [†]	1:12	2h	1c	6,00±0,38 [†]	1:15	2h	1c	9,1±0,53 [†]
1:10	2h	2c	8,75±0,99 ^{††}	1:12	2h	2c	11,40±0,42 ^{††}	1:15	2h	2c	14,25±0,35 ^{††}
1:10	2h	3c	10,20 ^{†††}	1:12	2h	3c	12,1 ^{†††}	1:15	2h	3c	14,90 ^{†††}
1:10	3h	1c	4,23±0,46 [†]	1:12	3h	1c	8,22±2,50 [†]	1:15	3h	1c	9,87±0,19 [†]
1:10	3h	2c	9,10±0,35 ^{††}	1:12	3h	2c	11,55±0,92 ^{††}	1:15	3h	2c	13,75±0,49 ^{††}
1:10	3h	3c	9,85 ^{†††}	1:12	3h	3c	11,30 ^{†††}	1:15	3h	3c	14,70 ^{†††}

En la tabla se muestran los valores promedio y las desviaciones estándar cuando aplica. Para n = 1 no existe un valor promedio. † n = 3; †† n = 2; ††† n = 1.

Para la relación de harina/volumen de solvente de 1:12 y 1 carga de solvente (tabla 4.1), el análisis de varianza para un solo factor no mostró diferencia significativa entre los promedios de los volúmenes medidos después de 1, 2 ó 3 horas de agitación ($F = 0,95$; $p = 0,438$); tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se usaron 2 cargas de solvente ($F = 0,09$; $p = 0,920$). En el caso de 3 cargas, no se pudo realizar la prueba estadística, porque se contaba sólo con valores individuales y no con promedios y sus desviaciones estándar, sin embargo, al observar los valores de la tabla 4.1, se encontró que las diferencias en los volúmenes medidos no fueron muy grandes y no exhibieron una tendencia definida para los datos.

Para la relación de harina/volumen de solvente de 1:15 y 1 carga de solvente (tabla 4.1), el análisis de varianza para un solo factor, no mostró diferencia significativa entre los promedios de los volúmenes medidos después de 1, 2 ó 3 horas de agitación ($F = 4,59$; $p = 0,062$); tampoco se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se usaron 2 cargas de solvente ($F = 2,47$; $p = 0,232$). En el caso de 3 cargas, tampoco se pudo realizar la prueba estadística, porque se contaba sólo con valores individuales y no con promedios y sus desviaciones estándar. No obstante, observando los valores de la tabla 4.1 se encontró que las diferencias en los volúmenes medidos no fueron muy grandes, ni mostraron una tendencia definida para los datos.

Por lo antes expuesto, no hubo diferencia significativa en los volúmenes medidos de extractos debido al tiempo de agitación en cualquiera de las condiciones de relación harina/solvente y de cargas de solvente. En la tabla 4.2 se resumen los resultados de los análisis de varianza de un solo factor antes mencionados.

Tabla 4.2. Análisis de varianza para un solo factor. Variación del volumen medido en función del tiempo de agitación, para los tres niveles de dilución evaluados.

Relación masa/volumen 1:10				
	1h	2h	3h	Análisis de varianza
1 c	4,72 ± 0,29	4,53 ± 0,35	4,23 ± 0,46	F = 1,31; p = 0,336
2 c	9,00 ± 0,42	8,75 ± 0,99	9,10 ± 0,35	F = 0,15; p = 0,865
Relación masa/volumen 1:12				
1c	6,92 ± 2,32	6,00 ± 0,38	8,22 ± 2,50	F = 0,95; p = 0,438
2c	11,30 ± 0,28	11,40 ± 0,42	11,55 ± 0,92	F = 0,09; p = 0,920
Relación masa/volumen 1:15				
1c	9,27 ± 0,19	9,05 ± 0,53	9,87 ± 0,19	F = 4,59; p = 0,062
2c	12,53 ± 1,24	14,25 ± 0,35	13,75 ± 0,49	F = 2,47; p = 0,232

Dado lo anterior, en la tabla 4.3, se muestran los promedios de volumen medido sin tomar en cuenta el tiempo de agitación.

Tabla 4.3. Promedio de volúmenes (ml) de extracto medidos para las condiciones de extracción relación masa de harina/volumen de solvente y de cargas de solvente.

Relación de dilución	Número de cargas	Volumen promedio (ml)
1:10	1c	4,49±0,39 [†]
1:10	2c	8,95±0,53 ^{††}
1:10	3c	9,62±0,73 ^{†††}
1:12	1c	7,04±1,97 [†]
1:12	2c	11,42±0,48 ^{††}
1:12	3c	11,40±0,66 ^{†††}
1:15	1c	9,39±0,47 [†]
1:15	2c	13,51±1,01 ^{††}
1:15	3c	14,57±0,42 ^{†††}

En la tabla se muestran los valores promedio y la desviación estándar cuando aplica. [†] n = 9; ^{††} n = 6; ^{†††} n = 3.

Para la relación de masa de harina/volumen de solvente de 1:10 (tabla 4.3), al comparar el efecto del número de cargas de solvente, el análisis de varianza para un solo factor mostró diferencia significativa entre los promedios de los volúmenes medidos ($F = 202,60$; $p < 0,0005$). Igualmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto del número de cargas de solvente en las relaciones de masa de harina/volumen de solvente 1:12 ($F = 19,52$; $p < 0,0005$) y 1:15 ($F = 95,87$; $p < 0,0005$).

Al realizar la prueba de la t de *Student* para muestras independientes se pudo determinar cuáles comparaciones, entre los volúmenes medidos para las diferentes cargas de solvente, eran significativamente distintas entre sí. En las tablas 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran los valores de la t de *Student* y de la significancia entre los diferentes

pares de promedios de volumen medido por efecto del número de cargas en la relación de masa de harina/volumen de solvente 1:10, 1:12 y 1:15. Se encontró que los promedios de volúmenes medidos fueron significativamente mayores para 2 y 3 cargas respecto a 1 carga y que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre 2 y 3 cargas, en todas las diluciones empleadas.

Tabla 4.4. Prueba de la t de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:10.

Número de cargas de solvente	1c	2c	3c
1c	-	t = 18,845 p < 0,0005	t = 16,106 p < 0,0005
2c	-	-	t = 1,596 p = 0,155
3c	-	-	-

Tabla 4.5. Prueba de la t de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:12.

Número de cargas de solvente	1c	2c	3c
1c	-	t = 5,280 p < 0,0005	t = 3,661 p < 0,0005
2c	-	-	t = 1,596 p = 0,960
3c	-	-	-

Tabla 4.6. Prueba de la t de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto del número de cargas de solvente para la relación masa de harina/volumen de solvente 1:15.

Número de cargas de solvente	1c	2c	3c
1c	-	t = 10,765 p < 0,0005	t = 16,875 p < 0,0005
2c	-	-	t = 1,698 p = 0,133
3c	-	-	-

También se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando, en la tabla 4.3, se compararon los efectos de la relación masa de harina/volumen de solvente, para las diferentes cargas de solventes (1, 2 ó 3). De acuerdo con el análisis de la varianza de un factor, los valores de F y de probabilidad para las diferentes cargas de solvente fueron: 1 carga (F = 38,12; p < 0,0005), 2 cargas (F = 61,24; p < 0,0005) y 3 cargas (F = 49,42; p < 0,0005).

Aplicando la prueba de la t de *Student* para muestras independientes, se pudo determinar cuáles comparaciones, entre los promedios de los volúmenes medidos para las diferentes relaciones masa de harina/volumen de solvente, eran significativamente distintas entre sí. En las tablas 4.7, 4.8 y 4.9 se muestran los valores de la t de *Student* y de la significancia entre los diferentes pares de promedios de los volúmenes medidos por efecto de la relación de dilución en las diferentes cargas de solvente. Se encontró que los volúmenes medidos fueron significativamente mayores para las relaciones 1:12 y 1:15 respecto a la relación 1:10 en todas las cargas empleadas y, también, los volúmenes medidos fueron significativamente mayores para la relación 1:15 respecto a la relación 1:12, en todas las cargas empleadas.

Tabla 4.7. Prueba de la *t* de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para una carga de solvente.

Relación masa de harina/volumen de solvente	1:10	1:12	1:15
1:10	-	t = 3,809 p = 0,002	t = 24,069 p < 0,0005
1:12	-	-	t = 3,481 p = 0,003
1:15	-	-	-

Tabla 4.8. Prueba de la *t* de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para dos cargas de solvente.

Relación masa de harina/volumen de solvente	1:10	1:12	1:15
1:10	-	t = 8,461 p < 0,0005	t = 9,793 p < 0,0005
1:12	-	-	t = 4,578 p < 0,0005
1:15	-	-	-

Tabla 4.9. Prueba de la *t* de *Student* para muestras independientes. Comparación del efecto de la relación masa de harina/volumen de solvente para tres cargas de solvente.

Relación masa de harina/volumen de solvente	1:10	1:12	1:15
1:10	-	t = 3,133 p = 0,035	t = 10,180 p < 0,0005
1:12	-	-	t = 7,018 p = 0,002
1:15	-	-	-

Los resultados (tabla 4.3) muestran que hubo una retención importante de líquido por absorción en la harina, después de la primera carga de solvente y para cualquiera de las tres relaciones de masa de harina/volumen de solvente. La retención de líquido fue, en promedio, de 5,51 ml (55%) para la relación 1:10, de 4,96 ml (41%) para la relación 1:12 y de 5,61 ml (37%) para la relación 1:15. Estos valores se obtuvieron de restar del volumen de solvente añadido (10, 12 ó 15 ml), los valores promedio de la tabla 4.3. A pesar de lo antes descrito, en este trabajo no se compensó la retención por absorción de líquido en las muestras, por lo que se volvió a agregar el mismo volumen de solvente fresco en las subsiguientes cargas de solvente en las tres diferentes relaciones de masa de harina/volumen de solvente.

Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida–SDS fue posible visualizar las bandas correspondientes a las proteínas presentes, tanto en los extractos con NaOH al 0,2% m/v, como en el extracto con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v ditioneitol (DTT) y en la resuspensión del precipitado obtenido con 10% m/v ácido tricloroacético (TCA) – 0,2% DTT en acetona fría.

En la figura 4.1 se muestra el gel 1 en el cual se realizó la electroforesis de las muestras S4, S6 y S8, correspondientes a los extractos con NaOH. En dicho gel, se tiñeron o revelaron con nitidez cinco de las doce bandas que conforman el marcador molecular de *BioLabs* (izquierda), incluidas las correspondientes a la albúmina sérica (BSA) y a la triosafosfato isomerasa TPI, las cuales sirvieron de puntos de referencia. Con respecto al marcador molecular de *Promega* (derecha), se revelaron con nitidez seis de las nueve bandas que lo constituyen, incluida la correspondiente a 50 kDa, la cual sirvió de punto de referencia.

De las muestras corridas en el gel, sólo se revelaron con nitidez las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular (por encima de los 75 y 100 kDa,

de acuerdo los marcadores de peso molecular), mientras que en la zona por debajo de los 66,4 kDa no se obtuvo una buena definición, observándose una mancha continua que se hizo más intensa en la parte baja del gel.

