



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD Y DEL SER
HUMANO**

ESCUELA DE ENFERMERÍA

TÍTULO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA DIGESTIBILIDAD
GÁSTRICA Y DUODENAL EN CONCENTRADOS
PROTEICOS DE *MORINGA OLEIFERA*.**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADAS
EN CIENCIAS DE LA ENFERMERÍA**

AUTORAS:

**DIANA CAROLINA CARVAJAL PASTO
ELIZABETH CATUCUAMBA TAMBA**

TUTOR

ING. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO MSc.

GUARANDA - ECUADOR

FEBRERO 2019

TITULO

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y
DUODENAL EN CONCENTRADOS PROTEICOS DE *MORINGA*
OLEIFERA.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado, a aquellas personas que me han brindado la dicha de la vida, mis padres, quienes son mi fortaleza, mi más grande bendición, gracias a ellos conozco la confianza, el respeto, el optimismo.

A mi querida madre Emma, aquella mujer que me dio la vida, que siempre ha estado apoyándome, incentivándome, demostrándome que una caída no es derrota, que su fe en Dios es tan inmensa como el amor que nos tiene, solo la madre sabe lo que es dejar de lado las necesidades por ver a sus hijos triunfar.

A mi querido padre John que siempre ha estado para cuidarme, aconsejarme, guiarme y demostrarme que no debemos rendirnos, que los sucesos de la vida siempre al final nos dan una lección para llegar a ser una mejor persona, que nuestro carácter nos define y el poseer un carácter fuerte también demuestra ser una noble persona.

A mis hermanos: Ligia, Willian, John, Julio y Carmita que siempre han estado presentes apoyándome moralmente, mostrándome que a pesar de las diferencias que existen, siempre nos tendremos el uno al otro, brindándome la dicha de saber que un logro alcanzado es una satisfacción que nos engloba a todos.

El pilar que me ayudo a ser la persona que hoy en día soy se llama familia.

Srta. Carolina Carvajal.

A mis padres por haber sido mi apoyo incondicional y hermanas que siempre me incentivaron a que sin importar las adversidades jamás de un paso atrás y continúe hasta alcanzar las metas propuestas.

A mi esposo, quien desde el momento que decidimos seguir el camino de la vida juntos me ha sabido brindar su constante e incondicional apoyo, a mi pequeña hija la cual ha llenado mi vida de felicidad y ha sido ese empuje para poder sobrellevar las cosas y no darme por vencida, personas incondicionales para mí quienes han permitido culminar mi carrera.

Srta. Elizabeth Catucuamba.

AGRADECIMIENTO

Nuestro más grato agradecimiento siempre a nuestros padres, hermanos y amigos quienes han estado ahí brindándonos su apoyo incondicional para poder culminar nuestra formación académica con principios y valores.

A la Universidad Estatal de Bolívar, Escuela de Enfermería y sus docentes quienes dedicaron su tiempo con el fin de inculcarnos conocimientos que nos permitirán formarnos como profesionales.

Un agradecimiento especial al Proyecto Hidrolizados de proteínas de origen animal y vegetal con capacidad antimicrobiana y antioxidante para diferentes usos industriales. Al programa Conversión de deuda Ecuador-España por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

Al Ing. Edgar Marcelo Vilcacundo MSc conjuntamente con los ingenieros del Laboratorio de la Universidad, quienes mostraron gran responsabilidad e interés en apoyarnos, guiarnos y supervisarnos en la realización de este proyecto experimental culminando de la mejor manera con la investigación.

Srta. Carolina Carvajal.

Srta. Elizabeth Catucuamba

Guaranda, 13 de Febrero del 2019

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR

El suscrito Ing. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO MSc.
Director del proyecto de Investigación, como modalidad de titulación.

