

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA.

Facultad de Ingeniería

**Extracción y caracterización de proteína foliar
de Hoja de Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*)**

Trabajo de graduación presentado por
Juan Luis Miguel Arias Segura
para optar al grado académico de
Licenciado en Ingeniería de Alimentos

Guatemala
2012

**Extracción y caracterización de proteína foliar
de Hoja de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Alimentos.



**Extracción y caracterización de proteína foliar
de Hoja de Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*)**

Trabajo de graduación presentado por
Juan Luis Miguel Arias Segura
para optar al grado académico de
Licenciado en Ingeniería de Alimentos

Guatemala
2012

Vo. Bo. :

(f) Ana Luisa de Montenegro
Licenciada Ana Luisa Mendizábal de Montenegro
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) Ana Luisa de Montenegro
Licenciada Ana Luisa Mendizábal de Montenegro
Asesor

(f) Ana Silvia Colmenares de Ruiz
Licenciada Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f) Elsa Georgina Gudiel Aguilar
Licenciada Elsa Georgina Gudiel Aguilar

Fecha de aprobación: 26 de enero de 2012 ✓

DEDICATORIA

A Dios, porque él fue quien hizo posible este recorrido al igual que todo en esta vida. Gracias Señor por los aciertos y desaciertos, por las alegrías y las caídas. Sin ti, no habría llegado hasta aquí. A la Santísima Virgen, por ser mi madre, mi guía y mi soporte. A ustedes dediqué mi carrera de Ingeniería en Alimentos.

A mis padres, hermanas, sobrinos, familia extendida y amigos, porque en todo momento fueron mi motor, motivación, soporte y alegría. Gracias por todo.

Al Dr. Bressani, a Stefani Germanotta y Elizabeth Gilbert, porque sus obras trascendieron de tiempo, espacio y distancia para permitir que mi mente llegara a lugares donde no había llegado. Gracias por la inspiración.

A usted, apreciable lector, porque es quien le da sentido a toda esta investigación. Espero le sea útil.

A todos ustedes, de todo corazón, mil Gracias.

ÍNDICE.

	Página
LISTADO DE CUADROS.....	viii
LISTADO DE ECUACIONES	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
A. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	2
B. PROTEÍNAS VEGETALES Y AISLADO PROTEICO	4
C. FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS	5
III. ANTECEDENTES.....	8
A. CHAYA.....	8
IV. JUSTIFICACIÓN.....	11
V. OBJETIVOS	14
A. GENERALES	14
B. ESPECÍFICOS	14
VI. METODOLOGÍA.....	14
A. PREPARACIÓN DE LAS HOJAS	14
B. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR.....	15
C. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA	18
D. CARACTERÍSTICAS DEL AISLADO.....	20
E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
VII. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	14

A. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR	14
B. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA	30
C. CARACTERÍSTICAS DEL AISLADO Y LA HOJA.....	33
VIII. CONCLUSIONES.....	35
IX. RECOMENDACIONES.....	36
X. BIBLIOGRAFÍA	37
XI. APÉNDICE	40
A. SOLUBILIDAD DE PROTEÍNA EN RELACIÓN A pH Y DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO	40
B. RELACIÓN MUESTRA-SOLVENTE	44
C. RELACIÓN DE TIEMPO DE EXTRACCIÓN.....	47
D. RELACIÓN DE TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN	50
E. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO	52
F. SOLUBILIDAD DEL AISLADO EN FUNCIÓN DE PH.....	53
G. CAPACIDAD DE EMULSIÓN	54
H. ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE	54
I. CARACTERÍSTICAS DE LA HOJA Y EL AISLADO	55
J. IMÁGENES DEL ESTUDIO	57

LISTADO DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1: Composición por 100 g de porción fresca de hojas comestibles (4 variedades).....	9
Cuadro 2: Condiciones de extracción para proteína foliar de	26
Cuadro 3: Características tecnológicas del aislado proteico de	31
Cuadro 4: Estabilidad de la emulsión	32
Cuadro 5: Características de proteína y humedad de hoja de Chaya	33
Cuadro 6: Datos de absorbancia para curva de calibración de	40
Cuadro 7: Porcentaje de solubilización de proteína de hoja de Chaya (1)	42
Cuadro 8: Porcentaje de solubilización de proteína de hoja de Chaya (2)	43
Cuadro 9: Promedios de porcentaje de proteína soluble para Curva de solubilización de proteína de hoja de Chaya	43
Cuadro 10: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo a la relación muestra solvente.....	44
Cuadro 11: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación muestra-solvente	45
Cuadro 12: Análisis de Varianza de un factor para los grupos 10 mL/g y 15 mL/g del análisis de relación muestra-solvente	46
Cuadro 13: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo al tiempo.....	47
Cuadro 14: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación de tiempo de extracción	48
Cuadro 15: Análisis de Varianza de un factor para los grupos 20 minutos y 30 minutos del análisis de relación de tiempo de extracción	49
Cuadro 16: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo a la temperatura	50
Cuadro 17: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación de temperatura de extracción	51
Cuadro 18: Proteína soluble en sobrenadantes tras precipitación en proceso de extracción	52

Cuadro 19: Pesos de materiales durante el proceso de extracción.....	52
Cuadro 20: Porcentaje de solubilización de proteína del aislado proteico de hoja de Chaya	53
Cuadro 21: Aceite consumido en análisis de capacidad de emulsión	54
Cuadro 22: Pesos de muestras para análisis de absorción de agua y aceite	54
Cuadro 23: Humedad de muestras.....	55
Cuadro 24: Proteína de muestras por método Kjeldahl.....	56

LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación	Página
Ecuación 1: Determinación de rendimiento de proceso de extracción de proteína foliar.....	18
Ecuación 2: Estabilidad de espuma.....	19
Ecuación 3: Expansión de espuma	19
Ecuación 4: Capacidad de absorción	20
Ecuación 5: Porcentaje de humedad.....	20
Ecuación 6: Porcentaje de proteína.....	21
Ecuación 7: Media.....	22
Ecuación 8: Desviación estándar	22
Ecuación 9: Suma de cuadrados de Varianzas	22
Ecuación 10: Porcentaje de proteína soluble	41
Ecuación 11: Cálculo de rendimiento a partir de Chaya fresca	52
Ecuación 12: Cálculo de rendimiento a partir de Chaya seca	53
Ecuación 13 : Corrección para proteína en base húmeda.....	56

LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Hojas de 4 variedades de Chaya cultivadas en Guatemala	8
Figura 2: Curva de solubilización de la proteína foliar de hoja de Chaya	25
Figura 3: Solubilización de la proteína del aislado proteico a diferentes valores de pH	30
Figura 4: Curva de calibración de proteína disuelta	41
Figura 5: Hoja de Chaya con escala.....	57
Figura 6: Residuos de Chaya luego del proceso de extracción.....	57
Figura 7: Apariencia de separación de Chaya y Sobrenadantes por centrifugación	58
Figura 8: Recolección por centrifugación de proteínas precipitadas	58
Figura 9: Apariencia de la prueba de expansión y estabilidad de espuma	59

RESUMEN

La hoja de Chaya ha demostrado ser una buena fuente de alimento por su alta concentración de proteína, haciéndola potencialmente explotable para consumo humano. El objetivo principal del presente estudio fue establecer las condiciones de extracción y características generales de la proteína foliar de la hoja de Chaya (*Cnidoscolus Aconitifolius*) variedad Estrella. Se utilizó en el estudio hojas de Chaya, las cuales fueron deshidratadas en secadores de aire caliente para luego pasar por un proceso de extracción por solubilización en medio alcalino y posterior precipitación Isoeléctrica. Se analizaron las propiedades tecnológicas del aislado proteico.

Se establecieron como condiciones óptimas de extracción para el aislamiento de proteína de hoja de Chaya a partir de hoja seca un proceso a 30° C, por 20 minutos con una relación muestra-solvente de 10 mL de solvente/gramo de muestra, con un rendimiento del $0.616 \pm 8.20 \cdot 10^{-5}\%$ en relación a las hojas frescas, considerándose como poco eficiente. Se encontró que el punto Isoeléctrico de la proteína foliar es a pH 3.8 ± 0.01 , ya que se da la mayor proporción de precipitación de proteína en el proceso de extracción. El comportamiento de la proteína, en términos de la solubilización de la misma a diferentes valores de pH, fue el mismo en la hoja como en el aislado, indicando que no hubo cambios sustanciales en la proteína por el procesamiento.

Finalmente al analizar las características tecnológicas, se encontró que la proteína mostró una capacidad emulsificante de 10.067 ± 0.231 mL aceite/g aislado, una absorción de agua de 0.940 ± 0.140 mL agua/g aislado, una absorción de aceite de 1.801 ± 0.168 mL aceite/g aislado y ninguna capacidad de expansión o estabilidad de espuma, mostrando que sus características tecnológicas no son variadas y no lo hacen un buen aditivo (en términos tecnológicos).

I. INTRODUCCIÓN

El tema del uso de proteínas vegetales como fuente de alimentación ha cobrado interés en los últimos años debido a factores de carácter económico, social y de salud, especialmente los estudios referentes a la extracción de proteína foliar. La Chaya (*Cnidoscolus Aconitifolius*) es una planta que ha sido reconocida por su alto contenido proteico en sus follajes. Ésta solía ser consumida en el área de Guatemala en épocas antiguas pero la costumbre se perdió con el tiempo.

Debido a la necesidad de fuentes no tradicionales de alimentos que puedan suplir los requerimientos de la industria, se pretende con el siguiente estudio de investigación desarrollar un método para extraer proteína foliar de la hoja de Chaya, utilizando el método de solubilización alcalina y precipitación isoeléctrica. El extracto obtenido será evaluado para determinar sus características tecnológicas, ya que esto ayudaría a determinar si dicho extracto puede ser funcional en algún sector de la industria de alimentos o el sector agrícola.

II. MARCO TEÓRICO

A. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

Las proteínas se definen como polímeros de alfa aminoácidos que tienen funciones primordiales para los seres vivos y pueden llegar a tener un alto grado de complejidad estructural, además de su casi ilimitada funcionalidad. Los aminoácidos son sus componentes estructurales, siendo únicamente 20 pero en distinto ordenamiento y cantidad. Difieren entre ellos únicamente por sus cadenas laterales (grupos R) que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en la solubilidad en agua de los mismos. (Lehninger, 2005).

La acción de una proteína se encuentra sujeta al tipo de estructura que tenga. Para analizar las proteínas estructuralmente puede hacerse desde tres tipos de estructura. La estructura primaria la conforman las secuencias de aminoácidos en una proteína y muestra el esqueleto de la misma al indicar cada una de sus subunidades. La estructura secundaria está dada por la disposición que tome en el espacio la cadena de aminoácidos debido a las interacciones de los enlaces de hidrógenos (puede ser en forma de hélice alfa u hoja plegada beta). La estructura terciaria es la estructura tridimensional que toma la proteína al haber interacciones entre las estructuras secundarias formadas, quedando expuestos o aislados los sitios activos de la misma. La estructura cuaternaria ya no es propia de la proteína, sino que establece la interacción conformacional entre diferentes proteínas. Cada uno de los cambios estructurales que se den en la proteína la afecta por completo, cambiando sus características funcionales (Actividad, solubilidad, etc.).