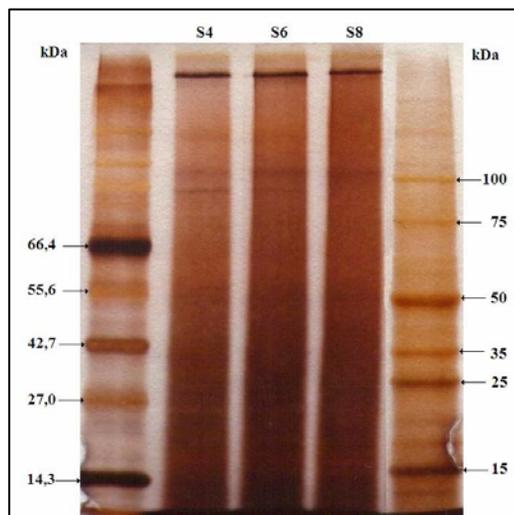


Figura 4.1. Gel 1. Proteínas en extractos con NaOH 0,2% m/v en gel de poliacrilamida-SDS al 10% m/v. El gel fue teñido con plata. Los pesos moleculares de las proteínas del marcador molecular de BioLabs se muestran en el extremo izquierdo y los del marcador de Promega en el extremo derecho. Las muestras cargadas son S4, S6 y S8.

En el gel 1 (figura 4.1) se observó, para las tres muestras (S4, S6 y S8), una banda intensa en la parte superior cuyo peso molecular está muy por encima de los 100 kDa, incluso estaría por encima de los 200 kDa, considerando que se encuentran al nivel donde se observan ciertas bandas difusas de los marcadores moleculares, que corresponderían a un peso molecular de ese orden de magnitud.

Debido a la interferencia causada por la coloración marrón claro observada en los carriles de las muestras, se empleó el programa *ImageJ* para analizar la imagen

del gel y así identificar bandas de proteínas presentes en las muestras corridas. Posiblemente, la coloración observada en los carriles de las muestras sea producto de sustancias que fueron extraídas junto con las proteínas y que reaccionaron con el tinte, puesto que éste es sensible a la presencia de otras sustancias, no sólo a la de proteínas. Otra posible explicación, es que fuera producto de la degradación de las proteínas por efecto del NaOH (hidrólisis básica), lo que explicaría la tonalidad más oscura por debajo de los 15 kDa, pudiéndose tratar de fragmentos de proteínas de bajo peso molecular.

En la figura 4.2 se muestra el resultado del análisis del gel 1 mediante la herramienta “análisis de gel” de *ImageJ*. En este caso, se analizaron segmentos (recuadros azules) de los carriles correspondientes al marcador molecular de *BioLabs* (MM1), a la muestra S4 y al marcador molecular de *Promega* (MM2). Sólo se muestra el análisis realizado a la muestra S4 por ser la que dio un mejor resultado en cuanto al perfil de la densidad óptica. La imagen del gel 1 fue analizada en posición horizontal para facilitar la comparación del perfil de densidad óptica obtenido con las bandas de proteínas reveladas en el gel.

En el perfil de la muestra S4, se distinguen con claridad cuatro picos enumerados de derecha a izquierda, es decir, en forma descendiente con respecto al peso molecular. Al contrastar el perfil obtenido con la imagen del gel, se observó que los picos corresponden a bandas de proteínas claramente reveladas en el mismo. El número 1 corresponde a la banda de proteína de peso molecular superior a los 200 kDa y los números 2, 3 y 4 a bandas de proteínas alrededor de los 100 kDa, siendo la número 3 la más cercana a dicho peso molecular. Las bandas de proteínas identificadas con los números 2, 3 y 4 estarían en menor proporción con respecto a la identificada con el número 1 por tener un área bajo la curva inferior a la de ésta. Más allá de los cuatro picos claramente definidos no fue posible precisar la presencia de otras bandas de proteínas.

En la figura 4.3 se muestra la imagen del gel 1 al ser analizado mediante la herramienta “análisis de gel” de *ImageJ* previa modificación de la imagen, al aplicar un filtro que sólo muestra el componente azul de ésta. La modificación realizada permitió mejorar la resolución de la imagen en la parte baja del gel (por debajo de los 42,7 kDa), eliminando parte de la interferencia causada por la coloración marrón observada en el gel original.

Se identificaron seis bandas de proteínas más allá de las cuatro identificadas previamente, puesto que se mejoró la diferenciación en los picos presentes en el rango de pesos moleculares de 42,7 a 15 kDa. Las bandas de proteínas señaladas con los números 5 y 6 corresponden a pesos moleculares alrededor de los 40 y 30 kDa, respectivamente. La banda de proteína 10 corresponde a un peso molecular cercano a los 15 kDa y las bandas de proteínas 7, 8 y 9 corresponden a pesos moleculares alrededor de los 20 kDa; sin embargo, no se puede definir con mayor exactitud el peso molecular de éstas puesto que los marcadores moleculares empleados no presentan bandas definidas dentro de ese orden de magnitud.

El análisis de densidad óptica es una herramienta confiable para la identificación de bandas de proteínas en los geles analizados y es capaz de identificar bandas que el investigador no puede distinguir a simple vista. En el caso del gel 1, permitió identificar las bandas de proteínas que en las figuras 4.1 y 4.2 se observan como leves cambios en la tonalidad de la coloración marrón observada en la región por debajo de los 27,0 kDa.

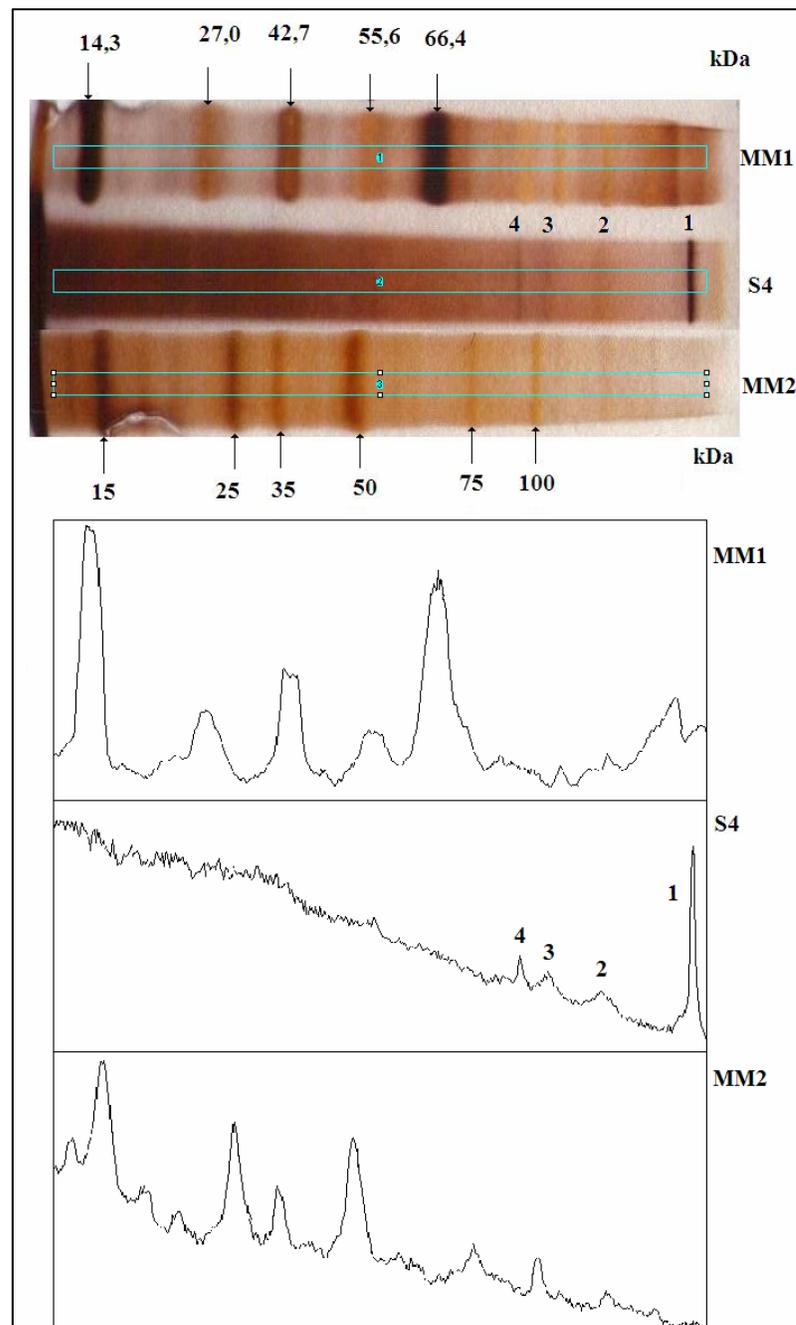


Figura 4.2. Gel 1 analizado mediante la herramienta “análisis de geles” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra S4 y al marcador molecular de Promega (MM2).

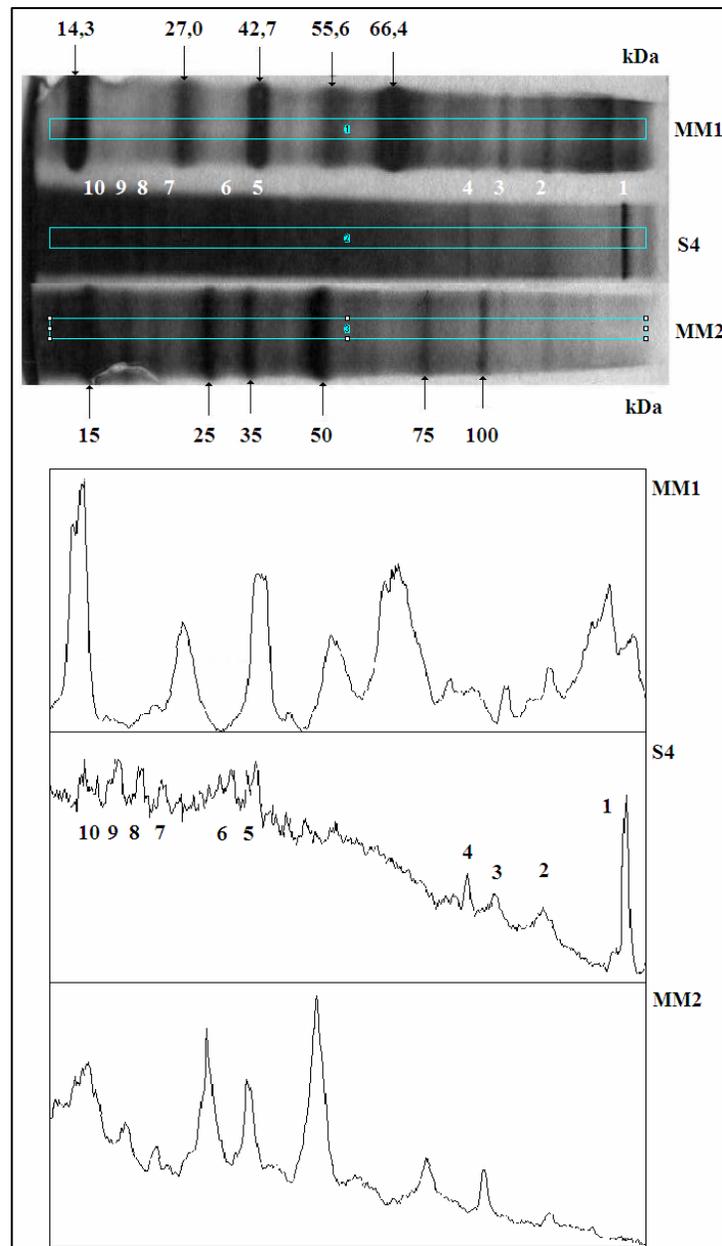


Figura 4.3. Gel 1 modificado con filtro de imagen que muestra sólo el componente azul y analizado mediante la herramienta “análisis de gels” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra S4 y al marcador molecular de Promega (MM2).