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación como requisito para la titulación de grado, con el tema: *DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y DUODENAL EN CONCENTRADOS PROTEICOS DE MORINGA OLEÍFERA*. Realizado por las estudiantes DIANA CAROLINA CARVAJAL PASTO con C.I. 0202552246 y ELIZABETH CATUCUAMBA TAMBA con C.I. 1724487622, ha cumplido con los lineamientos metodológicos contemplados en la Unidad de Titulación de la Carrera de Enfermería, para ser sometido a revisión y calificación por los miembros del tribunal nombrado por el Consejo Directivo de la Facultad y posteriormente a la sustentación pública respectiva.



Ing. EDGAR MARCELO VILCACUNDO CHAMORRO MSc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN

RESUMEN EJECUTIVO

La atribución de propiedades medicinales e industriales de *Moringa oleifera* ha incrementado su consumo en los últimos años. En el Ecuador se cultiva en zonas subtropicales y tropicales presentando altos niveles de adaptación por la similitud de las condiciones climáticas respecto a su lugar de origen atribuido al Nord este y Sur de la India.

En la provincia de Bolívar se cultivan y expenden hojas secas y pulverizadas como un suplemento nutricional rico en proteínas, pero se desconocen por completo la cantidad (porcentaje) y calidad (caracterización) de las mismas. Se han reportado a nivel mundial contraindicaciones para la salud sobre el consumo de esta planta siendo una de las más relevantes los problemas gástricos.

En este estudio se ha podido cuantificar el porcentaje de proteína a través de un analizador elemental obteniéndose un 25,77% en la harina procesada. Por otra parte, el porcentaje de proteína de los concentrados obtenidos por el método de punto isoeléctrico modificado determinó que el pH 5.0 es el más recomendable para la extracción de proteínas obteniendo un 40.66 %. Como resultado de la caracterización por electroforesis SDS-PAGE se identificaron 4 proteínas de 12, 46, 53 y 218 kDa. Para la simulación del proceso gastrointestinal *in vitro* se utilizaron pepsina, pancreatina y sales biliares realizando variaciones de pH para simular un adulto con problemas gástricos (pH 1.2), un adulto sano (pH 2.0) y un niño no lactante (pH3.2).

Una vez culminado el proceso de simulación gastrointestinal las proteínas volvieron a ser caracterizadas encontrándose que en niños no lactantes, 3 de las 4 proteínas cuyos pesos moleculares son 12, 45 y 52 kDa respectivamente; no han sido totalmente digeridas, esto sugiere que podrían tener consecuencias no deseadas para su salud, pudiéndose manifestar desde un simple proceso diarreico hasta un proceso de reacción alérgica, sin embargo se necesitarían más estudios y pruebas *in vivo* para corroborar esta información.

Palabras claves: *Moringa oleifera*, punto isoeléctrico, digestibilidad gastrointestinal, electroforesis de proteínas, *in vitro*.

ABSTRACT

The attribution of medicinal and industrial properties of *Moringa oleifera* has increased its consumption in recent years. In Ecuador it is cultivated in subtropical and tropical zones presenting high levels of adaptation due to the similarity of climatic conditions with respect to its place of origin attributed to the North East and South of India.

In the province of Bolivar, dried and powdered leaves are cultivated and sold as a nutritional supplement rich in proteins, but the quantity (percentage) and quality (characterization) of them are completely unknown. Contraindications to health have been reported worldwide on the consumption of this plant being one of the most relevant gastric problems.

In this study it was possible to quantify the percentage of protein through an elemental analyzer, obtaining a 25.77% in the processed flour. On the other hand, the protein percentage of the concentrates obtained by the modified isoelectric point method determined that pH 5.0 is the most recommended for the extraction of proteins, obtaining 40.66%. As a result of the SDS-PAGE electrophoresis characterization, 4 proteins of 12, 46, 53 and 218 kDa were identified. For the simulation of the gastrointestinal process *in vitro*, pepsin, pancreatin and bile salts were used, performing pH variations to simulate an adult with gastric problems (pH 1.2), an adult healthy (pH 2.0) and a non-lactating child (pH3.2).)