Cada aminoácido presenta reactividad y características individuales de acuerdo a la naturaleza de su cadena lateral y a su naturaleza iónica, reflejándose en la estabilidad o reactividad de las proteínas. Los α -aminoácidos tienen dos o tres grupos ácido-básicos

(son tres en caso de presentar cadenas laterales ionizables). Los α -aminoácidos son considerados anfóteros, al tener la capacidad de recibir y de donar electrones y alcanzar un punto isoeléctrico (pI) cuando presentan el mismo número de cargas positivas y negativas, por lo que su carga neta es cero. (Voet y Voet, 2009)

La solubilidad de una proteína depende del grado de hidratación y del número o arreglo de las cargas sobre la molécula, dado por los aminoácidos que la componen y la presencia o ausencia de residuos (fosfatos, lípidos, carbohidratos). Las moléculas de proteínas cargadas se acercan lo suficiente como para formar agregados o precipitados, cuando la constante dieléctrica del medio es reducida por la adición de acetona, alcohol u otros disolventes. Esto también sucede cuando se consigue la fortaleza iónica apropiada, mediante la adición de electrolitos. En presencia de grandes concentraciones de sales, como el sulfato de amonio, se disminuye el grado de hidratación y se reduce el número de cargas de las proteínas y, consecuentemente estas se agregan y se precipitan. (Miller, *et. al.*, 2003)

Un procedimiento común para separar proteínas de sus disoluciones consiste en ajustar el pH al punto isoeléctrico de la proteína de interés. La solubilidad de la proteína tiene su valor mínimo, y luego se adiciona una sal neutra, por ejemplo, sulfato de potasio o de sodio. Puesto que las distintas proteínas de una mezcla se precipitan a diferentes concentraciones de una sal, la separación es factible mediante el incremento controlado de la concentración de sal. (Miller, *et. al.*, 2003)

Determinar la concentración de proteína en muestras de alimentos es una técnica de rutina básica para poder establecer el aporte que este alimento puede dar por su consumo. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteína, basándose todos en alguna de sus características. Estos métodos se basan en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el rango UV, en la formación de derivados químicos o en la capacidad de las proteínas para unir ciertos colorantes. (Fernández y Galván, 2003)

El método de Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ión Cu^{2+} y los grupos NH del enlace peptídico. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica. La sensibilidad del método es muy baja y, dado que es específico para el enlace peptídico, se recomienda su uso únicamente para la cuantificación de proteínas, mas no de hidrolizados, a menos que se conozcan los tamaños moleculares y se adapte la proteína estándar de la curva. (Fernández y Galván, 2003) (Badui, 2006)

El método de Kjeldahl para la determinación de Nitrógeno Total es el más utilizado, e incluso se toma como referencia cuando se usan otras técnicas. El único inconveniente del método es que no hace distinción entre el nitrógeno que viene de las proteínas (grupos amino y amida) y el no proteico (urea, aminoácidos libres), dando errores en el cálculo. (Badui, 2006)

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante (azul de Comassie G-250) a las proteínas. Estos colorantes no reaccionan directamente con la proteína, pero sí forman complejos no covalentes. Las proteínas en solución se ligan al colorante y estos complejos pueden cuantificarse por espectrofotometría a una absorbancia de 595 nm. (Badui, 2006)

B. PROTEÍNAS VEGETALES Y AISLADO PROTEICO

La proteína foliar consiste de enzimas y algunas proteínas estructurales y constituyen entre el 70 y 80% del nitrógeno total en follajes. La proteína citoplásmica, libre de clorofila, es soluble en agua, tiene una mejor digestibilidad y posee un alto valor nutricional, mientras que la fracción cloroplástica es insoluble en agua (lipoproteína en estado coloidal asociada con cloroplastos) es de menor digestibilidad y valor nutritivo. Estudios han demostrado la

importancia de cuidar los parámetros de pH, tiempo, relación solvente-muestra y temperatura al desarrollar procesos de extracción. (Urribarrí et al., 2004)

De acuerdo al Codex Alimentarius (2004) los productos proteínicos vegetales (PPV) son aquellos que se obtienen mediante la reducción o eliminación de algunos de los principales constituyentes no proteicos (agua, aceite, almidón, otros carbohidratos) obteniéndose un contenido en proteínas del 40% o más, calculado sobre el peso en seco, con exclusión de vitaminas, minerales, aminoácidos y aditivos alimentarios que se añadan. (Molina, 2005)

C. FUNCIONALIDAD TECNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS

Las propiedades de los productos alimenticios son vitales para la aceptación por el consumidor. La textura, siendo característica fundamental, se genera a partir de cuidadosas formulaciones y procesamientos. Parte importante en la textura y características organolépticas de los alientos son las proteínas. Estas permiten dar características de viscosidad, esponjosidad, espumabilidad, firmeza, gelificado a los productos. Sin embargo, dado que los alimentos son sistemas complejos formados por varios componentes (proteína, grasa, carbohidratos y sales minerales), la funcionalidad total de un ingrediente no puede ser considerada independiente de otro. Por el contrario, esta funcionalidad es el resultado de la interacción entre dichos componentes. (Urribarrí *et al.*, 2004)

Algunas de las características funcionales buscadas en las proteínas son las capacidades para emulsificar, para retener agua o aceite, como agentes espumantes. La capacidad de emulsificación de una proteína se refiere a la capacidad que tiene la misma de poder crear emulsiones o mezclas homogéneas de aceite en agua o agua en aceite. Esta capacidad es de especial importancia en la elaboración de aderezos y embutidos. Con respecto a la capacidad de retención de agua o aceite, esta se busca para poder mantener las características de humectabilidad en matrices alimentarias como el caso de los embutidos, aderezos y postres. En el caso

de la capacidad espumante, esta es utilizada en la industria de panificación y confitería ya que permite la formación de estructuras esponjosas estables. (Urribarí *et al.*, 2004)

III. ANTECEDENTES

Se han realizado gran cantidad de investigaciones que permitan el aprovechamiento de nuevas fuentes vegetales de proteína, no solo para países en desarrollo, pero también para los que se encuentran plenamente desarrollados. Los beneficios del consumo de proteína vegetal incluyen una mejora en la condición de salud al disminuir la ingesta de grasas de origen animal y por los efectos benéficos generados por otros compuestos que acompañan a la proteína en la matriz alimentaria (fibra, fitosteroles, entre otros.) (Setchell, 1998)

El potencial de los recursos vegetales como fuente de alimentación humana ha sido tema de estudios científicos desde el siglo VIII, tomando especial importancia en el siglo XX. La literatura indica que fue Norman Wingate Pirie (1907-1997) el primero en desarrollar una tecnología práctica para la extracción de proteína foliar. Este investigador argumentó que en los diferentes climas del mundo podía ser posible obtener una mayor cantidad de proteína comestible por extracción de follajes que de cualquier otro cultivo., pudiendo ser ésta una valiosa contribución en la lucha contra el hambre. La razón fundamental de utilizar plantas en la elaboración de aislados proteicos es que las proteínas componen al menos 50% del peso seco de las células vivas y son fundamentales en aspectos estructurales y de función celular, por lo cual puede asegurarse que se encontrarán siempre en tejidos vivos. (Molina, 2005)

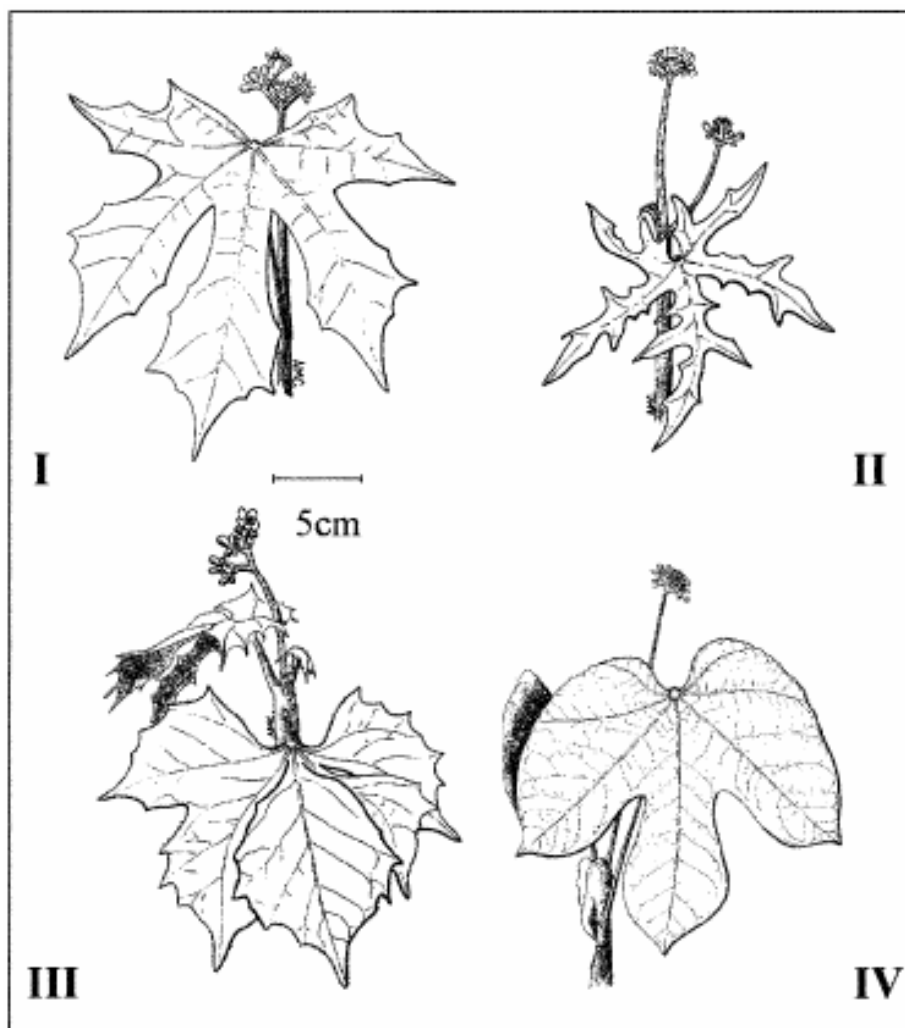
A. CHAYA

La Chaya (*Cnidoscolus Aconitifolius*) es un arbusto común nativo del área de Mesoamérica, que puede alcanzar una altura de 3 a 5 m. Esta requiere de poco cuidado y crece de forma natural en buena parte del territorio guatemalteco, teniendo una muy buena adaptación a climas de diferentes condiciones (húmedas o secas), desde el nivel del mar hasta 1500 metros de altitud. Es utilizado comúnmente como vegetación para cercado de áreas. (Evaluación..., 2003)

Aunque hay una amplia variedad en morfología y fenología entre subespecies, se ha logrado identificar cuatro variedades de chaya cultivadas en Guatemala (Figura 1), siendo éstas: Estrella (I), Picuda (II), Chayamansa (III) y Redonda (IV).

Las hojas de Chaya han sido utilizadas como alimento para humanos y animales desde la época precolombina. En algunos poblados de Mesoamérica se mantuvo la tradición de su consumo hasta la época actual, aunque en la región se haya perdido esta costumbre. (Evaluación..., 2003)

Figura 1: Hojas de 4 variedades de Chaya cultivadas en Guatemala



Variedades: Estrella (I), Picuda (II), Chayamansa (III) y Redonda (IV).
(Ross y Molina, 2002)

A pesar del alto contenido de fibra, se ha encontrado que las hojas de chaya pueden llegar a ser una fuente significativa de proteína y aminoácidos azufrados. Dado que la fibra dietética ha demostrado tener efectos antagonistas a la digestibilidad de proteína y aminoácidos en unos alimentos, se ha estudiado la posibilidad de poder obtener el beneficio del aporte proteico sin la fibra. Lo que ha llamado la atención de la hoja de chaya es su excepcional composición química y su potencial nutricional. (Sarmiento, *et. al.*, 2003)

Cuadro 1: Composición por 100 g de porción fresca de hojas comestibles (4 variedades)

CONTENIDO	Chaya[^]	Bledo[*]	Chipilín[*]	H.Mora[*]	Calabaza[*]	Acelga[*]
Proteína (g)	5.2	3.7	7.0	5.0	4.2	1.6
Grasa (g)	1.9	0.8	0.8	0.8	0.4	0.4
Carbohidrato (g)	10.7	7.4	9.0	7.0	3.4	5.6
Fibra (g)	2.4	1.5	2.0	1.4	1.5	1.0
Ceniza (g)	1.9	2.1	1.5	1.8	1.6	1.6
Calcio (g)	244	313	287	199	127	110
Fósforo (mg)	71	74	72	60	96	29
Hierro (mg)	2.2	5.6	4.7	9.9	5.8	3.6
Actividad Vit. A (mg)	2.5	1.6	3.0	0.2	0.8	0.9
Vit. B1 (mg)	0.2 [*]	0.05	0.33	0.18	0.14	0.03
Vit. B2 (mg)	0.4 [*]	0.24	0.49	0.35	0.17	0.09
Niacina (mg)	1.6	1.2	2.0	1.0	1.8	0.4
Vit. C (mg)	360	65	100	61	58	34
%Humedad	80	86	82	85	90	91
Energía, kcal	64 [*]	42	56	45	26	27

[^]Contenido promedio de 4 selecciones, analizadas cada una por lo menos en duplicado ^{*}Tomado de INCAP- ICNND, 1961 (Evaluación..., 2003)

El alto contenido de proteína, provitamina A (principalmente β -caroteno) y vitamina C hace de ésta hoja un alimento que podría explotarse. Estudios recientes muestran que la hoja de Chaya se destaca por ser nutricionalmente superior que otros follajes comúnmente consumidos y que esto presenta una posibilidad para desarrollar productos mejorados en términos nutritivos utilizando proteínas de origen vegetal. Sin embargo, aún no se cuenta con metodología o procesos que permiten la extracción proteica eficiente de esta planta para la preparación de aislados.