En la figura 4.4 se muestra el gel 2, teñido con plata, en el cual se encuentran las muestras A, B y C, correspondientes a los protocolos alternativos de extracción de proteínas, empleando como solvente extrayente el tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% m/v DTT y como agente precipitante una solución 10% m/v TCA – 0,2% m/v DTT en acetona fría.

En el gel 2 (figura 4.4) se reveló con nitidez las mismas bandas presentes en el gel 1 para los marcadores moleculares *BioLabs* y de *Promega*.

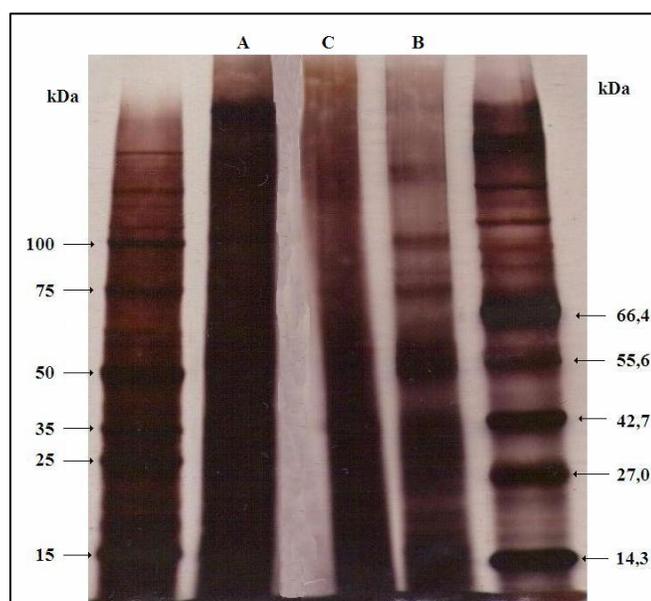


Figura 4.4. Gel 2. Proteínas en extractos con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,3) – EDTA.Na₂ 5 mM – KCl 100 mM – 1% DTT y en resuspensiones luego de precipitar con solución 10% TCA – 0,2% DTT en acetona fría, en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel fue teñido con plata. Los pesos moleculares de las proteínas del marcador molecular de Promega se muestran en el extremo izquierdo y los del marcador de BioLabs en el extremo derecho. Las muestras cargadas fueron A, B y C.

A simple vista fue posible distinguir en la muestra B diferentes grupos de bandas de proteínas. Se observaron bandas de proteínas por encima de los 75 kDa, un grupo alrededor de los 50 kDa, otro grupo entre 27,0 y 42,7 kDa y un último grupo cercano a los 15 kDa.

Puesto que la muestra B fue la que se reveló con mayor detalle, con respecto a las muestras A y C, ésta se seleccionó para realizar el análisis de gel empleando el programa ImageJ. La muestra B es representativa de la muestra A puesto que proviene de hacer precipitar las proteínas presentes en la muestra A; sin embargo, en la muestra A se observa una banda de proteína oscura de peso molecular superior a los 200 kDa, que coincidiría con la identificada en el gel 1 para las muestras S4, S6 y S8, que no está presente en la muestra B. El resultado obtenido se muestra en la figura 4.5.

En el perfil de densidad óptica de la muestra B se distinguen claramente seis picos que corresponden a bandas de proteínas (señalados con los números del 1 al 6), una zona amplia de picos poco diferenciados entre sí que correspondería a un grupo de bandas de proteínas poco diferenciadas entre sí (señalada con el número 7) y por último, tres picos correspondientes a tres bandas de proteínas (señalados con los números del 8 al 10). Al contrastar el perfil de densidad óptica con la imagen del gel 2 se observó que los picos coincidían con bandas presentes en dicho gel.

La banda de proteína 1 corresponde a un peso molecular superior a los 100 kDa y la banda de proteína 2 a un peso molecular ligeramente superior a los 100 kDa. Las bandas de proteínas 3 y 4 corresponden a pesos moleculares cercanos a los 80 y 75 kDa (la banda 4 está al nivel de los 75 kDa), respectivamente y las bandas de proteínas 5 y 6 corresponden a pesos moleculares alrededor de los 60 y 50 kDa, respectivamente. La zona señalada como 7 corresponde a un área amplia del gel, entre 20 y 40 kDa, en la cual no se pudo distinguir cuántas bandas de proteínas

estaban presentes. Las últimas tres bandas identificadas (8, 9 y 10) corresponden a pesos moleculares entre 14 y 20 kDa.

No se realizó una modificación posterior de la imagen del gel 2 como se hizo para el gel 1, puesto que al aplicar los filtros de imagen no se logró mejorar la resolución del mismo.

De los análisis realizados, se obtuvo que en los extractos de proteínas de harina de hojas de amaranto hay una mayor presencia de proteínas con pesos moleculares entre los 50 y 15 kDa (identificándose hasta seis bandas de proteínas correspondientes a ese rango de pesos moleculares) y sólo unas pocas de peso molecular cercano o por encima a los 100 kDa (una banda por encima de los 200 kDa y tres bandas alrededor de los 100 kDa, de los cuales una está al nivel de 100 kDa (gel 1) y las otras dos se encuentran por encima y por debajo de dicho valor (gel 1 y 2). La mayoría de las bandas de proteínas identificadas corresponden a pesos moleculares entre 30 y 15 kDa, identificándose en dicha zona cuatro bandas de proteínas en el gel 1 y tres bandas de proteínas en el gel 2.

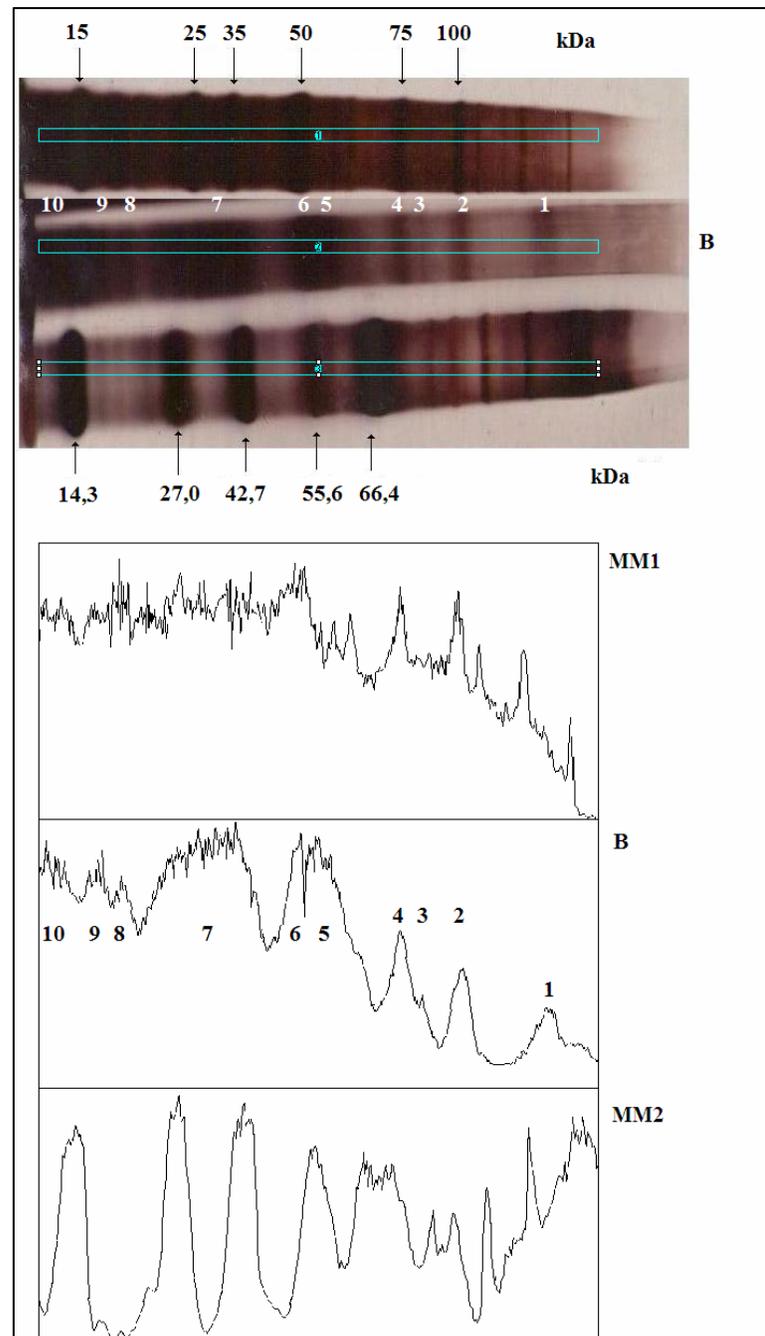


Figura 4.5. Gel 2 analizado mediante la herramienta “análisis de geles” de ImageJ. Se muestra la densidad óptica de los carriles correspondientes al marcador molecular de BioLabs (MM1), a la muestra B y al marcador molecular de Promega (MM2).

La presencia de un mayor número de bandas de proteínas de bajo peso molecular (por debajo de los 30 kDa) puede ser explicada, en el caso de las identificadas en el gel 1 (figura 4.3), por una posible acción de hidrólisis básica de las proteínas por acción del NaOH empleado como solvente, es decir, que las bandas corresponderían a fragmentos de proteínas que originalmente eran de mayor peso molecular. En el caso de las identificadas en el gel 2 (figura 4.5), las bandas pudieran corresponder a fragmentos de proteínas de mayor peso molecular producto del desdoblamiento de las moléculas de proteínas ocasionado por el uso de DTT, ya que éste es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro presentes en las proteínas. Un análisis detallado de la composición química de los extractos obtenidos permitiría discernir si tales bandas corresponden a proteínas completas o a fragmentos de otras de mayor peso molecular.

Aún cuando al emplear la herramienta “análisis de geles” del programa ImageJ se lograron identificar bandas de proteínas que inicialmente no fueron identificadas, es posible que algunas bandas no se hayan identificado producto de la interferencia causada por la coloración marrón que aparece en todas las bandas de muestras corridas en los geles. Un proceso de diálisis de las muestras contra un tampón adecuado, inmediatamente después de la extracción, podría disminuir el efecto de oscurecimiento y facilitar la identificación de las bandas de proteínas. Por tratarse de extractos provenientes de material foliar, es posible que no sólo estén presentes las proteínas que éstas contienen, sino también pigmentos y otros compuestos (sustancias intracelulares, entre otras) que causen interferencias.

En el anexo C se muestran otros geles realizados para la identificación de proteínas en extractos obtenidos con NaOH al 0,2% m/v partiendo de harina de hojas secas de amaranto.