Once the gastrointestinal simulation process was completed, the proteins were again characterized, finding that in non-lactating children, 3 of the 4 proteins whose molecular weights are 12, 45 and 52 kDa respectively; they have not been completely digested, this suggests that they could have undesirable consequences for their health, being able to manifest from a simple diarrheic process to an allergic reaction process, however more studies and *in vivo* tests would be needed to corroborate this information.

Key words: *Moringa oleifera*, isoelectric point, gastrointestinal digestibility, protein electrophoresis, *in vitro*.

ÍNDICE GENERAL

TÍTULO	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	V
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR	VI
RESUMEN EJECUTIVO	VII
ABSTRACT	VIII
INDICE GENERAL.....	IX
INDICE DE TABLAS	XII
INDICE DE FIGURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO 1	17
EL PROBLEMA	17
1.1. Planteamiento del problema.....	17
1.2. Formulación del problema	17
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo general	18
1.3.2. Objetivos específicos.....	18
1.4. Justificación de la investigación	19
1.5. Limitaciones	20
CAPÍTULO 2	21
MARCO TEÓRICO.....	21
2.1.1. Origen y distribución geográfica de la planta.....	21
2.1.2. Historia de la <i>Moringa</i> en el Ecuador.....	22
2.2. Bases teóricas	23
2.2.1. Composición molecular.....	23
2.2.2. Uso nutricional	23
2.2.3. Propiedades medicinales	24
2.2.4. Proteínas	24
2.2.5. Proteínas de <i>Moringa</i>	25
2.2.6. Aislado y concentrados proteicos.....	25
2.2.7. Electroforesis de proteínas	26
2.2.8. Técnicas <i>in vitro</i>	27

2.2.9.	Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i>	27
2.3.	Definición de términos	29
2.4.	Sistema de hipótesis	31
2.5.	Sistema de variables	31
2.5.1.	Variable independiente	31
2.5.2.	Variable dependiente	31
CAPÍTULO 3		32
MARCO METODOLÓGICO		32
3.1.	Nivel de investigación	32
3.1.1.	Tipo de investigación	32
3.1.2.	Investigación experimental	32
3.1.3.	Investigación de laboratorio	32
3.1.4.	Investigación prospectiva	32
3.2.	Diseño	32
3.2.1.	Localización de la investigación	32
3.3.	Técnicas e instrumentos	33
3.3.1.	Material experimental	33
3.3.2.	Obtención de harina, aislados y concentrados proteicos de <i>Moringa oleifera</i>	33
3.3.3.	Calculo del porcentaje de proteínas	34
3.3.4.	Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i>	34
3.3.5.	Caracterización de proteínas y determinación de digestibilidad por electroforesis SDS - PAGE	35
3.3.6.	Carga de las muestras, proceso de separación y teñido de los geles	36
3.4.	Técnicas de procesamientos y análisis de datos	37
CAPÍTULO 4		38
LOGROS ALCANZADOS SEGÚN LOS OBJETIVOS PLANTEADOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN		38
CAPÍTULO 5		44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		44
5.1.	Comprobación de las Hipótesis	44
5.2.	Conclusiones	45
5.3.	Recomendaciones	46
5.4.	Bibliografía	47