IV. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición, especialmente proteica en los países en vías de desarrollo y del Tercer Mundo, como Guatemala, se ha acrecentado debido a las escasas fuentes de proteína (usualmente de origen animal) y a su elevado costo económico. De acuerdo a datos de UNICEF (2007), Guatemala presenta el primer lugar de prevalencia de desnutrición crónica infantil y sexto a nivel mundial, con un 49.3% de niños menores de cinco años afectados por ello. Las consecuencias de una alimentación deficiente (tanto en cantidad como en calidad) generan grandes repercusiones en el desarrollo del infante. De esta cuenta, 25% de las madres de niños que padecen desnutrición crónica han padecido de esta misma y un 22.1% de las gestantes padecen de anemia. Esto genera un ciclo difícil de romper, generando la urgente necesidad de proveer a la población con alimentos que puedan suplir sus necesidades.

América Latina cuenta con diversidad de climas que la hacen apta para la producción de diferentes tipos de alimentos. Sin embargo, debido a la falta de información, las personas suelen desconocer las formas para optimizar el aprovechamiento de los recursos con que cuentan. Los cereales han sido por mucho tiempo la fuente de las proteínas de la dieta en países subdesarrollados y se prevé que en las próximas décadas será la fuente predominante de proteínas para dos terceras partes del mundo. Actualmente se están dirigiendo gran cantidad de esfuerzos por encontrar fuentes de proteína de origen vegetal con los cuales se pueda alimentar a un mayor número de personas a un menor precio, ya que el estado socioeconómico de la población impide que puedan tener acceso a otras fuentes. También se han desarrollado nuevos estudios en los cuales se puedan obtener fuentes de proteína dirigidas específicamente para animales para poder dar un mejor uso a la producción de vegetación que pueda ser consumida por seres humanos.

La hoja de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*, *ssp aconitifolius*) llama la atención entre la vegetación del área centroamericana, mostrando ser una muy buena fuente de proteína. Esta hoja, originaria del área de Mesoamérica

solía ser consumida en la región, pero la tradición se ha ido perdiendo debido a los cambios culturales en los hábitos de alimentación. Se ha encontrado que es excelente fuente de Vitamina C, sales de Hierro, Calcio, Vitamina A. Su alto contenido proteico (en comparación a otro tipo de follajes), hace que el estudio de esta planta sea de vital uso ya que permitiría establecer los usos que se le pueden dar a la hoja a nivel industrial, pudiendo ser esto una parcial solución al hambre que afecta las áreas rurales de Guatemala, y al mundo en general.

El estudio de posibles formas de aislar la proteína de la hoja de Chaya permitiría la elaboración de productos que fueran altos en contenido proteico, con el beneficio que conlleva el consumo de proteínas de origen vegetal. A partir de los datos obtenidos, podrá establecerse los posibles usos de la hoja para su incorporación en otro tipo de alimentos. También permitiría indicar los posibles usos de la proteína en caso de que esta mostrara una característica tecnológica que la destacara.

V. OBJETIVOS

A. GENERALES

Establecer las condiciones de extracción y características generales de la proteína foliar de la hoja de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*).

B. ESPECÍFICOS

- Establecer una metodología para la extracción de proteína de hoja de chaya utilizando su punto Isoeléctrico.
- Determinar la funcionalidad tecnológica de la proteína de hoja de chaya.

VI. METODOLOGÍA

A. PREPARACIÓN DE LAS HOJAS

1. Cosecha de las hojas de Chaya. Para la realización del presente estudio se trabajó con follajes de hoja de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) variedad Estrella. Las hojas fueron cortadas al azar de las plantaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, en la sede del Programa Educativo del Sur (UVG-PROESUR) en Escuintla.

2. Selección. Luego de recibidas las hojas, éstas fueron seleccionadas, teniendo preferencias por las hojas grandes sobre las hojas pequeñas o que tenían apariencia joven. Se eliminaron los pecíolos, quedando únicamente el limbo y las nervaduras.

3. Secado y triturado. Las hojas fueron secadas en secadores de aire marca NESCO a 45° C por espacio de 4 horas. Seguidamente las hojas fueron trituradas manualmente y pasadas por tamiz para unificar tamaño.

B. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR

1. Solubilidad de proteína en relación a pH y determinación de punto isoeléctrico. Se tomaron 11 muestras de 3.0 g de hoja de chaya seca chaya seca y se colocaron en tubos para centrífuga. Se les agregó 15 mL de solución de hidróxido de sodio al 0.1 N, alcanzando cada muestra un pH de 10. Luego se ajustó cada muestra al pH a analizar utilizando para ello solución de hidróxido de sodio al 0.1 N y solución de ácido clorhídrico al 0.1 N. Cada muestra se llevó a un volumen final de 50 mL utilizando agua destilada y a continuación se centrifugaron por 10 minutos.

Finalmente se procedió a cuantificar la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el método de Bradford, descrito a continuación:

α. Método de Bradford para proteínas solubles

• Preparación de reactivo de Comassie

1. Pesar 50 mg de azul de Comassie G-250
2. Agregar 25 mL de Etanol, agitar continuamente (evitar la formación de grumos)
3. Añadir 50 mL de Ácido fosfórico 80%
4. Agitar durante 30 min.
5. Llevar a 100 mL con agua deionizada y agitar
6. Aforar a 500 mL con agua destilada
7. Filtrar

• Determinación de la proteína soluble

8. Preparar una serie de diluciones de BSA en agua consistiendo en las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 1.75 y 2.0 mg/mL.

9. Transferir en triplicado, 0.1 mL de cada estándar o de cada muestra (sobrenadante) a tubos limpios y secos.
10. Agregar 5 mL de Comassie.
11. Mezclar en Vortex.
12. Incubar a temperatura ambiente por lo menos 20 min.
13. Leer absorbancia a 595 nm contra un blanco sin proteína (agua destilada)
14. Construir la curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas y las concentraciones de las soluciones preparadas.
15. Determinar la regresión lineal que relaciona la curva de calibración.
16. Calcular la cantidad de proteína soluble del extracto utilizando la regresión lineal obtenida.

Los resultados se expresaron como mg de proteína contra pH. Se estableció el punto isoelectrico cuando en el valor de pH analizado se presentara una menor concentración de proteína en solución.

2. Condiciones de extracción de proteína foliar. Utilizando los resultados de la solubilidad por diferencia de pH (6.2.1), se procedió a realizar un extracto de proteína.

a. Relación muestra-solvente. Se tomaron tres muestras de 3 g de hoja seca en tubos de centrifuga y luego se les agregó 15, 30 y 45 mL de solución de hidróxido de sodio al 0.1 N respectivamente para luego agitarlos fuertemente por 5 minutos. Luego se llevaron a 50 mL con agua destilada y se midió la cantidad de proteína solubilizada de acuerdo a la relación muestra-solvente, por medio del método de Bradford. Se tomó como el mejor rendimiento la relación que logre la mayor cantidad de proteína extraída por mililitro.

b. Relación de tiempo de extracción. Se procedió a tomar tres muestras de 3 g de hoja seca en tubos de centrifuga y luego se le

agrega la cantidad de solvente que mostró mayor rendimiento en el inciso anterior. Se procedió a agitar las muestras por 10, 20 y 30 minutos respectivamente y luego los sobrenadantes fueron analizados por el método de Bradford. Se tomó como tiempo óptimo el menor tiempo en el que se alcanzó una mayor cantidad de proteína extraída.

c. Relación De Temperatura De Extracción. Se procede a tomar tres muestras de 3 g de hoja seca en tubos de centrifuga y luego se le agrega la cantidad de solvente que mostró mayor rendimiento en el inciso 6.2.2.1. Se procedió a agitar las muestras por el tiempo que presentó un mayor rendimiento en el inciso anterior, llevándolas a 20, 30 y 40° C respectivamente. Los sobrenadantes fueron analizados por el método de Bradford. Se tomó como temperatura óptima el valor en el que se alcanzó una mayor cantidad de proteína extraída.

3. Extracción de proteína foliar. Se tomaron las muestra de hoja seca de chaya y utilizando las condiciones de tiempo, temperatura y solvente óptimas se procedió a solubilizar la proteína. Seguidamente, se centrifugaron por 15 minutos la mezcla para obtener el sobrenadante con la proteína solubilizada. Se procedió a realizar una segunda extracción utilizando la mitad del solvente y prensando los residuos para filtrar la mezcla con el fin de asegurar que se extrajera la mayor cantidad de proteína. Se recolectó todo el sobrenadante y se cambió el pH del mismo hasta el punto isoeléctrico (previamente determinado). Luego se dejó reposar la muestra por 12 horas en refrigeración (5° C) para luego centrifugarse por 10 minutos.

Finalmente se descartaron los sobrenadantes y se recolectaron todos los precipitados para deshidratarse en secador de aire a 40° C por 12 horas.

4. Determinación del rendimiento. Utilizando los datos previamente recabados, se determinó el rendimiento del proceso como:

Ecuación 1: Determinación de rendimiento de proceso de extracción de proteína foliar

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{gramos de proteína extraída}}{\text{gramos de muestra}}$$

(Sánchez, 2005)

C. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA

Las características tecnológicas se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Gudiel (2006):

1. Solubilidad del aislado en función de pH. Se tomó 2.5 gramo de proteína y se prepararon 250 mL de solución al 1% de proteína a pH 7 (utilizando soluciones de Hidróxido de Sodio y Ácido Clorhídrico para ajustarla, previo a aforar).

Se tararon 6 tubos de centrifuga y se vertieron en ellos 10 mL de solución de proteína al 1%. Se ajustó cada tubo a pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7 y 7.5 respectivamente. Se mezcló cada tubo fuertemente y se dejó reposar por 5 minutos para luego mezclarnos nuevamente por 5 minutos. Finalmente se centrifugaron los tubos por 5 minutos y se analizaron los sobrenadantes por el método de Bradford para establecer la solubilización de proteína, expresándose los resultados como una gráfica de concentración de proteína (mg/mL) vrs pH. El pH que muestre un mayor grado de solubilización será el utilizado para las pruebas subsiguientes, debiéndose preparar una nueva solución de proteína al 1.0% ajustada al pH elegido. (Gudiel, 2006)

2. Capacidad de emulsión. Se tomaron 50 mL de solución de proteína al 1.0% y se colocan con 25 mL de aceite de girasol para batirlos por 2 minutos a velocidad máxima. Se añadió aceite con una bureta a medida que

continuaba el batido hasta romper la emulsión. La capacidad de emulsión se expresa como el volumen total de aceite por gramo de proteína utilizada.