4.2. Cuantificación de las proteínas presentes en las hojas de amaranto (*Amaranthus dubius*) mediante el método de BCA

En la tabla 4.10 se muestran los valores de masa total de proteína obtenida en cada réplica para cada condición de extracción evaluada.

Al contrastar si el promedio de las diferencias entre la masa total de proteínas de ambas réplicas (tabla 4.10) era diferente de cero (prueba de la *t* de *Student* para muestras dependientes o datos pareados), se encontró que no era estadísticamente significativa ($t = 0,3708$; $p > 0,20$), es decir, que la masa total extraída de las primeras réplicas no era significativamente diferente de la masa total extraída de las segundas réplicas. Por lo tanto, en la tabla 4.11 se muestran los valores promedio de las masas totales extraídas en las dos réplicas de cada condición de extracción y la desviación estándar de éstos.

Según lo observado en la tabla 4.11, las condiciones en las cuales se extrajo la menor cantidad de proteínas fueron: una relación harina/solvente de 1:10, con 2h de agitación y 1 carga con solvente. Las condiciones en las cuales se extrajo la mayor cantidad de proteínas fueron: una relación harina/solvente de 1:15, con 2h de agitación y 3 cargas con solvente. En las condiciones de mayor extracción, la cantidad de masa de proteínas obtenida fue 3,67 veces mayor que en las condiciones de menor extracción.

Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2%.

Condición de extracción*	Cargas solvente fresco	Código de muestra		Concentración (µg/ml)		Masa de proteína (g)		Masa total de proteína (g)	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1:10, 1h	1	S27	S28	0,00914	0,0101	0,048	0,049	0,048	0,049
1:10, 1h	1	S35	S36	0,00959	0,0110	0,047	0,047	0,076	0,079
	2	S37	S38	0,00336	0,00365	0,029	0,032		
1:10, 1h	1	S39	S40	0,00943	0,0106	0,045	0,045	0,102	0,092
	2	S41	S42	0,00400	0,00374	0,0416	0,031		
	3	S43	S44	0,00170	0,00184	0,015	0,016		
1:10, 2h	1	S23	S24	0,00961	0,00891	0,043	0,034	0,043	0,034
1:10, 2h	1	S79	S80	0,0128	0,0138	0,058	0,065	0,125	0,106
	2	S81	S82	0,00624	0,00506	0,0674	0,041		
1:10, 2h	1	S83	S84	0,0123	0,0137	0,059	0,067	0,121	0,134
	2	S85	S86	0,00506	0,00514	0,042	0,040		
	3	S87	S88	0,00205	0,00254	0,020	0,0274		
1:10, 3h	1	S25	S26	0,0101	0,0104	0,045	0,038	0,045	0,038
1:10, 3h	1	S95	S96	0,011	0,011	0,053	0,047	0,089	0,088
	2	S97	S98	0,00404	0,00475	0,036	0,041		
1:10, 3h	1	S61	S115	0,01070	0,00993	0,035	0,044	0,098	0,104
	2	S63	S116	0,00447	0,00415	0,044	0,037		
	3	S65	S117	0,00195	0,00231	0,019	0,023		

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2% (Continuación).

Condición de extracción*	Cargas solvente fresco	Código de muestra		Concentración (µg/ml)		Masa de proteína (g)		Masa total de proteína (g)	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1:12, 1h	1	S4	S5	0,011	0,00690	0,058	0,033	0,058	0,033
1:12, 1h	1	S10	S11	0,00638	0,00611	0,062	0,057	0,091	0,092
	2	S12	S13	0,00269	0,00308	0,0291	0,0351		
1:12, 1h	1	S14	S15	0,00752	0,00798	0,051	0,045	0,110	0,100
	2	S16	S17	0,00373	0,00355	0,0440	0,0398		
	3	S18	S19	0,00141	0,00142	0,0149	0,0156		
1:12, 2h	1	S6	S7	0,00710	0,00743	0,043	0,039	0,043	0,039
1:12, 2h	1	S107	S108	0,00858	0,00881	0,051	0,059	0,091	0,099
	2	S109	S110	0,00358	0,00360	0,0401	0,0396		
1:12, 2h	1	S55	S56	0,00942	0,00967	0,061	0,054	0,118	0,125
	2	S57	S58	0,00338	0,00409	0,0385	0,0491		
	3	S59	S60	0,00155	0,00176	0,0180	0,0222		
1:12, 3h	1	S8	S9	0,00631	0,00644	0,0719	0,0696	0,0719	0,0696
1:12, 3h	1	S99	S100	0,00809	0,00976	0,053	0,068	0,096	0,120
	2	S101	S102	0,00374	0,00406	0,0434	0,0520		
1:12, 3h	1	S67	S68	0,00829	0,00831	0,058	0,055	0,103	0,129
	2	S69	S70	0,00315	0,00451	0,0315	0,0532		
	3	S71	S72	0,00120	0,00180	0,0130	0,0212		

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Tabla 4.10. Concentración de proteína y masa de proteína presente en extractos con NaOH al 0,2% (Continuación).

Condición de extracción*	Cargas solvente fresco	Código de muestra		Concentración (µg/ml)		Masa de proteína (g)		Masa total de proteína (g)	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1:15, 1h	1	S33	S34	0,00562	0,00629	0,054	0,057	0,054	0,057
1:15, 1h	1	S45	S46	0,00786	0,00773	0,077	0,070	0,109	0,102
	2	S47	S48	0,00249	0,00232	0,324	0,0320		
1:15, 1h	1	S49	S50	0,00779	0,00802	0,074	0,069	0,110	0,120
	2	S51	S52	0,00263	0,00253	0,024	0,0354		
	3	S53	S54	0,000915	0,00106	0,0124	0,0155		
1:15, 2h	1	S31	S32	0,00647	0,00716	0,063	0,068	0,063	0,068
1:15, 2h	1	S111	S112	0,00657	0,00663	0,059	0,054	0,094	0,092
	2	S113	S114	0,00246	0,00263	0,0354	0,0384		
1:15, 2h	1	S89	S90	0,00950	0,00937	0,088	0,082	0,142	0,143
	2	S91	S92	0,00269	0,00287	0,0377	0,0402		
	3	S93	S94	0,00110	0,00143	0,0165	0,0212		
1:15, 3h	1	S29	S30	0,00730	0,00745	0,0774	0,070	0,0774	0,070
1:15, 3h	1	S103	S104	0,00803	0,00721	0,079	0,068	0,108	0,102
	2	S105	S106	0,00221	0,00247	0,0292	0,0336		
1:15, 3h	1	S73	S74	0,00846	0,0825	0,079	0,0875	0,128	0,153
	2	S75	S76	0,00233	0,00300	0,0312	0,0444		
	3	S77	S78	0,00119	0,00144	0,0176	0,0210		

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15) y al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h).

Tabla 4.11. Promedio de masas totales extraídas para las diferentes condiciones de extracción.

Relación de dilución	Tiempo de agitación	Número de cargas	Masa total de proteína extraída (g)
1:10	1h	1c	0,049±0,001
1:10	1h	2c	0,078±0,002
1:10	1h	3c	0,097±0,007
1:10	2h	1c	0,039±0,006
1:10	2h	2c	0,116±0,013
1:10	2h	3c	0,128±0,009
1:10	3h	1c	0,042±0,005
1:10	3h	2c	0,089±0,001
1:10	3h	3c	0,101±0,004
1:12	1h	1c	0,046±0,018
1:12	1h	2c	0,092±0,001
1:12	1h	3c	0,105±0,007
1:12	2h	1c	0,041±0,003
1:12	2h	2c	0,095±0,006
1:12	2h	3c	0,122±0,005
1:12	3h	1c	0,071±0,002
1:12	3h	2c	0,108±0,017
1:12	3h	3c	0,116±0,018
1:15	1h	1c	0,056±0,002
1:15	1h	2c	0,106±0,005
1:15	1h	3c	0,115±0,007
1:15	2h	1c	0,066±0,004
1:15	2h	2c	0,093±0,001
1:15	2h	3c	0,143±0,001
1:15	3h	1c	0,074±0,005
1:15	3h	2c	0,105±0,004
1:15	3h	3c	0,141±0,018

En la tabla se muestran los valores promedio y la desviación estándar para las dos réplicas de cada condición de extracción.

Aunque en las tres condiciones (factores) de extracción hubo un incremento en la masa de proteínas extraída al aumentar la dilución, el tiempo de agitación y las cargas de solvente, el análisis de varianza de un solo factor indicó que sólo hubo un aumento estadísticamente significativo para las cargas de solvente (tabla 4.12).

En la tabla 4.13 se muestran los valores del estadístico *t* al aplicar la prueba de *t* de Student para el caso del número de cargas de solvente. Ésta indicó que hubo un aumento significativo de masa de proteínas extraída con dos cargas de solvente respecto a una carga de solvente. También, cuando se emplearon tres cargas de solvente la masa de proteínas extraída fue significativamente mayor que cuando se emplearon una o dos cargas de solvente.

Para una evaluación más detallada de la influencia de las diferentes condiciones de extracción se puede emplear un análisis de varianza factorial, por cuanto, los datos que se tienen, proceden de un diseño experimental de tres factores con tres niveles cada uno. Tal análisis, excepto por eventuales errores de redondeo, tendrá igual resultado que el análisis estadístico que se mostrará posteriormente, en la evaluación y comparación de las condiciones de extracción sobre el rendimiento de la extracción de las proteínas totales de la harina de hojas de amaranto.

Tabla 4.12. Efecto de las condiciones de extracción sobre la masa total de proteína extraída.

Factor y niveles del factor	Promedio de masa extraída (g)	DE	Análisis de varianza
Dilución			
1:10	0,0817	0,0326	F= 0,77 p = 0,476
1:12	0,0883	0,0295	
1:15	0,0996	0,0309	
Tiempo			
1h	0,0823	0,0266	F= 0,39 p = 0,683
2h	0,0933	0,0377	
3h	0,0939	0,0291	
Número de cargas			
1c	0,0534	0,0135	F= 50,91 p < 0,0005
2c	0,0977	0,0117	
3c	0,1184	0,0163	

Tabla 4.13. Prueba de la t de Student para muestras independientes. Efecto del número de cargas sobre la masa total de proteína extraída.

Cargas de solvente	1c	2c	3c
1c	-	t = 7,321 p < 0,0005	t = 9,172 p < 0,0005
2c	-	-	t = 3,000 p = 0,008
3c	-	-	-

El contenido de proteína cruda en base seca de la harina de hoja de amaranto empleada en los distintos ensayos de extracción, determinado mediante el método de Kjeldahl, para tres muestras de ésta fue de 29,75; 30,69 y 28,81%, respectivamente. Por lo tanto, el contenido promedio de proteína cruda de la harina fue de $29,75 \pm 0,94\%$.

Al comparar este promedio con el valor promedio referido por Acevedo y col. (2007) igual a $25,44 \pm 2,81\%$ ($n = 3$) en base seca, el porcentaje de extracción de acuerdo con esta referencia bibliográfica sería, en promedio, 1,17 veces mayor. Sin embargo, se encontró que la diferencia no fue estadísticamente significativa ($z = 0,795$, $p = 0,42$), para la prueba de comparación de proporciones para muestras independientes (Scheffler, 1981; Glass, Stanley, 1974).