5.5. Anexos	53
Anexo 1. Recursos	53
Anexo 2. Presupuesto.....	54
Anexo 3. Cronograma de Actividades	55
Anexo 4. Evidencias pruebas de laboratorio.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del gel separador o de resolución.....	36
Tabla 2. Composición del gel concentrador o de apilamiento.....	36
Tabla 3. Resultados por objetivos	38
Tabla 4. Proteínas por concentrados	39
Tabla 5. Prueba ANOVA para el porcentaje de proteínas por pH de precipitación.....	39
Tabla 6. Recursos humanos.....	53
Tabla 7. Presupuesto	54
Tabla 8. Cronograma de actividades.....	55
Tabla 9. Porcentaje de proteínas de acuerdo a los pHs y sus replicas	61
Tabla 10. Prueba ANOVA para el porcentaje de proteínas por pH de precipitación.....	61
Tabla 11. Porcentaje de concentrados proteicos	61
Tabla 12. Determinación de diferencias estadísticas significativas.....	62
Tabla 13. Caracterización de proteínas e identificación del peso molecular.	63
Tabla 14. Digestibilidad gastrointestinal.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas de <i>Moringa oleifera</i>	21
Figura 2. Partes de la <i>Moringa oleifera</i>	24
Figura 3. Caracterización de proteínas de hojas de <i>Moringa oleifera</i> mediante electroforesis SDS-PAGE.....	40
Figura 4. Determinación de la digestibilidad gástrica (3,4,5) y duodenal (6,7,8) <i>in vitro</i> de concentrados proteicos de <i>Moringa oleifera</i> mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE.....	42
Figura 5. Obtención de la harina de las hojas de <i>Moringa</i>	56
Figura 6. Peso de las muestras	56
Figura 7. Precipitación de la muestra con agua destilada.	56
Figura 8. Proceso de agitación y ajuste a un pH de solubilidad de 8.0 de <i>Moringa Oleifera</i> .(NaOH).....	56
Figura 9. Proceso de centrifugación de la muestra	56
Figura 10. Presentación del sólido y sobrenadante al finalizar la centrifugación.....	56
Figura 11. Proceso de filtración	57
Figura 12. Proceso de agitación y ajuste a un pH de precipitación de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0. (HCL)	57
Figura 13. Obtención de la proteína y sobrenadante de acuerdo al pH de precipitación posterior a las 48h de refrigeración	57
Figura 14. Eliminación del sobrenadante y peso de la proteína de <i>Moringa</i>	57
Figura 15. Secado por Liofilización.....	57
Figura 16. Concentrado de proteína.....	57
Figura 17. Peso de los comprimidos para calibración	58
Figura 18. Elaboración de las canastas de aluminio	58
Figura 19. Elaboración de los comprimidos de calibración.....	58
Figura 20. Elaboración de los comprimidos de las muestras	58
Figura 21. Obtención de las pastillas.	58
Figura 22. Muestras para el análisis elemental.	58
Figura 23. Muestras para la realización de electroforesis	59
Figura 24. Termo agitación de las muestras	59
Figura 25. Colocación de agente reductor (2-mercaptoetanol).....	59

Figura 26. Muestras en la cuba de electroforesis	59
Figura 27. Migración de las partículas desde el cátodo hacia el ánodo	59
Figura 28. Coloración con Azul de Coomassie en el gel obtenido	60
Figura 29. pHs para la simulación de la digestibilidad	60
Figura 30. Colocación de pHs de simulación gástrica para posterior electroforesis.	60

INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera es un árbol perteneciente a la familia *Moringaceae*, originario de la India sur de Himalaya, pero se ha introducido en diferentes lugares como: Asia, África, América, Europa y Oceanía, existen 13 especies dentro del mismo género en áreas tropicales y subtropicales a altitudes de hasta 2000m. (Yang, Xiao yue Wang, Xue Min, Zi Tong, & Jian Pping, 2018)

Debido a que esta planta se considera de gran beneficio para la salud humana, es común encontrar plantaciones de esta en varios países por su multipropósito, la mayoría de sus usos son medicinales e industriales. (Coz, y otros, 2018)

En el Ecuador a partir del año 2016 existen plantaciones de *Moringa* en las regiones de: la Península de Santa Elena, Guayaquil y Pedernales; es conocido como "el árbol milagroso" ya que se utiliza principalmente para fines medicinales y dietéticos. (Landázuri, y otros, 2018)

Tradicionalmente, la mayoría de las partes de *Moringa* se han utilizado para tratar diversas enfermedades, incluyendo escorbuto, tumores abdominales, llagas, histeria y vejiga helmíntica. En las últimas décadas, un número creciente de estudios ha evaluado los efectos y beneficios de la *Moringa* contra enfermedades como la obesidad y diabetes. (Mengfei, Junjie, & Xiaoyang, 2018)