3. Estabilidad de emulsión. Se tomaron 25 mL de solución de proteína al 1.0% y se colocan junto con 75 mL de aceite de girasol en una batidora. Se baten a velocidad máxima por 3 minutos para luego transferir la mezcla a un beaker de 250 mL. Se guardó la emulsión en frío y a temperatura ambiente para observar la estabilidad y los cambios ocurridos a luego de 1, 3, 9 y 21 minutos. (Gudiel, 2006)

4. Expansión y estabilidad de espumas. Se tomaron 100 mL de solución de proteína al 1% y se batió por 5 minutos a velocidad máxima. Luego se procedió a transferir la espuma a una probeta, midiendo el líquido y de espuma. Se dejó reposar la espuma en la probeta y se tomaron los volúmenes de espuma a 15, 30, 45 y 60 minutos para calcular la estabilidad y expansión de la espuma.

Ecuación 2: Estabilidad de espuma

$$\text{Estabilidad de espuma} = \frac{\text{Volumen de espuma a los 60 minutos}}{\text{Volumen de espuma a los 0 minutos}} * 100$$

Ecuación 3: Expansión de espuma

$$\text{Expansión de espuma} = \frac{\text{Volumen de espuma a los 0 minutos} * 100}{\text{Volumen de la solución original}}$$

5. Absorción de agua y aceite. Se tomó 1 g del aislado y se le agregó 50 mL de agua destilada, se agitó por un minuto para luego dejarlo reposar por 30 minutos y se centrifugó por 20 minutos. Se decantó el agua dejando el tubo invertido durante 5 minutos, y finalmente se pesó el tubo con gel. La diferencia del peso del tubo gel y el tubo con la muestra seca fue el peso de agua absorbida. El resultado se informó en mL de agua por gramo de aislado.

La densidad del agua se asumió de 1 g/mL, realizándose la medición a temperatura ambiente.

Para la determinación de absorción de aceite se realizó el mismo procedimiento, utilizando aceite de girasol en sustitución de agua destilada. La capacidad de absorción de aceite se expresó como mL de aceite absorbido por gramo de aislado. La densidad del aceite se asumió como 0.89 g/mL a temperatura ambiente.

Ecuación 4: Capacidad de absorción

$$\begin{aligned} \text{Capacidad de absorción} &= \frac{\text{peso de solvente absorbido} * \frac{1}{\rho \text{ del solvente}}}{\text{Peso de la muestra}} \\ &= \frac{\text{mL de solvente absorbido}}{\text{g de proteína}} \end{aligned}$$

D. CARACTERÍSTICAS DEL AISLADO

1. Humedad. Se lavaron y secaron completamente cápsulas de aluminio, dejándolas en horno y luego en secadora hasta alcanzar un peso constante. El horno se estabilizó en 135° C. Seguidamente se pesaron 2 g de la muestra en una de las cápsulas de aluminio previamente llevadas a peso constante, esparciendo la muestra de manera uniforme dentro de la misma. Se colocaron las cápsulas dentro del horno y se secaron hasta que la muestra alcanzara un peso constante. Finalmente se dejaron secar las muestras en desecadora para luego enfriar y pesar.

Ecuación 5: Porcentaje de humedad

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso de muestra humedad} - \text{peso de muestra seca}}{\text{peso de muestra húmeda}} * 100$$

(Método AOAC No. 27.005, 1975)

2. Proteína (método Kjeldahl). Se pesaron 0.25 g de muestra en el balón de Kjeldahl de 1000 mL, y se le agregaron 1.5 g de sulfato, 0.1 g de óxido de mercurio y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se puso el balón a digerir en hornillas en posición inclinada, manteniéndose caliente hasta que la muestra quedara clara (aproximadamente 30 minutos) para luego enfriar la mezcla.

Se prepararon por aparte Erlenmeyer de 250 mL con 10 mL de ácido bórico al 4% y 3 gotas de indicador rojo de metilo y se colocaron al final del tubo condensador, cuidando que la punta del tubo condensador estuviera siempre dentro de la solución de ácido bórico.

Se agregaron 10 mL de agua al balón que contenía la muestra digerida y se agitó hasta que estuviera completamente disuelta. Se agregó la muestra al aparato destilador y ya en el aparato se agregaron 13 mL de hidróxido de sodio al 40% con 5 ml de tiosulfato de sodio penta hidratado al 8%. Se encendió el aparato y se colectaron 80 mL del destilado. Se retiró el recipiente y se tituló el destilado en el Erlenmeyer de 250 mL con solución de ácido clorhídrico al 0.1 N estandarizado hasta que se diera el cambio de color.

Ecuación 6: Porcentaje de proteína

$$\% \text{ proteína} = \left(\frac{\text{volumen de solución HCl estandarizado usado para titular} * \text{normalidad de HCl} * 0.014}{\text{peso de la muestra}} \right) * 100 * 6.25$$

(Método AOAC No. 14.067, 1975)

*** Se asumió que el nitrógeno no proteico en las muestras no representaba un aporte significativo para el análisis, por lo que se calculó el porcentaje proteico directamente.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron realizados en triplicado, a excepción del análisis de solubilidad de la proteína en función de pH y las cuantificaciones de proteína por análisis Kjeldahl, los cuales se realizaron en duplicado. Para el correcto análisis de los datos recabados se procedió al cálculo de media y desviación estándar para cada uno de los estudios. Para ello se utilizaron las ecuaciones:

Ecuación 7: Media

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

(Skoog, 2005)

Ecuación 8: Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

(Skoog, 2005)

Ecuación 9: Suma de cuadrados de Varianzas

$$(x \pm \sigma_1) + (y \pm \sigma_2) = z \pm \sigma_3$$

$$z = x + y$$

$$\sigma_3 = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$$

(Skoog, 2005)

Los promedios y desviaciones estándares para la representación de los resultados fueron calculados por una hoja electrónica de cálculo del programa Microsoft Excel XP. Para los análisis de las condiciones de extracción de proteína foliar (Sección 2) se aplicó un análisis de varianza de mono factorial, ANOVA, para el estudio de cada condición y se calculó por medio de la opción de análisis de datos en herramientas de una hoja electrónica de cálculo del programa Microsoft EXCEL XP.

VII. RESULTADOS y DISCUSIÓN

A. DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA FOLIAR

Para el presente estudio se recolectaron inicialmente hojas frescas de Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) variedad Estrella. Estas fueron seleccionadas, tomando únicamente las que no fueran demasiado jóvenes o que fueran notoriamente viejas (pudiendo tener deterioro, coloraciones pardas o amarillentas y apariencia frágil). Esto con el fin de poder obtener la mayor cantidad y mejor calidad de proteína a partir de las mismas. No se estableció preferencia por ninguno de los estratos de la planta, utilizando hojas de los tres, para establecer las características globales del follaje. Al seleccionar las hojas también se eliminaron los pecíolos que pudieran haber quedado. Estos se eliminan dado que se ha establecido en estudios previos que el contenido de la proteína foliar se encuentra en su mayor parte en la lámina, en menor grado en las nervaduras y por último en los pecíolos.

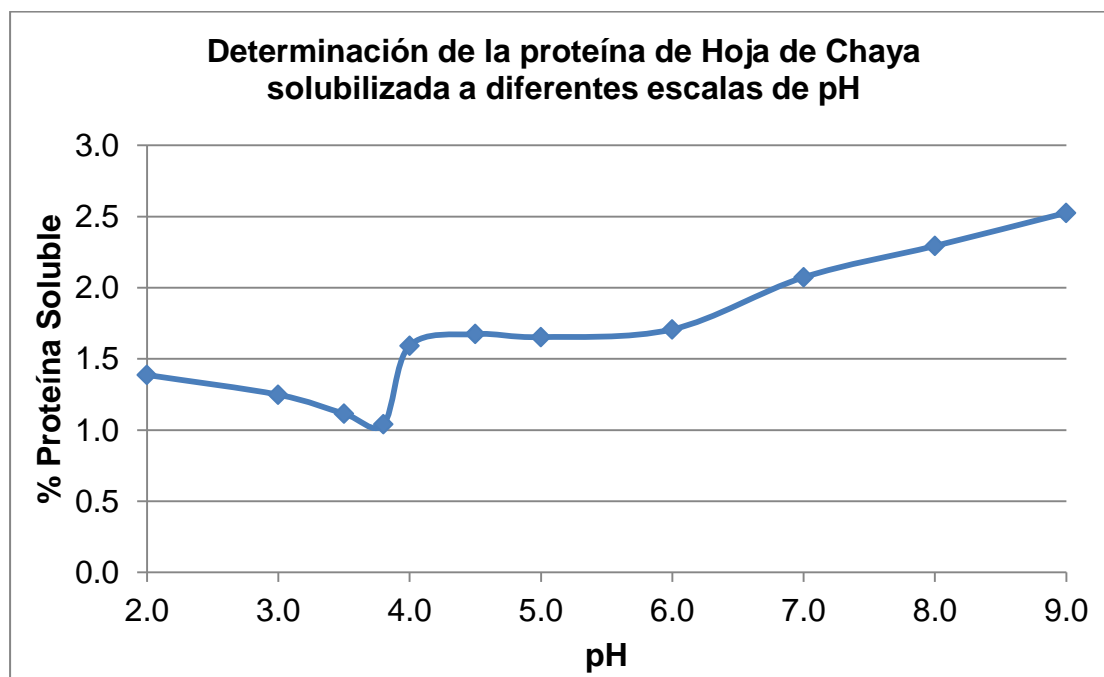
Para poder realizar el estudio de manera estandarizada fue necesario secar las hojas. Las condiciones de humedad de las hojas generan variabilidad en el análisis dado que si únicamente se utilizaran extractos frescos estos se encontrarían ligados de manera directa a la humedad de las plantas de donde fueron colectados los follaje y la época del año (estacionalidad), generando variabilidad en caso que se deseara realizar un estudio similar. Para eliminar el posible error que pudiera agregar este factor fueron secadas las hojas. El proceso se llevó a cabo a 45° C, ya que es la temperatura más alta a la cual se puede secar la hoja sin degradar las proteínas en ella. De hecho, a esa temperatura algunas proteínas podrían haber sido desnaturalizadas, pero se ha establecido que una parcial desnaturalización de fracciones proteicas en una muestra favorecen a la solubilización de las mismas.

Dado que lo que se deseaba con el proceso de extracción era la solubilización de las mismas, el efecto era deseado.

Seguido del secado se procedió a triturar las hojas. Este proceso implicaba un paso sumamente importante, debido a las condiciones a las cuales se iba a someter posteriormente la hoja seca necesitaban de una disminución de tamaño hasta partículas muy pequeñas. Uno de los factores que siempre deberá tomarse en cuenta en los procesos de extracción es el área superficial o área de contacto solvente-soluto. En estos procesos se busca maximizar dicha área ya que favorece la interacción entre el solvente y el soluto que desea acarrear para obtener mayores rendimientos. En este caso, las hojas fueron trituradas y tamizadas hasta obtener un polvo, de manera que la extracción se diera de forma eficiente.

Posteriormente se realizó el análisis de solubilidad de proteína en relación a pH para la determinación del punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico de las proteínas se encuentra en el valor de pH en el cual la carga neta de la proteína es igual a 0. Esto implica que las cargas positivas y negativas se anulan entre sí, sobre todo si se refieren a las cargas fijas. Las cargas disociables son las que varían al estar o no en forma protonada (con iones hidrógeno). Se debe recordar siempre que el punto isoeléctrico varía de acuerdo a la composición estructural de la proteína, ya que son los residuos de aminoácidos los que darán las cargas a la proteína. También se toma en cuenta el efecto de la conformación proteica, ya que en muchos casos es el plegado de la proteína lo que mantiene neutralizados ciertos residuos al estar ligados con residuos de cargas opuestas en la misma proteína. Al estar expuestos y en contacto con soluciones de pH variable, podría verse afectada su solubilidad. Teniendo esto en cuenta, se procedió a realizar la determinación de la curva de solubilidad.