4.3. Evaluación del efecto de las variables relación masa a volumen de sólidos foliares/solvente, número de cargas con solvente fresco y tiempo de agitación, sobre el rendimiento de la extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius*

En la tabla 4.14 se muestran los valores de rendimiento de la extracción de proteínas totales, considerando el valor de nitrógeno orgánico presente en una muestra perteneciente al lote de harina que se empleó para los análisis previos. En la tabla 4.15 se muestran los valores de rendimiento de la extracción de proteínas totales que se obtuvieron, considerando el valor promedio de nitrógeno presente en tres muestras de hojas de amaranto, referido en Acevedo y col. (2007).

Por lo descrito anteriormente con respecto al contenido de masa cruda de la harina de hoja de amaranto, los resultados de determinación del rendimiento de extracción y el efecto sobre este rendimiento, de las diversas condiciones de

extracción empleadas, no serán estadísticamente diferentes al emplear uno u otro valor de proteína cruda.

Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75%.

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:10, 1h, 1c	18	18	18	0,3
1:10, 2h, 1c	16	13	14	2,3
1:10, 3h, 1c	17	14	15	1,8
1:10, 1h, 2c	28	29	28	0,8
1:10, 2h, 2c	46	39	43	5,0
1:10, 3h, 2c	33	32	33	0,3
1:10, 1h, 3c	37	34	36	2,5
1:10, 2h, 3c	44	49	47	3,5
1:10, 3h, 3c	36	38	37	1,6

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar.

Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75% (Continuación).

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:12, 1h, 1c	21	12	17	6,5
1:12, 2h, 1c	16	14	15	1,0
1:12, 3h, 1c	26	26	26	0,6
1:12, 1h, 2c	33	34	34	0,3
1:12, 2h, 2c	33	36	35	1,9
1:12, 3h, 2c	35	44	40	6,1
1:12, 1h, 3c	40	37	39	2,5
1:12, 2h, 3c	43	46	45	2,0
1:12, 3h, 3c	38	48	43	7,0

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar.

Tabla 4.14. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 29,75% (Continuación).

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:15, 1h, 1c	20	21	20	0,8
1:15, 2h, 1c	23	25	24	1,3
1:15, 3h, 1c	28	26	27	1,9
1:15, 1h, 2c	40	38	39	1,8
1:15, 2h, 2c	35	34	34	0,5
1:15, 3h, 2c	40	37	39	1,7
1:15, 1h, 3c	41	44	42	2,5
1:15, 2h, 3c	52	53	53	0,3
1:15, 3h, 3c	47	56	52	6,5

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar

Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44%.

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:10, 1h, 1c	21	21	21	0,3
1:10, 2h, 1c	19	15	17	2,7
1:10, 3h, 1c	19	16	18	2,1
1:10, 1h, 2c	33	34	33	0,9
1:10, 2h, 2c	54	46	50	5,9
1:10, 3h, 2c	38	38	38	0,3
1:10, 1h, 3c	44	40	42	2,9
1:10, 2h, 3c	52	58	55	4,1
1:10, 3h, 3c	42	45	44	1,8

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar.

Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44% (Continuación).

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:12, 1h, 1c	25	14	20	7,6
1:12, 2h, 1c	19	17	18	1,2
1:12, 3h, 1c	31	30	30	0,7
1:12, 1h, 2c	39	40	39	0,3
1:12, 2h, 2c	39	43	41	2,3
1:12, 3h, 2c	42	52	47	7,2
1:12, 1h, 3c	47	43	45	2,9
1:12, 2h, 3c	51	54	52	2,4
1:12, 3h, 3c	44	56	50	8,2

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar.

Tabla 4.15. Rendimiento de extracción de proteína total a las diferentes condiciones evaluadas, considerando un contenido de proteína cruda en la harina de hojas de amaranto igual a 25,44% (Continuación).

Condición de extracción*	Rendimiento de extracción (%)		Promedio	DE**
	1	2		
1:15, 1h, 1c	23	25	24	0,9
1:15, 2h, 1c	27	29	28	1,5
1:15, 3h, 1c	33	30	32	2,3
1:15, 1h, 2c	47	44	45	2,1
1:15, 2h, 2c	41	40	40	0,6
1:15, 3h, 2c	47	44	45	2,0
1:15, 1h, 3c	48	52	50	2,9
1:15, 2h, 3c	61	62	62	0,4
1:15, 3h, 3c	55	66	61	7,6

*Las condiciones de extracción se refieren a la relación harina de hojas de amaranto/solvente (1:10, 1:12 y 1:15), al tiempo de agitación (1, 2 y 3 h) y al número de cargas con solvente fresco (1c, 2c y 3c). ** DE: desviación estándar.

Los valores de rendimiento de extracción se analizaron mediante la prueba factorial de la varianza para modelos lineales de tres factores fijos con tres niveles. Como se mencionó anteriormente, los valores de rendimiento en la extracción no fueron significativamente diferentes cuando se realizaron los cálculos empleando como valor de proteína cruda el obtenido en este trabajo o el determinado por Acevedo y col. en 2007, por lo tanto se realizó un solo análisis factorial de la

varianza, usando como valor de proteína cruda el valor de 29,75% medido en este trabajo.

El modelo lineal general para tres factores y tres niveles (27 tratamientos), con dos réplicas por tratamiento, generado por el análisis factorial de la varianza a partir de los datos de rendimiento de extracción fue:

$$y_{ijk\tau} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijk\tau}$$

donde los valores de los coeficientes del modelo se muestran en la tabla 4.17:

Tabla 4.16. Coeficientes del modelo lineal del análisis de varianza.

$\mu = 33,019 \pm 0,416$					
α_i (Dil.)	β_j (Tiempo)	γ_k (N° cargas)	$\alpha_1\beta_j$	$\alpha_2\beta_j$	$\alpha_3\beta_j$
30,111±0,721 [†]	30,278±0,721	19,667±0,721	27,500±1,248	29,500±1,248	33,833±1,248
32,278±0,721	34,278±0,721	35,944±0,721	34,500±1,248	31,333±1,248	37,000±1,248
36,667±0,721	34,500±0,721	43,444±0,721	28,333±1,248	36,000±1,248	39,167±1,248
$\alpha_1\gamma_j$	$\alpha_2\gamma_j$	$\alpha_3\gamma_j$	$\beta_1\gamma_j$	$\beta_2\gamma_j$	$\beta_3\gamma_j$
16,000±1,248	19,167±1,248	23,833±1,248	18,333±1,248	17,833±1,248	22,833±1,248
34,500±1,248	35,833±1,248	37,500±1,248	33,667±1,248	37,167±1,248	37,000±1,248
39,833±1,248	41,833±1,248	48,667±1,248	38,833±1,248	47,833±1,248	43,667±1,248
$\alpha_1\beta_1\gamma_j$	$\alpha_1\beta_2\gamma_j$	$\alpha_1\beta_3\gamma_j$	$\alpha_2\beta_1\gamma_j$	$\alpha_2\beta_2\gamma_j$	$\alpha_2\beta_3\gamma_j$
18,000±2,162	14,500±2,162	15,500±2,162	16,500±2,162	15,000±2,162	26,000±2,162
28,500±2,162	42,500±2,162	32,500±2,162	33,500±2,162	34,500±2,162	39,500±2,162
36,000±2,162	46,500±2,162	37,000±2,162	38,500±2,162	44,500±2,162	42,500±2,162
$\alpha_3\beta_1\gamma_j$		$\alpha_3\beta_2\gamma_j$		$\alpha_3\beta_3\gamma_j$	
20,500±2,162		24,000±2,162		27,000±2,162	
39,000±2,162		34,500±2,162		39,000±2,162	
42,000±2,162		52,500±2,162		51,500±2,162	

† error estándar de los coeficientes (ε_{ijk}). α (Dil.) = dilución (relación masa/volumen), β (Tiempo) = tiempo de agitación y γ (N° cargas) = número de cargas con solvente fresco. $i = 1, 2, 3$. $j = 1, 2, 3$. $k = 1, 2, 3$.

Al llevar a cabo el análisis de varianza factorial para los datos de rendimiento de extracción (anexo I), se encontró que: a) el modelo lineal generalizado generado a partir de las variables independientes (dilución, tiempo, carga), fue capaz de explicar una parte significativa de la variación observada en la variable dependiente (rendimiento), por cuanto el nivel de probabilidad asociado al estadístico F calculado por el análisis de la varianza tuvo una $p < 0,0005$. De hecho, el coeficiente de determinación (r^2) tuvo un valor de 0,963, es decir, que el modelo era capaz de explicar 96,3% de la variabilidad de la variable dependiente; b) los efectos principales, es decir, los efectos individuales de los tres factores estudiados incidieron significativamente sobre el rendimiento de la extracción ($p < 0,0005$ en todos ellos); c) en las interacciones entre dos efectos, las interacciones dilución-tiempo ($p = 0,003$) y tiempo-carga ($p = 0,005$) tuvieron efecto significativo sobre el rendimiento de la extracción, pero la interacción dilución-carga ($p = 0,143$) no tuvo efecto significativo, es decir, no hubo interacción; y d) la interacción triple (dilución-tiempo-carga) tuvo un efecto significativo ($p < 0,023$). Lo antes descrito se resume en la tabla 4.17.

Como los análisis de varianza (estadísticos F) indicaron que los tres efectos principales tuvieron resultados significativos, se procedió a realizar un análisis *post hoc* (*a posteriori*), empleando el procedimiento de Tukey (anexo I), para conocer la naturaleza de las diferencias generadas por los efectos principales.

Empleando el procedimiento de Tukey, y considerando los porcentajes de extracción de la tabla 4.15, se determinó que para el factor dilución no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las diluciones de harina/solvente 1:10 y 1:12 y la dilución 1:15 obtuvo un rendimiento significativamente mayor que las otras

dos diluciones. Para el factor tiempo de agitación, los tiempos de 2 y 3 horas mostraron un rendimiento significativamente mayor que el tiempo de 1 hora y entre ellos no hubo diferencia estadísticamente significativa. Para el factor número de cargas, el rendimiento de extracción de 2 cargas de solvente fue significativamente mayor que el de 1 carga de solvente y el rendimiento de extracción de 3 cargas de solvente fue significativamente mayor que el de 1 y 2 cargas.

Tabla 4.17. Pruebas de los efectos inter-sujetos; variable dependiente: rendimiento de extracción de proteínas (Tabla generada por el programa SPSS).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	6570.481 ^a	26	252.711	27.023	.000
Intersección	58872.019	1	58872.019	6295.226	.000
Dilucion	401.593	2	200.796	21.471	.000
Tiempo	203.259	2	101.630	10.867	.000
Carga	5319.593	2	2659.796	284.414	.000
Dilucion * Tiempo	193.296	4	48.324	5.167	.003
Dilucion * Carga	69.296	4	17.324	1.852	.148
Tiempo * Carga	177.963	4	44.491	4.757	.005
Dilucion * Tiempo * Carga	205.481	8	25.685	2.747	.023
Error	252.500	27	9.352		
Total	65695.000	54			
Total corregida	6822.981	53			

a. R cuadrado = .963 (R cuadrado corregida = .927)

La presencia de interacciones entre factores indica que al aplicar dos o más factores a la extracción, el efecto no fue la simple suma de ellos, sino que hubo un incremento o una disminución significativa, respecto a la suma de acciones. Con los gráficos de perfil de un factor en función de los otros, tal como se muestra en el anexo I, se pueden evaluar con mayor detalle las interacciones señaladas por el análisis de varianza factorial. Esta información corroboró las condiciones de extracción que produjeron el menor y mayor rendimiento de extracción de proteínas. En la figura 4.6, donde se presenta la interacción de los tres factores (interacción tiempo–dilución en cada uno de los niveles de carga), se deduce que las condiciones de peor rendimiento de extracción fueron la dilución 1:10, con 2 horas de agitación y 1 carga de solvente y que las condiciones de mejor rendimiento de extracción fueron la dilución 1:15, con 2 horas de agitación y 3 cargas.