La *Moringa* contiene un alto nivel de proteínas, vitaminas, A, B y C, β -caroteno, minerales incluyendo el ácido fólico y compuestos antioxidantes, siendo muy recomendable para mujeres embarazadas y personas en general. (Leone, y otros, 2016)

Las proteínas contenidas en las hojas pueden variar desde 29.1 a 35. 3g/100g de peso en seco, por esta razón, en la última década la FAO promovió un programa para el uso de la *Moringa* dirigido a la población infantil con altos índices de desnutrición y a madres gestantes. (Martin, y otros, 2013)

Realizando una comparación del promedio de proteínas registrado en la *moringa* (30%) con la proteína de leche en polvo (35%) existe poca diferencia, al parecer toda la proteína es asimilable. (Sanchez, Martinez, Sinagawa, & Vazquez, 2013)

Las hojas de *Moringa oleifera* representan menor riesgo en la salud, entre las sustancias toxicas encontradas resaltan los alcaloides moringinina, moringinina y spirochin; las cuales en su mayoría están situadas en la raíz, al parecer las hojas son seguras. (Terrazas, García del Carpio, Albarracin, & Fernández, 2017)

El grado de digestibilidad gastrointestinal *in vitro* simula condiciones fisiológicas humanas en diferentes tipos de personas; es así que para la simulación de la digestibilidad de las proteínas se utilizaron diferentes pHs. Para simular la condición de personas con enfermedades gástricas se trabajó a un pH 1,2; para el caso de personas adultas en condiciones sanas el pH del estómago es de 2,0; y para el caso de niños no lactantes se utilizó un pH cercano a 3,2. (Puruncajas, 2017)

CAPITULO 1

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

En los últimos años se ha evidenciado el aumento progresivo del consumo de *Moringa oleifera* a nivel mundial debido a su alto contenido de proteínas con distintas capacidades biológicas, pero no existen estudios respecto al contenido de proteínas (porcentaje) y el perfil de estas (tipo), así como la capacidad del organismo humano para digerirlas. Se han reportado algunas contraindicaciones como insomnio, diarreas, afecciones metabólicas y nerviosas. En el Ecuador, provincia Bolívar, cantón Guaranda, parroquia Salinas en la comunidad Chazo Juan se han implementado plantaciones que luego son comercializadas, pero carecen de estudios científicos que respalden la calidad del producto, sus beneficios o perjuicios para la salud y las formas adecuadas en las que este se debe consumir.

1.2. Formulación del problema

¿Los concentrados proteicos de las hojas de *Moringa oleifera* son completamente digeribles a nivel gástrico y duodenal?

1.3. **Objetivos**

1.3.1. **Objetivo general**

Determinar la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro* en concentrados proteicos de *Moringa oleifera*.

1.3.2. **Objetivos específicos**

- Identificar el porcentaje de proteínas que contiene *Moringa oleifera*.
- Caracterizar a nivel molecular las proteínas de *Moringa oleifera*.
- Verificar si las proteínas son digeridas en su totalidad a nivel gástrico y duodenal mediante técnicas *in vitro*.

1.4. **Justificación de la investigación**

Los problemas nutricionales a nivel mundial han ido evolucionando con el pasar del tiempo. Si bien, se han hecho avances importantes al respecto, persiste desconocimiento sobre los beneficios de mantener una dieta balanceada entre carbohidratos, proteínas y lípidos, por parte de la población. En el Ecuador el consumo excesivo de carbohidratos ha traído problemas graves para el sistema de salud como el aumento de casos de diabetes, hipertensión, obesidad, problemas cardiovasculares, y problemas gastrointestinales.

Las fuentes de proteína son diversas y han aparecido nuevos suplementos nutricionales que varían de acuerdo con su concentración tales como: aislados, concentrados e hidrolizados proteicos de diversas fuentes como la soya, la leche, los huevos, el pescado. En los últimos años se han venido desarrollando estudios sobre nuevas matrices vegetales y animales y una de las más destacadas es la *Moringa oleifera*, matriz vegetal de origen hindú que posee un alto contenido de proteína (aproximadamente 28,7 %).