Figura 2: Curva de solubilización de la proteína foliar de hoja de Chaya



A partir de la Figura 2 se puede observar como aproximadamente en pH 3.8 la proteína no es tan soluble, estableciéndose éste como punto isoeléctrico.

Para el presente estudio la determinación del punto isoeléctrico fue vital ya que el método de aislamiento de la proteína fue el de solubilización y precipitación por diferencia de pH, llevándola a pH donde fuera soluble y luego cambiarlo hasta el punto isoeléctrico para recolectar el precipitado. Como se observa en la gráfica, la proteína de la hoja de chaya fue soluble conforme aumentó el pH. Se estableció que para la solubilización de la proteína se debía llevar a pH 10 ya que en ese punto la proteína era mucho más soluble. Cabe aclarar que no se optó por un pH más básico debido a que en estudios previos se reportó la racemización de aminoácidos en valores de pH muy altos (básicos), la cual podría promoverse por el tiempo requerido para extraer la proteína y por la agitación, pudiendo dañar la proteína irreversiblemente en el aislado.

Para el diseño del proceso de extracción se debe también tomar en cuenta la optimización de recursos, como en todo proceso ingenieril, dado que el desperdicio de tiempo, energía o recursos implica pérdidas. Es por ello que se analizaron los factores de tiempo, temperatura y relación solvente-muestra de la extracción. Debido que lo que se necesitaba era tener las condiciones que fueran más eficientes, se esperaba obtener la mayor cantidad de proteína con el menor gasto posible (tiempo, energía o recursos). Fue necesario realizar análisis de varianza entre los datos presentados para establecer entre que grupos sí se encontraron diferencias significativas. Como solvente se utilizó solución de hidróxido de sodio al 0.1 N, ya que permitiría el cambio de pH hasta 10 sin aportar sales significativamente que pudieran afectar la exactitud del estudio.

Cuadro 2: Condiciones de extracción para proteína foliar de hoja de Chaya seca

Condición	Valor
Relación Muestra- solvente	10 mL/g
Tiempo	20 minutos
Temperatura	30 ° C

Para el análisis de Relación de Muestra- Solvente se establecieron las relaciones como mL de solvente por gramo de muestra, eligiendo las relaciones de 5, 10 y 15 mL/g. Para dichos procesos se tomó el 50% del solvente para realizar la primera extracción (solubilización, agitado y luego el 50% restante se dividió en dos partes para hacer dos lavados finales. Al final se recolectaron los tres lavados y estos fueron los que se analizaron por el método de Bradford. Se analizaron los datos y se obtuvieron promedios de la proteína solubilizada. Se realizó un análisis de varianzas entre grupos y se encontró (Cuadro 11, página 45) que el valor F fue de 116.262, que es mayor que el valor crítico para F de 7.709, pudiendo afirmarse que sí hay diferencias significativas entre grupos.

Se observó (Cuadro 10, página 44) que el mayor porcentaje de proteína solubilizada se obtuvo en las relaciones 10 y 15 mL/g, $5.448 \pm 0.217\%$ y $5.699 \pm 0.227\%$. Teniendo promedios de proteína soluble tan cercanos se realizó un análisis de varianza para establecer si había diferencias significativas entre los grupos. De acuerdo al Cuadro 12 (página 46) el valor de F fue de 1.918, que comparado con el valor crítico para F de 7.709 es menor. Con esto se concluyó que no habían diferencias significativas entre los grupos de 10 y 15 mL/g, decidiendo utilizar la relación de 10 mL/g para las extracciones ya que logra obtener la mayor cantidad de proteína y, comparativamente, la menor cantidad de solvente para tal resultado (ya que no hay diferencia significativa entre lo que se obtiene con la relación de 10 o de 15 mL/g). Además es lógico que no fuera la relación de 5 mL/g por la probable saturación del solvente, evitando que toda la proteína pudiera solubilizarse de manera eficiente.

Para el análisis de Relación de Tiempo de Extracción se establecieron las relaciones como tiempo de agitación de la muestra con el solvente. Este tiempo es vital ya que establecerá los límites de tiempo mínimo para extraer la mayor cantidad de proteína. Se eligieron las relaciones de 10, 20 y 30 minutos ya que el proceso de solubilización de proteína es considerablemente rápido. Habiendo realizado ya el análisis de relación de solvente- muestra, se utilizó el método previamente descrito de tres lavados con una relación de 10 mL de solvente por gramo de hoja seca. Se colocaron las muestras a analizar y se agitaron por el tiempo establecido, filtrando inmediatamente los Residuos para obtener únicamente los sobrenadantes en el tiempo establecido para ser analizados por el método de Bradford.

Se analizaron los datos y se obtuvieron promedios de la proteína solubilizada. Se realizó un análisis de varianzas entre grupos y se encontró que (Cuadro 14, página 48) el valor F fue de 19.341, que

es mayor que el valor crítico para F de 5.143, pudiendo afirmarse que sí hay diferencias significativas entre grupos.

Se observó (Cuadro 13, página 47) que el mayor porcentaje de proteína solubilizada se obtuvo a 20 y 30 minutos, $5.134 \pm 0.348\%$ y $5.390 \pm 0.223\%$. Teniendo promedios de proteína soluble tan cercanos se realizó un análisis de varianza para establecer si había diferencias significativas entre los grupos. De acuerdo al Cuadro 15 (página 49), el valor de F fue de 1.157 que comparado con el valor crítico para F de 7.709 es menor. Con esto se concluyó que no habían diferencias significativas entre los grupos de 20 y 30 minutos, decidiendo utilizar la relación de 20 para las extracciones ya que logra obtener la mayor cantidad de proteína de manera eficiente sin prolongar el proceso, además de tomar en cuenta que no hubo diferencia significativa entre la extracción de 20 y 30 minutos. También se tomó en cuenta el peligro de racemización previamente mencionado por lo que se buscaba obtener el tiempo más corto con el mayor rendimiento.

Para el análisis de Relación de Temperatura de Extracción se establecieron las relaciones como la temperatura a la cual debía estar el solvente para obtener la mayor cantidad de proteína solubilizada. Se eligieron las temperaturas de 20°, 30° y 40° C. No se optaron por temperaturas más altas ya que podrían generar desnaturalizaciones irreversibles, ni temperaturas más bajas ya que los procesos de extracción a temperatura ambiente o mayor suelen ser más eficientes. Habiendo realizado ya el análisis de relación de solvente- muestra y tiempo de extracción, se utilizó el método previamente descrito de tres lavados con una relación de 10 mL de solvente por gramo de hoja seca por 20 minutos. Se colocaron las muestras a analizar y se agitaron por el tiempo establecido, cuidando que la temperatura se mantuviera en el valor deseado. Los sobrenadantes fueron analizados por el método de Bradford.

Se analizaron los datos y se obtuvieron promedios de la proteína solubilizada. Se realizó un análisis de varianzas entre grupos y se encontró que (Cuadro 17, página 51.) el valor F fue de 3.119, que es menor que el

valor crítico para F de 5.143, pudiendo afirmarse que no hay diferencias significativas entre grupos. Se optó por realizar la extracción a 30° C ya que obtuvo levemente más que a 20° C, y no es tan riesgoso como a 40° C (en términos de desnaturalización de proteínas por temperatura).

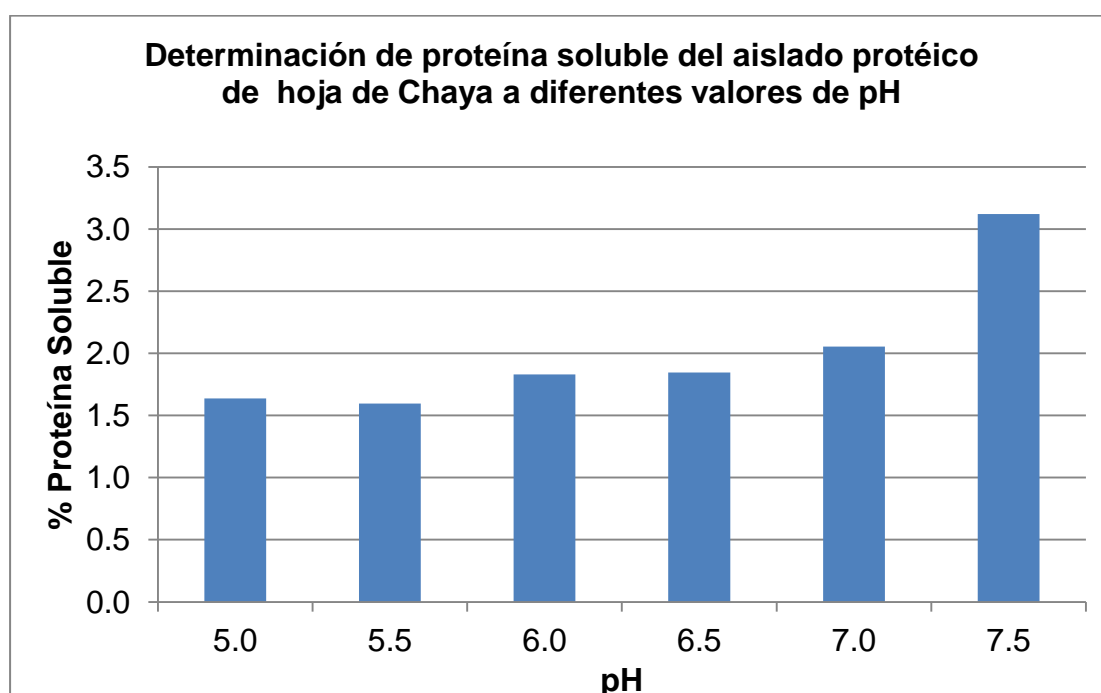
Finalmente con las condiciones establecidas se procedió a realizar la extracción de proteína. Para este proceso se secaron 11,340 ± 0.03 g de chaya fresca obteniéndose 1,600 ± 0.01 g de chaya seca. Se procesó la chaya seca con las condiciones previamente establecidas, para luego pasar la mezcla a pH 3.8 y favorecer la precipitación de la proteína. Con el fin de favorecer la floculación espontánea de la misma se dejó reposar en refrigeración (5° C) por 12 horas para luego centrifugarse por 10 minutos, recolectar y secar en secador de aire por 40° C por 12 horas. Se obtuvo 69.8 ± 0.01 g de aislado de proteína de chaya. Si se toma en relación a la Chaya Fresca, el rendimiento del proceso sería de $0.616 \pm 8.20 \cdot 10^{-5}\%$, mientras que si se establece a partir de la Chaya Seca el rendimiento sería de $4.363 \pm 6.35 \cdot 10^{-4}\%$. El rendimiento en cualquiera de los casos fue sumamente bajo. Tomando en cuenta los análisis de proteína, se recuperó únicamente un 2.89% de la proteína total de la hoja, quedando gran parte aún en los Residuos. Comparando con estudios anteriores, sí se ha logrado obtener mejores rendimientos de éste proceso, logrando obtener hasta 58.32 % de proteína foliar (Spell, 2011) pero realizándolo en fresco (sin secar la hoja) y licuando la hoja fresca con los solventes. El tamaño de partícula logrado al licuar la hoja fresca junto con el solvente probablemente logra generar un área de contacto efectiva mucho mayor que la generada al secar, triturar y agregar solvente. Hay que notar también que al momento de agregar el solvente a la muestra de chaya hecha polvo esta se reconstituyó de alguna forma, pudiendo observarse pedazos considerablemente grandes de hoja que probablemente no permitieron que la extracción se diera al ni área de contacto ni ruptura de las estructuras celulares del follaje que permitiera la liberación de las proteínas. Se observa que

este proceso no es entonces el adecuado ya que no favorece la extracción total de la proteína.

B. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE LA PROTEÍNA

Inicialmente se procedió al análisis de la solubilidad de la proteína en el aislado. Debido a que a lo largo del proceso la proteína cambia su conformación al variar el pH de un extremo de la escala al otro, podía pensarse que la conformación cambiaría de tal forma que el comportamiento de solubilidad en relación al pH pudiera variar. Sin embargo, de acuerdo a lo observado en la Figura No. 3 puede verse que mantiene el mismo comportamiento que en la solubilización de la proteína de hoja de Chaya. Los valores de pH elegidos para este análisis fueron elegidos dado que en este rango se esperaba que estuvieran algunos alimentos en los cuales se pudiera agregar la proteína. Sin embargo, dado que su solubilización fue a valores considerablemente básicos (comparativamente en términos de los rangos usuales para alimentos), la adición de proteína de Chaya quedaría restringida a alimentos con pH entre 7 y 7.5.

Figura 3: Solubilización de la proteína del aislado proteico a diferentes valores de pH



Se eligió el valor de pH de 7.5 dado que la solubilización es mayor. Esto implica que la molécula se encuentra interactuando en mayor grado en solución y no precipitaría.

Cuadro 3: Características tecnológicas del aislado proteico de hoja de Chaya

Característica	Valor
Capacidad de emulsión	10.067 ± 0.231 mL aceite/g aislado
Expansión y estabilidad de espumas	ND
Absorción de agua	0.940 ± 0.140 mL agua/g aislado
Absorción de aceite	1.801 ± 0.168 mL aceite/g aislado
pH soluble	7.5 ± 0.05

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro No. 3 se observa que la capacidad de emulsión del aislado fue de 10.067 ± 0.231 mL aceite / g aislado. Este valor es considerablemente bajo si se denota que en otros estudios se ha demostrado que proteínas de soya o huevo muestran capacidades emulsificantes mayores a 300 mL/ g aislado. De esta cuenta puede establecerse que la proteína aislada de hoja de chaya no es útil como agente emulsificante.









Para las pruebas de expansión y estabilidad de espuma no se obtuvieron datos debido a que no se logró formar la espuma. (Ver Figura 9, Página 59). Las proteínas contenidas en el aislado no son capaces de generar las películas que forman las estructuras de una espuma, por lo cual no se recomienda tampoco su uso como aditivo para esta función.

En lo que respecta a la capacidad de absorción de agua y aceite, se obtuvieron valores de 0.940 ± 0.140 mL agua/g aislado y 1.801 ± 0.168 mL aceite/g aislado respectivamente. Los valores también denotaron ser considerablemente bajos ya que, si se quisiera

utilizar este tipo de proteínas para fijar agua o aceite y dar cuerpo a un alimentos, probablemente sería muy caro y se necesitaría de cantidades de proteínas demasiado grandes que pudieran afectar también el color, olor o sabor del producto elaborado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro No. 4 para la prueba de estabilidad de la emulsiónse pudo observar que sí se formó una emulsión, aunque no totalmente estable ya que a medida que transcurrieron 12 minutos, casi un cuarto del volumen total ya se había separado.

Cuadro 4: Estabilidad de la emulsión

Tiempo (minutos)	Ambiente (20° C)	Frío (5° C)
1	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.
3	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.
6	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.	 A 150 mL beaker showing a slight separation of a lighter layer at the top.
12	 A 150 mL beaker containing a uniform yellow emulsion.	 A 150 mL beaker showing significant separation of a lighter layer at the top, with a darker yellow layer below.

Pudo observarse que no importando la temperatura, la proteína no logró soportar la tensión de la emulsión cediendo ante el efecto de coalescencia de la fase lipídica (en este caso, el aceite de girasol)

A partir de los datos obtenidos se puede establecer que el aislado proteico preparado no es útil tecnológicamente, dado que no muestra propiedades que puedan ser aprovechadas en la preparación de un alimento, ya que otros aislados generan mucho mejores efectos. Podría especularse sobre el tipo de proteínas que componen el aislado y si estas fueran únicamente de tipo estructural. Siendo así, al romperse en las hojas o durante el procesamiento, éstas perderían sus características funcionales y serían de valor únicamente por su calidad nutricional (específicamente por su composición de aminoácidos). Sin embargo esto no puede afirmarse con certeza dado que no se realizaron estudios que pudieran establecer con total exactitud que componentes conforman la proteína de la hoja de chaya y que componentes se encontraron presentes en el aislado, de manera que se pudiera verificar si es la proteína en si y no el proceso, o viceversa, lo que genera la falta de características tecnológicas aceptables.

C. CARACTERÍSTICAS DEL AISLADO Y LA HOJA

Finalmente se procedió a analizar las características de los componentes del aislado y compararlos con la hoja fresca. El aislado generado fueron láminas cristalinas de color Café oscuro, sumamente higroscópicas, con aroma a pasto. Del Cuadro No. 5 se puede observar que el contenido de proteína del aislado es considerablemente bajo, para ser un aislado. Se evaluó el proceso para establecer las posibles fallas ya que en estudios anteriores se alcanzaron rendimientos de hasta 58.71% (Spell, 2011).

Cuadro 5: Características de proteína y humedad de hoja de Chaya y aislado proteico de hoja de Chaya

Análisis	Hoja fresca	Aislado
Humedad (%)	79.11 ± 1.01	7.99 ± 1.24
Proteína (%)	7.656 ± 0.114	31.96 ± 0.054

El efecto más significativo pudo haber sido el haber utilizado hoja de Chaya seca triturada y no un extracto fresco. Al haber un proceso de secado, la proteína queda con sitios expuestos que probablemente ante el contacto con oxígeno del ambiente, podrían quedarse ligados de manera irreversible evitando que puedan salir de las estructuras de la hoja seca triturada. En el estudio antes mencionado se lograron obtener altos contenidos de proteína en los extractos al licuar las hojas frescas. Esto permitió la liberación total de las proteínas estructurales y enzimas, que constituyen la porción primordial en la proteína foliar. En este estudio, aunque el tamaño de partícula de la chaya seca fue pequeña (pasándola por tamices), al momento de añadir el solvente se observó que las partículas obtenían un gran tamaño, como si estas funcionaran como una esponja que se hidrata o seca sin perder la estructura. Al no haber una total disgregación de las estructuras las proteínas no fueron liberadas en su totalidad y la extracción fue ineficiente.

Se deberá tomar en cuenta para un posterior rediseño del proceso el licuar la hoja de Chaya previo al secado para así obtener una hoja completamente triturada previa a cualquier procesamiento para favorecer la liberación de todas las proteínas o bien, el establecer si el secado es una limitante para la realización de procesos de extracción proteica.

VIII. CONCLUSIONES

- Se establecieron como condiciones óptimas de extracción para el aislamiento de proteína de hoja de chaya a partir de hoja seca un proceso a 30° C, por 20 minutos con una relación muestra-solvente de 10 mL de solvente/gramo de muestra. El rendimiento presentado fue bajo por lo que se considera el proceso como poco eficiente.
- Se encontró que el punto Isoeléctrico de la proteína foliar es a pH 3.8 ± 0.01, ya que se da la mayor proporción de precipitación de proteína en el proceso de extracción.
- El comportamiento de la proteína, en términos de la solubilización de la misma a diferentes valores de pH, fue el mismo en la hoja como en el aislado, indicando que no hubieron cambios sustanciales en la proteína por el procesamiento.
- La proteína mostró una capacidad emulsificante de 10.067 ± 0.231 mL aceite/g aislado, una absorción de agua de 0.940 ± 0.140 mL agua/g aislado, una absorción de aceite de 1.801 ± 0.168 mL aceite/g aislado y ninguna capacidad de expansión o estabilidad de espuma, mostrando que sus características tecnológicas no son variadas y no lo hacen un buen aditivo (en términos tecnológicos).

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar un fraccionamiento de la proteína para establecer los componentes de la misma.
- Establecer las condiciones para preparar un aislado a partir de extractos frescos de hoja de Chaya y analizar sus características tecnológicas para establecer si su funcionalidad se encuentra ligada únicamente a la nutrición y no a la tecnología alimentaria.
- Establecer la presencia de componentes toxicológicos en el aislado proteico.
- Evaluar la inclusión del aislado en una matriz alimentaria (a nivel químico, tecnológico y organoléptico).
- Analizar la actividad antioxidante del aislado de proteína.

X. BIBLIOGRAFÍA

Badui, Salvador, 2006, *Química de los Alimentos* 4ª edición, Pearson Educación, México, 736 páginas

Cifuentes, R.V., Molina, A., 2001, *Impacto de Varios Factores Agronómicos Sobre la Reproducción, Producción de Biomasa y Composición Químicas de Hojas y Cogollos de Chaya (Cnidoscolus Aconitifolius; Euphorbiaceae)*. Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología SENACYT, Guatemala, 71 Páginas

Evaluación de cuatro selecciones de chaya (Cnidoscolus Aconitifolius; Euphorbiaceae) y dos niveles de defoliación en cuatro regiones de Guatemala, y aceptabilidad de sus hojas y cogollos en humanos, 2003 Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala, 50 páginas

Fernández Reyes, Emilio, Galván Cejudo, Aurora 2003 *Métodos para la cuantificación de proteínas* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Argentina, 7 páginas

Gudiel Aguilar, Elsa Georgina, 2006, *Preparación de un aislado de proteína del frijol Mucuna pruriens*, Universidad del Valle de Guatemala, 61 páginas

Lehninger, Albert L., Nelson, David, Cox, Michael M. 2005 *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*, United States of America, W.H. Freeman & Co, 1119 páginas

- Miller, Dennis D., Sangines Franchini, María Cristina, Torre Marina. María Covadonga 2003 *Química de los Alimentos: Manual de Laboratorio*, San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", 150 páginas
- Molina Navas, Verónica Alejandra, 2005 *Extracción de proteína foliar de maíz a los 10, 25 y 45 días de la siembra y análisis de sus aminoácidos*, Zamorano, 49 páginas
- Ross-Ibarra, Jeffrey, Molina-Cruz, Alvaro 2002 «*The Ethnobotany of Chaya (Cnidoscolus Aconitifolius ssp. Aconitifolius Breckon): A Nutritious Maya Vegetable*», *Economic Botany*, 56(4):350-365., The New York Botanical Garden, United States of America
- Sánchez de León, René Roberto, 2005, *Preparación y caracterización de un aislado proteico de la semilla de hule (Hevea brasiliensis) y su evaluación funcional*, Universidad del Valle de Guatemala, 66 páginas
- Sarmiento-Franco, L., McNab, J. M., Pearson, A. and Belmar-Casso, R., 2003, «*The effect of chaya (Cnidoscolus aconitifolius) leaf meal and of exogenous enzymes on amino acid digestibility in broilers*», *British Poultry Science*, 44 (3):458 - 463, England
- Setchell, Kenneth DR, 1998, «*Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones* », *Journal of Clinical Nutrition* 68, 1333S-1346S, United States of America
- Skoog, Douglas, West, Donald, Holler, James, Crouch, Stanley, 2005, *Fundamentos de Química Analítica, 8a Ed.*, México, Thomson Learning, 1065 Páginas

- Spell, Lucía, 2011, *Preparación y caracterización química y nutricional de la proteína foliar de la Chaya (Cnidoscolus aconitifolius)*, Universidad del Valle de Guatemala,
- Urribarí C, L., Ferrer, A., y Colina, A. (2004), « *Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (Pennisetum purpureum Schum cv. Mott)* », *Revista Facultad de Agronomía "LUZ"*, 21: 254-275, Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela
- Voet, Donald, Voet, Judith and Charles Pratt, (2009) *Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular, 2ª edición, 2ª reimpresión*, Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana, 1260 páginas

XI. APÉNDICE

A. SOLUBILIDAD DE PROTEÍNA EN RELACIÓN A pH Y DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO

Para la solubilización de proteína en relación a pH, determinación de punto isoeléctrico, determinación de condiciones de extracción, rendimiento y solubilización del aislado se determinó el porcentaje de proteína soluble por medio del método de Bradford.