El hecho de que las condiciones de mejor y peor rendimiento de extracción coincidieran con los valores medidos en los diferentes experimentos (tabla 4.14), se debió a que los datos se ajustaron muy satisfactoriamente al modelo generado ($r^2 = 96,3\%$). Si el ajuste hubiera sido peor, el modelo generado habría tenido la ventaja de poder mostrar combinaciones de rendimiento de extracción, que no se habría podido evidenciar satisfactoriamente a partir de los datos.

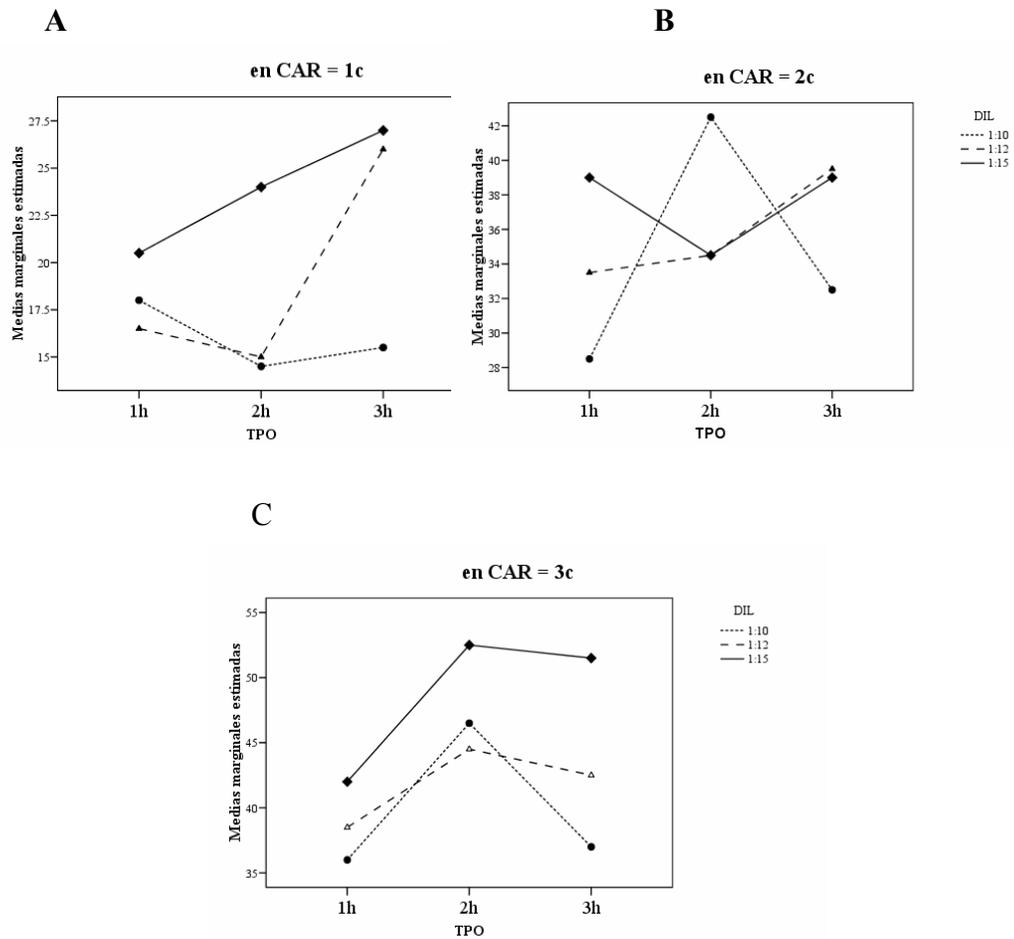


Figura 4.6. Gráficas de las medias marginales estimadas del modelo factorial de la interacción tiempo–dilución–carga obtenidas mediante el programa SPSS. En el eje X se representa el tiempo, en el eje Y se representa el rendimiento para las diferentes diluciones en cada uno de niveles de carga: una carga (A), dos cargas (B) y tres cargas (C).

En las figuras siguientes (4.7 a 4.9) se muestra una forma gráfica alternativa para evaluar las mejores y peores condiciones de rendimiento de extracción y los efectos entre valores intermedios de los factores dilución y tiempo. Se presentan las superficies de respuesta del rendimiento de extracción (eje Z) en función de diferentes combinaciones de las condiciones de extracción: dilución–carga (figura 4.7), dilución–tiempo (figura 4.8) y tiempo–carga (figura 4.9). Estos gráficos representan las interacciones dobles, donde no se incluye el tercer factor. Sin embargo, al combinar la interpretación de las diferentes gráficas se puede concluir la interacción de los tres factores del análisis. Los gráficos se generaron mediante el programa SigmaPlot versión 10.0.

En estas gráficas se corrobora que las mejores condiciones de extracción se produjeron para una dilución 1:15, dos horas de agitación y tres cargas de solvente y que las peores condiciones de extracción se obtuvieron para una dilución 1:10, dos horas de agitación y una carga de solvente. Además, se puede observar que dentro de los límites impuestos entre las condiciones que se emplearon para este trabajo, no hubo mejores o peores condiciones que las ya indicadas.

La gráfica de superficie de respuesta de la interacción tiempo–cargas de solvente (figura 4.9), sugiere que podría haber un rendimiento mayor si se aumentan las cargas de solvente y manteniendo un tiempo de agitación alrededor de las dos horas.

Aunque por el análisis antes realizado mediante el procedimiento de Tukey, el rendimiento con tres cargas fue significativamente mayor que con dos cargas, queda por determinarse experimentalmente si ese incremento sería significativo. Igual consideración podría hacerse respecto a la dilución (figura 4.7), donde podría esperarse un mejor rendimiento si se aumenta la dilución y las cargas.

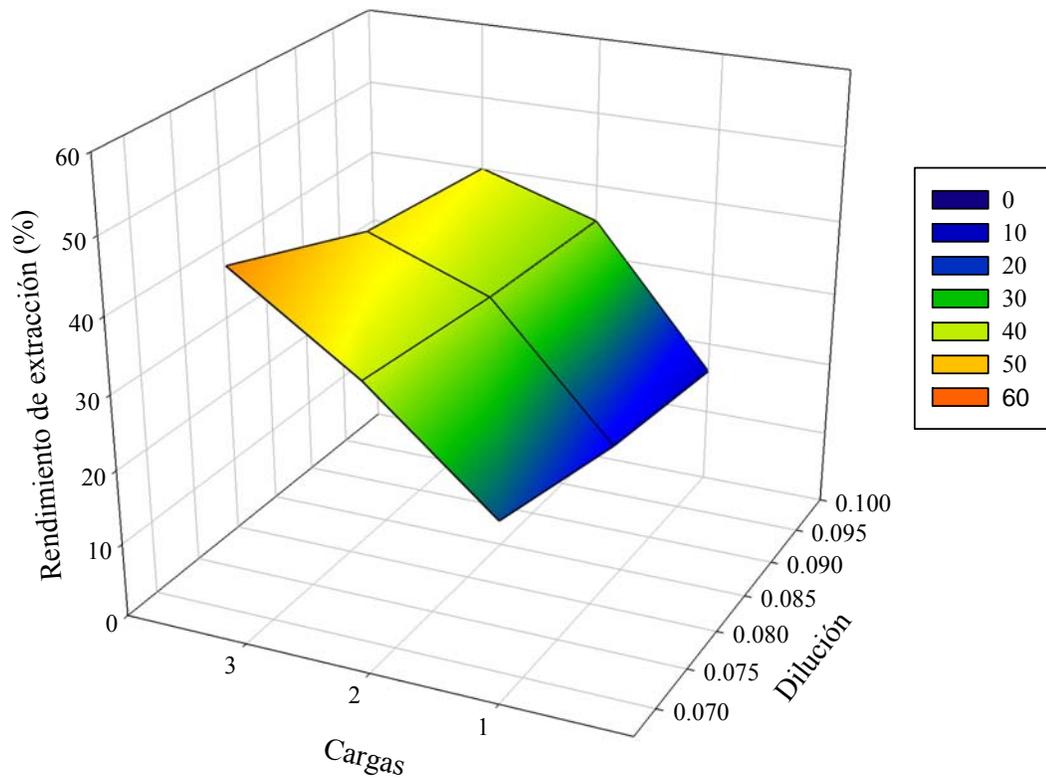


Figura 4.7. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción dilución-carga, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. Las cargas se muestran como datos categóricos (1, 2 y 3 cargas) y la dilución como datos continuos entre $1:10 = 0,100$ y $1:15 = 0,067$. Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran como datos continuos en el eje vertical (Z).

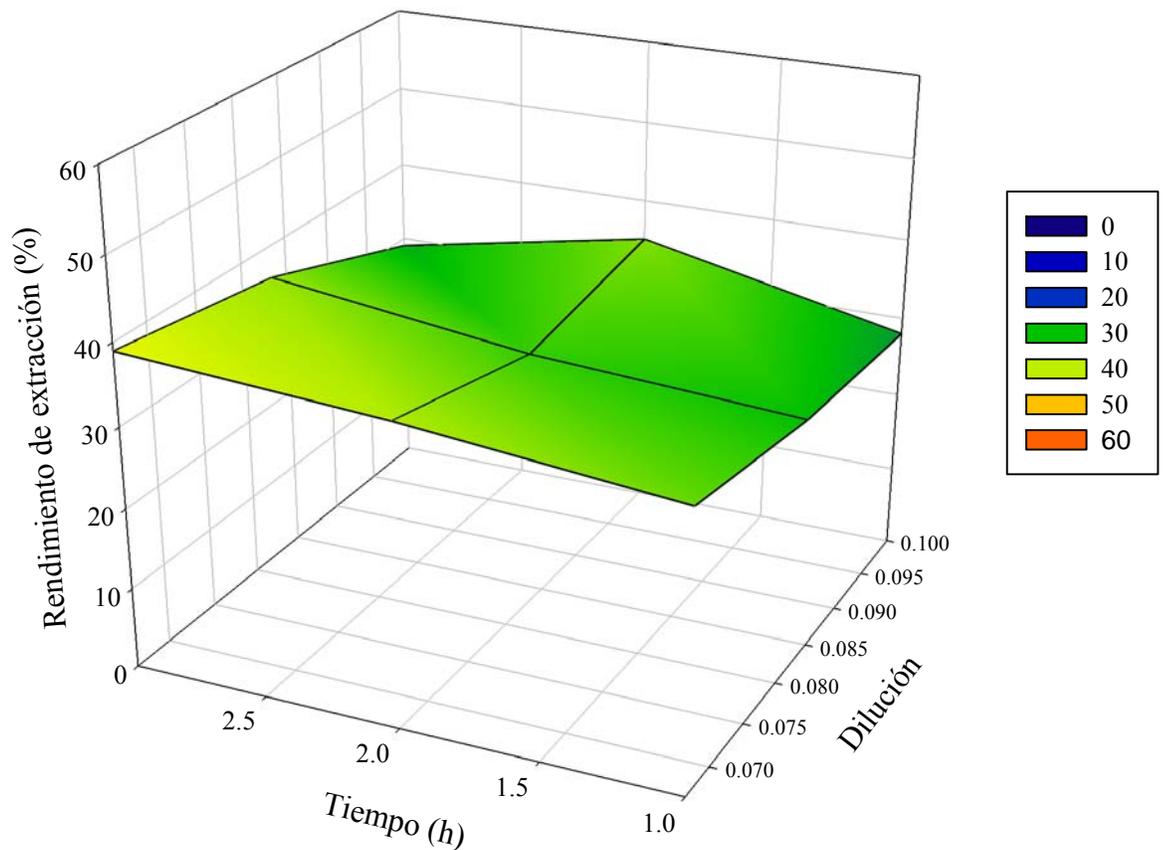


Figura 4.8. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción dilución-tiempo, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. El tiempo como datos continuos entre 1 y 3 horas y la dilución como datos continuos entre 1:10 = 0,100 y 1:15 = 0,067. Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran como datos continuos en el eje vertical (Z).