Existen publicados varios estudios respecto a los beneficios del consumo de esta planta, pero existen muy pocos sobre los problemas reportados entre los que podemos destacar problemas gástricos, insomnio, afecciones metabólicas y nerviosas.

Es por tanto necesario investigar el porcentaje y el tipo de proteínas (a nivel molecular) que tienen los quimiotipos de *Moringa oleifera* que se producen y consumen en el Ecuador y analizar la capacidad del organismo humano para digerirlas, realizando los ensayos (pruebas *in vitro*) a nivel de laboratorio, valiéndonos de la tecnología para el escalamiento posterior de la investigación.

La Universidad Estatal de Bolívar y el Departamento de Investigación han hecho inversiones importantes en cuanto a infraestructura, equipamiento y personal capacitado lo que le ha permitido tener uno de los mejores centros de investigación del país y de Latinoamérica. El Grupo AFROPROBIOPEP ha venido desarrollando investigaciones importantes respecto a las proteínas y

péptidos bioactivos, realizando importantes publicaciones de carácter mundial. Con el fin de aprovechar al máximo estas capacidades, se justifica la realización de la investigación propuesta en este documento.

1.5. **Limitaciones**

Limitación en las fuentes de información bibliográfica respecto al contenido molecular de proteínas de la *Moringa oleifera* para el establecimiento de conclusiones.

Falta de capacidades técnicas (falta de prácticas para manejo de equipos y protocolos) para la realización de ensayos de laboratorio.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1.1. Origen y distribución geográfica de la planta



Figura 1. Hojas de *Moringa oleifera*
Fuente: (Suradech Kongkiatpaiboon, 2016)

Moringa oleifera es la especie más conocida del género *Moringa*. Es un árbol originario de sur de Himalaya, noreste de la India, Bangladesh, Afganistan, Pakistan y ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales. Se encuentra diseminado en una gran parte del planeta, y en América Central fue introducida en 1920 como planta ornamental. (Villareal & Ortega, 2014)

Esta planta habita en los lugares más pobres y donde predomina la necesidad de nutrientes. Fue redescubierta por los Médicos sin Fronteras entre 1974 y 1976 ya que hay registros que indican que, en 1992, varios médicos quedaron varados en Malawi y como no tenían como alimentar a la gente, les dieron las hojas de *Moringa* como una alternativa alimentaria. Debido a esto se le llama el árbol milagroso, árbol de la vida, porque salvo a muchas personas que padecían de hambre. (Gomez L. , 2013)

Moringa oleifera es una planta que ha adquirido gran importancia en los últimos años, debido a la gran diversidad de usos que se le ha dado; es un árbol pequeño perenne, de crecimiento rápido perteneciente a la familia *Moringaceae* y en la actualidad existen solamente 13 especies dentro del género *Moringa*, la más popular la *Moringa Oleifera Lam* debido a sus grandes propiedades medicinales y curativas. Es cultivada principalmente en lugares de

clima tropicales secos en varias regiones del mundo. (Estrada, Hernandez, & Guerrero, 2016)

Se la conoce comúnmente con varios nombres como marango, reseda, árbol de rábano, árbol de los milagros, árbol de baqueta, ángela, árbol de los espárragos, árbol de las perlas, árbol de ben, entre otros, es una de las especies más conocidas y más ampliamente distribuidas por el mundo. (Villareal & Ortega, 2014)

El cultivo del árbol de *Moringa oleifera* ha aumentado enormemente para mejorar la seguridad alimentaria y reducir la desnutrición, en particular para las mujeres en edad fértil en las regiones en desarrollo. (Raman, Alves, & Gnansounou, 2018)