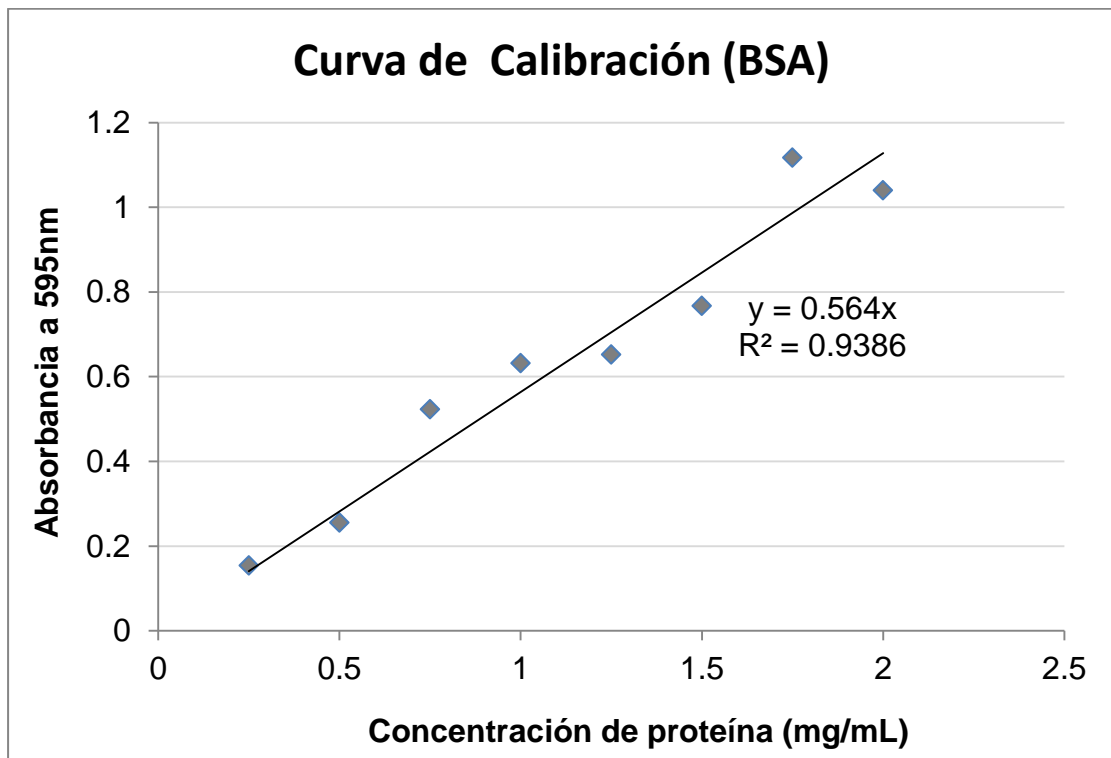
Para ello fue necesaria la preparación de una curva de calibración con Seroalbúmina Bovina (BSA).

Cuadro 6: Datos de absorbancia para curva de calibración de proteína soluble

Concentración de BSA (mg/mL)	Absorbancia a 595 nm (± 0.001)
0.25	0.154
0.5	0.255
0.75	0.523
1	0.632
1.25	0.652
1.5	0.767
1.75	1.117
2	1.04

Con los datos anteriores se elaboró una gráfica de concentración de albumina versus absorbancia y se trazó una regresión lineal (graficada y calculada por medio del asistente para gráficos de hoja electrónica de cálculo de Microsoft Excel) la cual se estableció como la curva estándar para calcular el contenido de proteína disuelta en los análisis realizados.

Figura 4: Curva de calibración de proteína disuelta



La regresión lineal calculada fue $y=0.564 x$, donde y es la absorbancia y x es la concentración de proteína BSA en mg/mL. Despejando para la concentración:

Ecuación 10: Porcentaje de proteína soluble

$$x = \frac{y}{0.564} = \text{mg proteína/mL}$$

$$\% \text{Proteína Soluble} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ de proteína} * \text{Voluen de aforo, mL} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \right)}{(\% \text{ de proteína} * \text{peso de muestra})} * 100$$

En el caso de la determinación de la solubilización de proteína de la hoja de chaya y determinación del punto isoelectrico fue necesario observar el comportamiento del porcentaje de proteína solubilizada contra distintos valores de pH

Cuadro 7: Porcentaje de solubilización de proteína de hoja de Chaya (1)

pH (±0.01)	Abs (±0.001)	concentración de proteína (mg/mL)	% Proteína soluble
2	0.169	0.300 ± 1.77*10 ⁻³	1.532 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.146	0.259 ± 1.77*10 ⁻³	1.323 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.144	0.255 ± 1.77*10 ⁻³	1.305 ± 9.07 *10 ⁻³
3	0.156	0.277 ± 1.77*10 ⁻³	1.414 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.129	0.229 ± 1.77*10 ⁻³	1.169 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.128	0.227 ± 1.77*10 ⁻³	1.160 ± 9.07 *10 ⁻³
3.5	0.089	0.158 ± 1.77*10 ⁻³	0.807 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.136	0.241 ± 1.77*10 ⁻³	1.233 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.144	0.255 ± 1.77*10 ⁻³	1.305 ± 9.07 *10 ⁻³
3.8	0.089	0.158 ± 1.77*10 ⁻³	0.807 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.154	0.273 ± 1.77*10 ⁻³	1.396 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.101	0.179 ± 1.77*10 ⁻³	0.916 ± 9.07 *10 ⁻³
4	0.164	0.291 ± 1.77*10 ⁻³	1.487 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.160	0.284 ± 1.77*10 ⁻³	1.450 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.203	0.360 ± 1.77*10 ⁻³	1.840 ± 9.07 *10 ⁻³
4.5	0.229	0.406 ± 1.77*10 ⁻³	2.076 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.175	0.310 ± 1.77*10 ⁻³	1.586 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.150	0.266 ± 1.77*10 ⁻³	1.360 ± 9.07 *10 ⁻³
5	0.185	0.328 ± 1.77*10 ⁻³	1.677 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.176	0.312 ± 1.77*10 ⁻³	1.595 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.186	0.330 ± 1.77*10 ⁻³	1.686 ± 9.07 *10 ⁻³
6	0.181	0.321 ± 1.77*10 ⁻³	1.641 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.176	0.312 ± 1.77*10 ⁻³	1.595 ± 9.07 *10 ⁻³
	0.208	0.369 ± 1.77*10 ⁻³	1.885 ± 9.07 *10 ⁻³

** Proteína en muestra: 32.60 ±0.4839%

Cuadro 8: Porcentaje de solubilización de proteína de hoja de Chaya (2)

pH (± 0.01)	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína (mg/mL)	% Proteína soluble
7	0.214	$0.379 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$1.940 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.231	$0.410 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.094 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.241	$0.427 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.185 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
8	0.228	$0.404 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.067 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.236	$0.418 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.139 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.295	$0.523 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.674 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
9	0.297	$0.527 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.692 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.269	$0.477 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.438 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$
	0.270	$0.479 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	$2.447 \pm 9.07 \cdot 10^{-3}$

** Proteína en muestra: $32.60 \pm 0.4839\%$

Cuadro 9: Promedios de porcentaje de proteína soluble para Curva de solubilización de proteína de hoja de Chaya

pH (± 0.01)	% Proteína soluble promedio
2	1.387 ± 0.126
3	1.248 ± 0.144
3.5	1.115 ± 0.269
3.8	1.039 ± 0.314
4	1.592 ± 0.215
4.5	1.674 ± 0.366
5	1.653 ± 0.05
6	1.707 ± 0.156
7	2.073 ± 0.124
8	2.293 ± 0.332
9	2.526 ± 0.144

Con los resultados previamente mostrados se construyó la curva de porcentaje de solubilización de proteína en relación al pH presentada en la sección de resultados.

B. RELACIÓN MUESTRA-SOLVENTE

Se presenta a continuación los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de proteína soluble para establecer la relación muestra-solvente. También se presentan los cuadros de resultados de los análisis de varianzas de un factor, calculada por medio de la opción de análisis de datos en herramientas de una hoja electrónica de cálculo del programa Microsoft Excel XP para establecer si hay diferencia significativa entre resultados. Los mismos análisis estadísticos fueron aplicados para las pruebas de relación de tiempo de extracción y de temperatura de extracción

Cuadro 10: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo a la relación muestra solvente

Relación (mL por g hoja)	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína	Porcentaje de proteína soluble (%)	Promedio proteína soluble (%)
5	0.362	$0.642 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	3.281 ± 0.0496	2.967 ± 0.279
	0.317	$0.562 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	2.874 ± 0.0436	
	0.303	$0.537 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	2.747 ± 0.0418	
10	0.627	$1.112 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.684 ± 0.0849	5.448 ± 0.217
	0.58	$1.028 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.258 ± 0.0786	
	0.596	$1.057 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.403 ± 0.0807	
15	0.603	$1.069 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.466 ± 0.0817	5.699 ± 0.227
	0.63	$1.117 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.711 ± 0.0853	
	0.653	$1.158 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.919 ± 0.0883	

Cuadro 11: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación muestra-solvente

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
5 mL/g	3	8.902	2.967	0.078		
10 mL/g	3	16.344	5.448	0.047		
15 mL/g	3	17.096	5.699	0.051		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prob</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	13.678	2	6.839	116.262	0.000	5.143
Dentro de los grupos	0.353	6	0.059			
Total	14.031	8				

Debido que el Valor F es mayor que el Valor crítico para F, puede establecerse que sí hay diferencias significativas entre grupos.

Se observó que el grupo de datos de 10 mL/g y 15 mL/g tienen promedios muy cercanos por lo que se les aplicó otro análisis de varianza para establecer si había diferencias significativas.

Cuadro 12: Análisis de Varianza de un factor para los grupos 10 mL/g y 15 mL/g del análisis de relación muestra-solvente

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
10mL/g	3	16.344	5.448	0.047		
15mL/g	3	17.096	5.699	0.051		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prob</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.094	1	0.094	1.918	0.238	7.709
Dentro de los grupos	0.197	4	0.049			
Total	0.291	5				

Debido que el valor de F es menor que el valor crítico para F, se considera que no hay diferencia significativa entre grupos.

C. RELACIÓN DE TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Cuadro 13: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo al tiempo

Tiempo (minutos)	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína (mg/mL)	Porcentaje de proteína soluble (%)	Promedio de proteína soluble (%)
10	0.463	$0.821 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	4.197 ± 0.0630	4.133 ± 0.185
	0.433	$0.768 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	3.925 ± 0.0590	
	0.472	$0.837 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	4.279 ± 0.0642	
20	0.524	$0.929 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	4.750 ± 0.0711	5.134 ± 0.348
	0.576	$1.021 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.221 ± 0.0780	
	0.599	$1.062 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.430 ± 0.0811	
30	0.623	$1.105 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.647 ± 0.0843	5.390 ± 0.223
	0.579	$1.027 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.248 ± 0.0784	
	0.582	$1.032 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	5.276 ± 0.0788	

Cuadro 14: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación de tiempo de extracción

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
10 minutos	3	12.400	4.133	0.034		
20 minutos	3	15.401	5.134	0.121		
30 minutos	3	16.171	5.390	0.050		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prob</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2.646	2	1.323	19.341	0.002	5.143
Dentro de los grupos	0.410	6	0.068			
Total	3.057	8				

Debido que el Valor F es mayor que el Valor crítico para F, puede establecerse que sí hay diferencias significativas entre grupos.