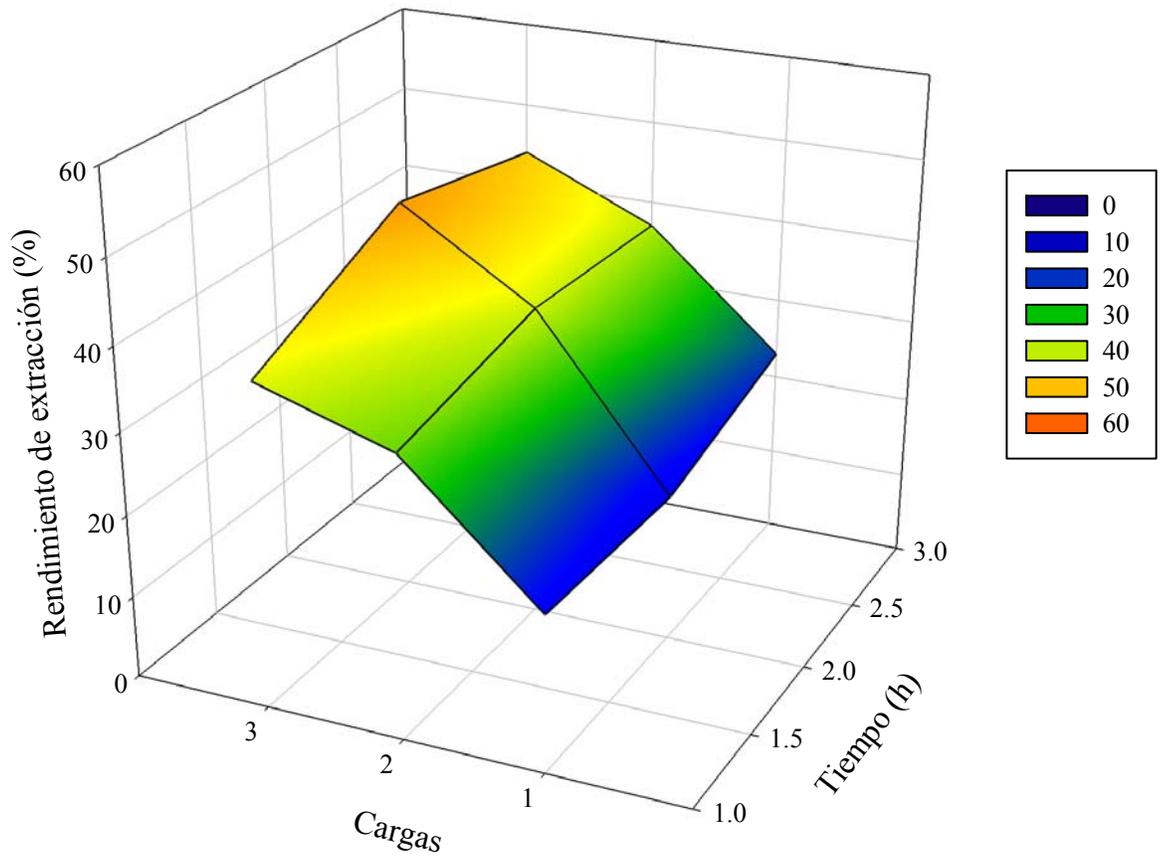


Figura 4.9. Superficie de respuesta del rendimiento de la extracción de proteínas de harina de hojas de amaranto, para la interacción tiempo-carga, de acuerdo con el modelo de análisis factorial lineal de tres factores y tres niveles fijos. El tiempo se muestran como datos continuos entre 1 y 3 horas y las cargas como datos categóricos (1, 2 y 3 cargas). Las medias marginales del rendimiento, generadas mediante el análisis de varianza se muestran como datos continuos en el eje vertical (Z).

4.4. Comparación del rendimiento de extracción de proteínas totales presentes en el follaje del *Amaranthus dubius* bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas

Para ambos valores de proteína cruda usados en el cálculo del rendimiento de las extracciones, las condiciones en las cuales se obtuvo mayor rendimiento, fueron empleando la relación harina/solvente 1:15, con 2h de agitación y 3 cargas con solvente, siendo éste de 53%, usando como valor de proteína cruda el determinado en este trabajo (tabla 4.14) y de 62%, usando como valor de proteína cruda el determinado por Acevedo y colaboradores en el año 2007 (tabla 4.15). También, las condiciones en las cuales se obtuvo menor rendimiento, fue empleando la relación harina/solvente 1:10, con 2h de agitación y 1 carga con solvente, siendo éste de 14%, usando como valor de proteína cruda el determinado en este trabajo (tabla 4.14) y de 17%, usando como valor de proteína cruda el determinado por Acevedo y colaboradores en 2007 (tabla 4.15). La razón entre las condiciones de máximo y mínimo rendimiento fueron: 3,8, usando como valor de proteína cruda el determinado en este trabajo y 3,7, usando como valor de proteína cruda el determinado por Acevedo y col. en el 2007. La diferencia observada se debe al efecto del redondeo en los cálculos.

CONCLUSIONES

1. En los extractos de harina de hojas de amaranto la mayoría de las bandas de proteínas identificadas corresponden a pesos moleculares entre 30 y 15 kDa, identificándose en dicha zona cuatro bandas de proteínas, mientras que sólo hubo unas pocas de peso molecular cercano o por encima a los 100 kDa. Sin embargo, la presencia de sustancias diferentes de las proteínas en los extractos analizados ocasionó interferencia en la identificación de las bandas de proteínas reveladas en los geles de electroforesis.
2. Las condiciones en las cuales se extrajo la mayor cantidad de proteínas fueron una relación harina/solvente de 1:15, con 2h de agitación y 3 cargas con solvente; extrayéndose, en promedio, $0,143 \pm 0,001$ g / g de muestra húmeda.
3. En las condiciones de mayor extracción, la cantidad de masa obtenida fue 3,67 veces mayor que en las condiciones de menor extracción (1:10, 2h, 1c).
4. Hubo incrementos en la masa de proteínas extraída al aumentar la dilución, el tiempo de agitación y las cargas de solvente, aunque solo esta última fue estadísticamente significativa. Fue significativamente mayor la masa extraída con tres cargas respecto a la de dos cargas, como también la masa de ésta respecto a la masa extraída con sólo una carga de solvente.
5. El contenido promedio de proteína cruda en base seca de tres muestras de la harina empleada para los ensayos de extracción, determinado mediante el método de Kjeldahl, fue de $29,75 \pm 0,94\%$.

6. Las condiciones en las cuales se obtuvo mayor rendimiento en la extracción de proteínas fueron: relación harina/solvente 1:15, con 2h de agitación y 3 cargas con solvente (53%, usando como valor de proteína cruda en base seca igual a 29,75%).
7. La razón entre los porcentajes máximo y mínimo de rendimiento (14% para las condiciones 1:10, 2h, 1c) fue de 3,8.
8. El análisis de varianza factorial para los resultados de rendimiento de extracción determinó que el modelo lineal generalizado generado a partir de las condiciones de extracción (dilución, tiempo, carga), fue capaz de explicar una parte significativa (96,3%) de la variación observada en el rendimiento ($p < 0,0005$).
9. Las gráficas de superficie de respuesta sugieren que podría haber un rendimiento mayor en la extracción de proteínas si se aumentan la dilución y el número de cargas de solvente, manteniendo un tiempo de agitación alrededor de las dos horas.

RECOMENDACIONES

1. Tomar en cuenta el volumen de líquido retenido por la harina, para mantener la relación de dilución en las posteriores cargas de solvente fresco.
2. Dializar las muestras contra un tampón adecuado, inmediatamente después de la extracción, a fin de disminuir el efecto de oscurecimiento en los geles y facilitar la identificación de las bandas de proteínas.
3. Realizar experimentos aumentando la dilución y el número de cargas de solvente para determinar si el rendimiento de la extracción de proteínas incrementa significativamente, a los fines de optimización del proceso utilizando una metodología específica para ello.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeye, C., Urga, K., Knapp, H., Selmar, D., Omwega, A., Imungi, J. y Winterhalter, P. (2003). A compositional study of *Moringa stenopetala* leaves. *East African Medical Journal*, 80 (5), 247-252.

Acevedo, I., García, O., Acevedo, I. y Perdomo, C. (2007). Valor nutritivo del bledo (*Amaranthus spp*) identificado en el Municipio Morán, Estado Lara. *Revista AGROLLANIA*, 4, 77-93.

Avanza, M. y Añón, M. (n.d.). *Propiedades funcionales de proteínas de amaranto. Capacidad de Gelificación*. Extraído el 28 de agosto de 2009 desde <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-045.pdf>.

Barba, A., Gueguen, J., Paredes, O. y Viroben G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 931-936.

Bohinski, R. (1991). *Bioquímica*. (5a. ed.). Delaware, Estados Unidos: Addison-Wesley Iberoamericana.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

COVENIN. (1980). Norma Venezolana 1195-80. Determinación de nitrógeno orgánico. Método de Kjeldahl.

Edwards, W. (2007). *The science of bakery products*. Cambridge, Reino Unido.

Ferrán, M. (2001). *SPSS para Windows. Análisis estadístico*. Madrid, España: Osborne. McGraw-Hill.

Food and Agriculture Organization (2003). Food energy. Methods of analysis and conversion factors. *FAO. Food and Nutrition* 77, 7-12.

Galindo A. (2001). *El Amaranto: Una opción viable de alimento y cultivo*. Extraído el 27 de agosto de 2009 desde http://www.cucba.udg.mx/sitiosinteres/coaxican/plts_mex/amaranto/amaranto.htm.

Gallardo, J. (2006). *Determinación de proteínas totales: Método de Bradford. Labtox: Protocolos del laboratorio de toxicología y biomedicina experimental*. Extraído el 26 de octubre de 2009 desde <http://www.webspawner.com/users/labtox/>.

Glantz, S. (1992). *Primer of Biostatistics*. (3a. ed.). Estados Unidos: McGraw-Hill.