En la década de 1990 se encontró que, gracias a su alto contenido proteico, la administración proteica de *Moringa oleifera* a madres en lactancia en situación de inanición extrema aumentaba la producción de leche, posibilitando así la supervivencia de los niños. (Olson, y otros, 2016)

2.1.2. Historia de la *Moringa* en el Ecuador

Moringa Oleifera fue introducida en el Ecuador en el año 2009 cuando el zootecnista Fausto Mantilla en uno de sus viajes mostro interés por esta planta que permite combatir la desnutrición infantil. Se trajo unas semillas para realizar investigaciones de su adaptación en el suelo, plagas, interacción con la biodiversidad local, para lo cual descubrió que el suelo ecuatoriano es muy favorable para su producción. En ese mismo año decidieron crear la empresa ECUAMORINGA. Iniciando con la obtención de la semilla desde el exterior e implementando los primeros cultivos de la planta y bosques de *Moringa oleifera* en diferentes lugares de país como en Santa Elena, Porto Viejo, Machala, y pequeños agricultores en Naranjito y Salitre. (Estupiñan , 2017)

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Composición molecular

La *Moringa* tiene una amplia gama de compuestos bioactivos que se pueden obtener a partir de diferentes estructuras vegetativas, como hojas, semillas, tallos y cascara de las vainas. Estas moléculas bioactivas incluyen carbohidratos, compuestos fenólicos, aceites, ácidos grasos, proteínas y péptidos funcionales y tienen un gran potencial para usarse en varias formulaciones de productos alimenticios. (Sausedo, y otros, 2018)

Moringa oleifera ha sido reconocida por su alto contenido de proteína además son ricas en ácidos fenólicos, flavonoides, glucosinolato e isocinocinatos. Los flavonoides presentes en esta planta, por ejemplo, quercetina y kaempferol, juegan un importante papel que reduce el estrés oxidativo, con efectos antihipertensivos, antiproliferativos y antiinflamatorios. Además, se ha informado que el kaempferol induce la detención del ciclo celular en células de cáncer de colon humano. (Cuellar, y otros, 2018)

2.2.2. Uso nutricional

La *Moringa* ha sido recomendada por Organización de la Naciones Unidas (ONU) para complementar la dieta. Algunos estudios muestran que es segura su ingesta de hasta 1g por kg corporal. (Velazquez, Peon, Zepeda, & Jimenez, 2016)

Sus hojas pueden ser consumidas frescas, secas o molidas; las hojas frescas, las vainas de frutas y los extractos tienen un alto valor nutritivo, incluidas proteínas, vitaminas, minerales y fotoquímicos. (Raman, Alves, & Gnansounou, 2018)

En la hoja, el ácido linoleico es el más abundante: mientras que en el resto de la planta el predominante es el palmítico. (Velazquez, Peon, Zepeda, & Jimenez, 2016)

Se describe que onza por onza, las hojas de *Moringa*, contienen cuatro veces más vitamina A que las Zanahorias, cuatro veces más calcio que la leche,

siete veces la cantidad de vitamina C de las naranjas, tres veces más potasio que los plátanos, cantidades significativas de hierro, fósforo y otros elementos. (Mora & Gacharná, 2015)