Se observó que el grupo de datos de 20 minutos y 30 minutos tienen promedios muy cercanos por lo que se les aplicó otro análisis de varianza para establecer si había diferencias significativas.

Cuadro 15: Análisis de Varianza de un factor para los grupos 20 minutos y 30 minutos del análisis de relación de tiempo de extracción

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
20 minutos	3	15.401	5.134	0.121		
30 minutos	3	16.171	5.390	0.050		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prob</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.099	1	0.099	1.157	0.343	7.709
Dentro de los grupos	0.342	4	0.085			
Total	0.441	5				

Debido que el valor de F es menor que el valor crítico para F, se considera que no hay diferencia significativa entre grupos.

D. RELACIÓN DE TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN

Cuadro 16: Resultados de la solubilización de proteína de acuerdo a la temperatura

Temp (°C)	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína (mg/mL)	Porcentaje de proteína soluble (%)	Promedio de proteína soluble (%)
20	0.754	$1.337 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	6.835 ± 0.102	6.992 ± 0.206
	0.797	$1.413 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.225 ± 0.108	
	0.763	$1.353 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	6.916 ± 0.103	
30	0.808	$1.433 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.324 ± 0.109	7.478 ± 0.154
	0.825	$1.463 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.478 ± 0.111	
	0.842	$1.493 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.632 ± 0.114	
40	0.838	$1.486 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.596 ± 0.113	7.814 ± 0.653
	0.943	$1.672 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	8.548 ± 0.127	
	0.805	$1.427 \pm 1.77 \cdot 10^{-3}$	7.297 ± 0.109	

Cuadro 17: Análisis de Varianza de un factor para análisis de relación de temperatura de extracción

Análisis de varianza de un factor						
RESUME						
N						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
20°C	3	20.976	6.992	0.042		
30°C	3	22.435	7.478	0.024		
40°C	3	23.441	7.814	0.427		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Prob</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.025	2	0.512	3.119	0.11	5.143
Dentro de los grupos	0.985	6	0.164			
Total	2.010	8				

Debido que el Valor F es menor que el Valor crítico para F, puede establecerse que no hay diferencias significativas entre grupos.

E. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO

Cuadro 18: Proteína soluble en sobrenadantes tras precipitación en proceso de extracción

Muestra	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína (mg/mL)	Porcentaje de Proteína Soluble (%)	Promedio de Proteína Soluble (%)
A	0.208	0.369 \pm 0.002	0.481 \pm 0.002	0.447 \pm 0.0306
B	0.183	0.324 \pm 0.002	0.424 \pm 0.002	
C	0.188	0.333 \pm 0.002	0.435 \pm 0.002	

Cuadro 19: Pesos de materiales durante el proceso de extracción

Muestra	Peso
Chaya fresca	11, 340 \pm 0.03 g
Chaya seca	1,600 \pm 0.01 g
Aislado de proteína de chaya	69.8 \pm 0.01 g

Se estableció el rendimiento de acuerdo a la ecuación presentada previamente en la sección de metodología. Se utilizaron 11, 340 \pm 0.01 gramos de chaya fresca, obteniéndose 69.8 \pm 0.01 gramos de aislado. Con estos datos se calculó el rendimiento como:

Ecuación 11: Cálculo de rendimiento a partir de Chaya fresca

$$\% \text{Rendimiento por chaya fresca} = \frac{69.8 \pm 0.01 \text{g}}{11340 \pm 0.01 \text{g}} * 100 = 0.616 \pm 8.20 * 10^{-5} \%$$

Tomando en cuenta que el proceso se llevó a cabo con Chaya seca y que los 11,340 \pm 0.01 gramos pasaron a ser 1,600 \pm 0.01 gramos de Chaya seca, se procedió a calcular también el porcentaje de rendimiento por Chaya seca

Ecuación 12: Cálculo de rendimiento a partir de Chaya seca

$$\% \text{Rendimiento por chaya seca} = \frac{69.8 \pm 0.01\text{g}}{1600 \pm 0.01\text{g}} * 100 = 4.363 \pm 6.35 * 10^{-4}\%$$

F. SOLUBILIDAD DEL AISLADO EN FUNCIÓN DE PH

Para el análisis de solubilidad del aislado en función de pH se siguió la metodología que para el análisis de solubilización de proteína en función de pH y determinación del punto isoeléctrico.

Cuadro 20: Porcentaje de solubilización de proteína del aislado proteico de hoja de Chaya

pH	Abs (± 0.001)	Concentración de proteína (mg/mL)	Porcentaje de proteína soluble (%)		Promedio de proteína soluble (%)
7.5	0.835	$0.211 \pm 3.88 * 10^{-4}$	0.991 \pm	$2.47 * 10^{-3}$	0.936 \pm 0.0765
	0.822	$0.188 \pm 3.48 * 10^{-4}$	0.882 \pm	$2.21 * 10^{-3}$	
7	0.786	$0.124 \pm 2.34 * 10^{-4}$	0.583 \pm	$1.47 * 10^{-3}$	0.616 \pm 0.0471
	0.794	$0.138 \pm 2.60 * 10^{-4}$	0.649 \pm	$1.64 * 10^{-3}$	
6.5	0.78	$0.113 \pm 2.15 * 10^{-4}$	0.533 \pm	$1.35 * 10^{-3}$	0.554 \pm 0.0294
	0.785	$0.122 \pm 2.31 * 10^{-4}$	0.574 \pm	$1.45 * 10^{-3}$	
6	0.78	$0.113 \pm 2.15 * 10^{-4}$	0.533 \pm	$1.35 * 10^{-3}$	0.549 \pm 0.0235
	0.784	$0.121 \pm 2.28 * 10^{-4}$	0.566 \pm	$1.43 * 10^{-3}$	
5.5	0.777	$0.108 \pm 2.05 * 10^{-4}$	0.508 \pm	$1.29 * 10^{-3}$	0.479 \pm 0.0412
	0.77	$0.096 \pm 1.83 * 10^{-4}$	0.450 \pm	$1.14 * 10^{-3}$	
5	0.78	$0.113 \pm 2.15 * 10^{-4}$	0.533 \pm	$1.35 * 10^{-3}$	0.491 \pm 0.0589
	0.77	$0.096 \pm 1.83 * 10^{-4}$	0.450 \pm	$1.14 * 10^{-3}$	

G. CAPACIDAD DE EMULSIÓN

Cuadro 21: Aceite consumido en análisis de capacidad de emulsión

Muestra	Aceite Consumido	Capacidad de Emulsión (mL de aceite/g aislado)	Promedio de Capacidad de Emulsión (mL de aceite/g aislado)
A	5.1	10.2 ± 0.1	10.067 ± 0.2309
B	5.1	10.2 ± 0.1	
C	4.9	9.8 ± 0.1	

H. ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE

Cuadro 22: Pesos de muestras para análisis de absorción de agua y aceite

Solvente	Peso de muestra (±0.0001g)	Gramos absorbidos (±0.0001g)	Capacidad de absorción (mL solvente/g aislado)	Promedio de capacidad de absorción (mL solvente/g aislado)
Agua	1.0791	1.070 ± 1.01 *10 ⁻³	0.992 ± 9.40 *10 ⁻⁴	0.940 ± 0.140
	1.0056	1.053 ± 1.01 *10 ⁻³	1.047 ± 1.01*10 ⁻³	
	1.0229	0.800 ± 1.01 *10 ⁻³	0.782 ± 9.90 *10 ⁻⁴	
Aceite	1.0066	1.639 ± 1.01 *10 ⁻³	1.830 ± 1.14*10 ⁻³	1.801 ± 0.168
	1.0077	1.752 ± 1.01 *10 ⁻³	1.953 ± 1.14*10 ⁻³	
	1.0197	1.471 ± 1.01 *10 ⁻³	1.621 ± 1.12*10 ⁻³	

I. CARACTERÍSTICAS DE LA HOJA Y EL AISLADO

Cuadro 23: Humedad de muestras

Muestra	Crisol con Chaya ($\pm 0.0001\text{g}$)	Chaya seca ($\pm 0.0001\text{g}$)	Porcentaje de humedad (%)	Promedio de porcentaje de humedad (%)
Chaya fresca	33.437	32.6301	$80.0496 \pm 4.22 \cdot 10^{-4}$	79.1083 ± 1.0058
	33.7753	32.9682	$78.0485 \pm 4.08 \cdot 10^{-4}$	
	36.9785	36.1772	$79.2268 \pm 3.77 \cdot 10^{-4}$	
Chaya seca	37.7135	37.6066	$10.4364 \pm 4.84 \cdot 10^{-5}$	11.1971 ± 1.7346
	34.5831	34.4726	$9.9729 \pm 5.06 \cdot 10^{-5}$	
	32.6856	32.5194	$13.1821 \pm 7.09 \cdot 10^{-5}$	
Residuo	37.5269	36.7874	$73.6187 \pm 3.45 \cdot 10^{-4}$	69.8682 ± 8.3596
	33.3114	32.5471	$75.6958 \pm 4.01 \cdot 10^{-4}$	
	35.8088	35.2021	$60.2902 \pm 2.96 \cdot 10^{-4}$	
Aislado Proteico	33.4391	33.3687	$6.9696 \pm 3.65 \cdot 10^{-4}$	7.9871 ± 1.2423
	33.7485	33.6541	$9.3716 \pm 4.86 \cdot 10^{-5}$	
	36.9684	36.8921	$7.6201 \pm 3.61 \cdot 10^{-5}$	

Cuadro 24: Proteína de muestras por método Kjeldahl

Muestra	Peso (±0.0001g)	HCl (±0.05mL)	Proteína (%)	Promedio porcentaje de proteína (%)
Residuo A	0.2528	8.1	8.04 ± 0.96	8.14 ± 0.134
Residuo B	0.2531	8.3	8.23 ± 0.99	
Hoja Fresca A	0.2529	10	6.88 ± 0.09	6.81 ± 0.101
Hoja Fresca B	0.2531	9.8	6.74 ± 0.09	
Aislado A	0.2525	9.7	32.00 ± 0.17	31.96 ± 0.054
Aislado B	0.2531	9.7	31.92 ± 0.17	

***Normalidad de HCl 0.0952

En el caso de los residuos y de la hoja fresca se les calculó la corrección para establecer el contenido de proteína en base humedad utilizando las respectivas humedades de las muestras (Cuadro 24, página 56) y la corrección:

Ecuación 13 : Corrección para proteína en base húmeda

$$\% \text{proteína en base húmeda} = \text{Proteína en base seca} * \frac{(100 - \% \text{Humedad})}{100}$$

J. IMÁGENES DEL ESTUDIO

Figura 5: Hoja de Chaya con escala



Figura 6: Residuos de Chaya luego del proceso de extracción



Figura 7: Apariencia de separación de Chaya y sobrenadantes por centrifugación

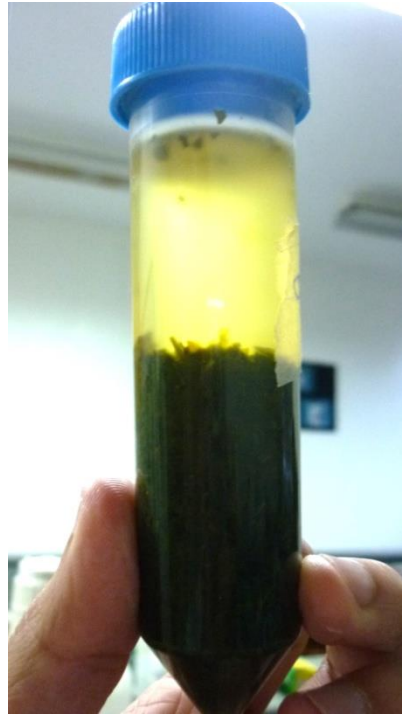


Figura 8: Recolección por centrifugación de proteínas precipitadas



Figura 9: Apariencia de la prueba de expansión y estabilidad de espuma