Glass, G.V. y Stanley, J.C. (1974). *Métodos estadísticos aplicados a las Ciencias Sociales*. Englewood Cliffs, NJ, Estados Unidos: Prentice/Hall Internacional.

Gobierno en línea. (2006). Inaugurada primera máquina procesadora de la planta pira. Extraído el 30 de marzo de 2010 desde http://gobiernoenlinea.gob.ve/noticias-view/ver_detalle.pag?idNoticia=55507.

Hernández, R. y Herrerías, G. (1998). Amaranto: Historia y promesa. *Tehuacán: Horizonte del Tiempo*, 1, 529-545.

Hicks, J. (2001). *Bioquímica*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.

Hirt's Gardens. (n.d.). *Plant: Amaranthus caudatus*. Extraído el 11 de enero de 2010 desde <http://www.about-garden.com/a/en/2669-amaranthus-caudatus-love-lies-bleeding/>.

IDEA. Fundación Instituto de Estudios Avanzados. (2009). *Áreas de Investigación*. Extraído el 24 de agosto de 2009 desde <http://www.idea.gob.ve>.

IDEA. Fundación Instituto de Estudios Avanzados. (2009). *Quiénes somos*. Extraído el 24 de agosto de 2009 desde <http://www.idea.gob.ve>.

Juan, R., Pastor, J., Alaiz M., Megías C. y Vioque J. (2007). Caracterización proteica de once especies de amaranto. *Grasas y Aceites*, 58 (1), 49-55.

Kauffman, C. y Weber, L. (1990). *Advances in new crops: Grain amaranth*. Portland, Estados Unidos: Timber Press.

Konishi, Y., Horikawa, K., Oku Y., Azuma J. y Nakatani N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: Comparison of some physicochemical Properties and the putative location in the grains. *Journal of Agricultural Biology and Chemistry*, 55 (11), 2745-2750.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.

López, E. (2008). *El Amaranto, un superalimento*. Extraído el 27 de junio de 2009 desde http://www.visionchamanica.com/alimentacion_sana/Amaranto.htm.

Martínez N. y Añón C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2523-2530.

McKee, T. y McKee, J. (2003). *Bioquímica. La base molecular de la vida*. (3a. ed.). Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana.

Montgomery D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. México: Grupo Editorial Iberoamérica.

Nelson, D y Cox, M. (2000). *Lehninger. Principles of Biochemistry*. (3a. ed.). New York, Estados Unidos: Worth Publishers.

New England BioLabs. (n.d.). *Protein marker, broad range (2-212 kDa)*. Extraído el 15 de mayo de 2010 desde <http://www.neb.com/nebecomm/products/productP7702.asp>.

Nielsen, S. (2003). *Food analysis*. (3a. ed.). New York. Estados Unidos.: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Olivares, E. y Peña, E. (2009). Bioconcentración de elementos minerales en *Amaranthus dubius* (bledo, pira), creciendo silvestre en cultivos del estado Miranda, Venezuela, y utilizado en alimentación. *Interciencia*, 34 (9), 604-611.

Pantanelli, A. (2001). Prometedora resurrección del amaranto. Los mayas ya lo sabían. [Versión electrónica], *Revista alimentos argentinos*, 18. Extraído el 30 de marzo de 2010 desde http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_18/18_07_amaranto.htm.

Pattacini, S., Scoles, G. y Covas, G. (2000). Integral chemical analysis of the amaranth (*Amaranthus greggii* S. Wats). *Molecules* 5, 557-559.

Perry, H., Green D. y Maloney, J. (2001). *Manual del ingeniero químico*. Vol. 3. (7a. ed.). Madrid, España: McGraw Hill Interamericana.

Perry, R., Green, D. y Maloney, J. (2001). *Manual del Ingeniero Químico*. Vol III. (4a. ed. En español). Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana.

Pierce Biotechnology. (2004). *Grasp the proteome. Protein Assay Technical Handbook*. Estados Unidos: Pierce Biotechnology Inc.

Pond, W. y Lehmann, I. (1989). Nutritive value of vegetable amaranth cultivar for growing lambs. *Journal of animal science*, 67, 3036-3039.

Promega. (n.d.). *Broad range molecular weight marker*. Extraído el 15 de mayo de 2010 desde http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_1526.

Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C. y Lawrence, J. (1994). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and Molecular Biology*, 40 (1), 57-75.

Rinzler, C. (2006). *Nutrición para Dummies*. (3a. ed.). Bogotá, Colombia: Grupo Editorial Norma.

Roskoski, R. (1998). *Bioquímica*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.

Ruskin, F. (1984). *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. Washington DC: National Academy Press.

San Miguel (2006). *Historia del Amaranto*. Extraído el 2 de marzo de 2010 desde http://sanmiguel.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=31.

Sandbrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (3a. ed.). New York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scheffler, W. (1981). *Bioestadística*. México: Fondo Educativo Interamericano.

Schnee, L. (1973). *Plantas comunes de Venezuela*. (2a. ed.). Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto de Botánica Agrícola.

Seeds of Change. (n.d). *Golden Giant Amaranth*. Extraído el 11 de enero de 2010 desde http://www.seedsofchange.com/garden_center/product_details.aspx?item_no=PS15481.

Soriano, M. (2006). *Novel method for preparing and stabilizing a nutritious amaranth product*. México.PA/a/2006/013015.

Tejera, J. y Arenas, R. (2001). Guía para el cultivo y aprovechamiento del coime o amaranto: *Amaranthus caudatus* Linneo. *Serie Ciencia y Tecnología*, 86. Convenio Andrés Bello.

Teutonico, R. y Dietrich, K. (n.d). *Amaranth: Composition, Properties and Applications of a Rediscovered Food Crop*. Extraído el 30 de agosto de 2009 desde http://eap.mcgill.ca/CPAT_1.htm.

Thermo Scientific. (2008). *Thermo Scientific Pierce Electrophoresis Technical Handbook*. Estados Unidos: Thermo Scientific Inc.

Thermo Scientific.Pierce® BCA protein assay kit. Instructions.

Urdaneta, A. y Zambrano, J. (2009). *Evaluación de métodos de extracción de proteína total en hoja de amaranto (Amaranthus dubius) como suplemento nutricional*. (Informe de pasantía). Caracas: Universidad Central de Venezuela, Departamento de Ingeniería Química.

Vertommen, A., Pains, B., Swennen, R. y Carpentier, S. (2010). Evaluation of chloroform/methanol extraction to facilitate the study of membrane proteins of non-model plants. *Planta*, 231, 1113-1125.

Wikipedia. La Enciclopedia Libre. (n.d.). *Amaranthus dubius*. Extraído el 29 de septiembre de 2009 desde http://es.wikipedia.org/wiki/Amaranthus_dubius.

Wikipedia. La Enciclopedia Libre. (n.d.). *Amaranthus*. Extraído el 8 de diciembre de 2009 desde <http://es.wikipedia.org/wiki/Amaranthus>.

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y
ASCENSO:**

TÍTULO	EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA EXTRAER PROTEÍNAS TOTALES DEL FOLLAJE DE AMARANTO (<i>Amaranthus dubius</i>)
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CVLAC / E-MAIL
Bónoli Camacho Laura Cristina	CVLAC: V-18.013.199 E-MAIL: bonoli_l@hotmail.com
	CVLAC: E-MAIL:
	CVLAC: E-MAIL:

PALABRAS O FRASES CLAVES:

<i>Amaranthus dubius</i>
Amaranto
Extracción
Proteínas

Análisis factorial

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y
ASCENSO:**

LÍNEAS Y SUBLÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

ÁREA	SUBÁREA
Ingeniería y Ciencias Aplicadas	Ingeniería Química

RESUMEN (ABSTRACT):

El amaranto es un pseudocereal, nativo de la región andina, de alto valor nutricional por su elevado contenido en proteína, tanto en su grano como en su follaje. La mayoría de los estudios realizados sobre las proteínas de amaranto han sido respecto a las presentes en el grano de la planta, sin embargo, se sabe que las hojas también presentan un contenido notable de proteínas que puede ser aprovechado. Por lo antes expuesto, se llevó a cabo la evaluación del proceso de extracción de proteínas totales del follaje de amaranto, empleando NaOH 0,2% (p/v) como solvente extrayente y harina de hojas de *Amaranthus dubius*, enfocado en el efecto de determinadas variables sobre el rendimiento de extracción. Se diseñó un experimento completamente aleatorizado de tres factores fijos (relación masa de harina de hoja de amaranto/volumen de solvente, carga de solvente y tiempo de agitación) con tres niveles cada uno. Para el

factor relación masa de harina/volumen de solvente se establecieron los niveles de dilución 1:10, 1:12 y 1:15. Para el factor carga de solvente se usaron los niveles, una, dos y tres cargas con solvente fresco, empleando, para cada carga, el volumen correspondiente a las relaciones masa/ volumen evaluadas. Para el factor tiempo de agitación se emplearon los niveles: 1, 2 y 3 horas. El efecto de los factores se evaluó mediante la prueba factorial de la varianza para modelos lineales de tres factores fijos con tres niveles, generando a partir de las condiciones de extracción un modelo lineal generalizado que fue capaz de explicar el 96,3% de la variación observada en el rendimiento. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo con la dilución 1:15, 2 horas de agitación y 3 cargas (62% de proteínas extraídas en base seca).

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E-MAIL							
	ROL	CA		AS		TU	X	JU
Álvarez Martínez, Lucas	CVLAC	4.077.552						
	E-MAIL	lalvarezm57@gmail.com						
	E-MAIL							
	ROL	CA		AS	X	TU		JU
Lobos, Susana	CVLAC	16.880.099						
	E-MAIL	susanalobos@gmail.com						
	E-MAIL							
	ROL	CA		AS		TU		JU
Marfisi, Shirley	CVLAC	10.301.828						
	E-MAIL	shirleymarfisi@yahoo.com						
	E-MAIL							
	ROL	CA		AS		TU		JU
Ciarfella, Ana	CVLAC	8.315.404						
	E-MAIL	atciarfella@gmail.com						
	E-MAIL							
	ROL	CA		AS		TU		JU

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2010	08	09
Año	Mes	Día

LENGUAJE: SPA

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y
ASCENSO:**

ARCHIVO(S):

Nombre de archivo	Tipo MIME
tesisbonolil2010.doc	Application/msword

CARACTERES EN LOS NOMBRES DE LOS ARCHIVOS:
 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z . a b c d e f
 g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z . 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 .

ALCANCE:

ESPACIAL: Estado Miranda, Venezuela

TEMPORAL: 2009 - 2010

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Ingeniero Químico

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Pregrado

ÁREA DE ESTUDIO:

Departamento de Ingeniería Química

INSTITUCIÓN(ES) QUE GARANTIZA(N) EL TÍTULO O GRADO:

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y
ASCENSO:**

DERECHOS:

De acuerdo al Artículo 41 del Reglamento de Trabajos de Grado:

“Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizados a otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien lo participará al Consejo Universitario”

Bónoli Camacho, Laura Cristina.
AUTOR

Prof. Álvarez Martínez, Lucas
TUTOR

Profa. Marfisi, Shirley
JURADO

Profa. Ciarfella, Ana
JURADO

Profa. Yraima Salas

POR LA COMISIÓN DE TESIS