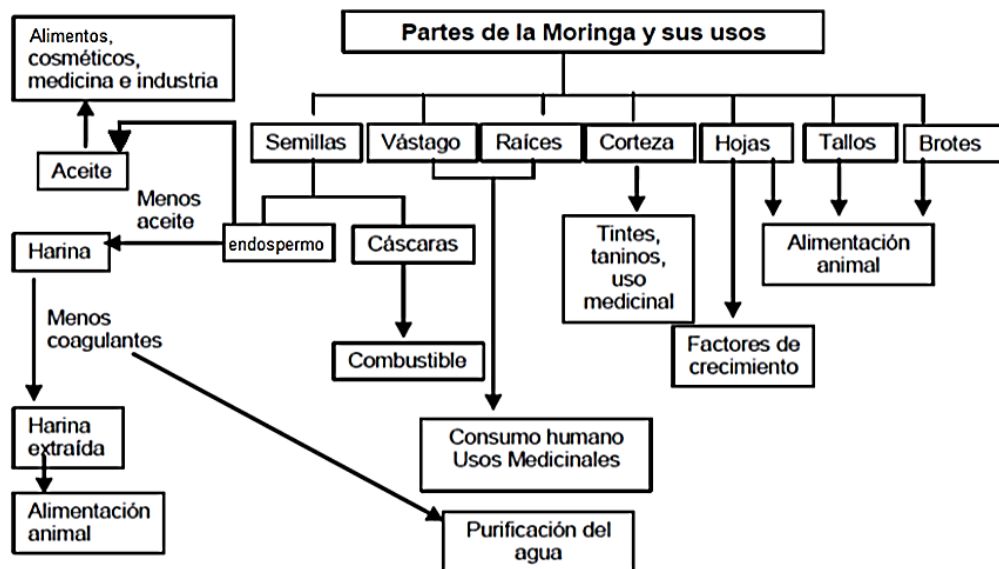


Figura 2. Partes de la *Moringa oleifera*
Fuente: Gomez, Pita, & Zumalacárregui (2016)

2.2.3. Propiedades medicinales

Alrededor de 100 g de hoja fresca pueden suplir las necesidades diarias de calcio, cerca del 80% de las necesidades de hierro y la mitad de las proteínas necesarias. Se ha informado que *Moringa Oleifera* tiene propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes. Además, se ha demostrado que tiene efectos contra los trastornos neurodegenerativos. (Omotoso, y otros, 2018)

La comunidad científica describe en los últimos años el mecanismo de acción en muchas de estas propiedades curativas debido a una multitud de estudios metodológicos *in vivo* como *in vitro*. (Doménech, Durango, & Ros, 2017)

2.2.4. Proteínas

Las proteínas son sustancias orgánicas complejas y de elevado peso molecular, formadas por la unión de aminoácidos. Constituyen los principales elementos estructurales de las células y realizan funciones vitales para todos

los seres vivos. La importancia de la ingesta de proteínas se debe a que el humano no las puede generar por sí mismo, sino las obtiene a través de los alimentos, tanto vegetales como animales. Las proteínas son moléculas formadas por aminoácidos, normalmente está constituida por 300 aminoácidos. (Bakker, 2017)

2.2.5. Proteínas de *Moringa*.

Se caracterizaron varios constituyentes químicos en las hojas secas y en polvo de *Moringa oleifera*. La muestra de polvo de hoja examinada contenía 28.7% de proteína cruda, 7.1% de grasa, 10.9% de ceniza, 44.4% de carbohidratos, 3.0 mg de calcio y 103.1 mg de hierro por 100 g, 20.7 mg de taninos /g, 17 mg de nitrato /g, 10.5 mg de oxalato /g, 161 µg de β-caroteno /g y 47 µg de luteína /g.

El extracto seco contenía 22.6% de fibra, 2.73% de ceniza, 3.78% de proteína, 9.53% de azúcares totales, 0.00746% de calcio, 0.0549 % de hierro, y 0,0468% de catequinas / flavonoides totales (0,0323% de epicatequina). No se encontraron carotenoides, vitamina C o fitosteroles en el extracto. (Stohs & Harmant, 2015)

2.2.6. Aislado y concentrados proteicos

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada de los extractos proteicos, que se logra eliminando algunos componentes ya sea por hidrólisis o por posterior precipitación controlando los diferentes parámetros como pH, temperatura, solubilidad y otros que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida obteniendo el producto final con un 90% o más de proteína. (Herrera P. , 2015)

Los concentrados proteicos vegetales resultan de un enriquecimiento del material en su contenido proteico, mediante una separación paulatina de sus componentes no proteicos (lípidos, fibra, carbohidratos, minerales, etc.), de tal manera que sus propiedades nutricionales no se pierdan. Según el Codex, para productos de soya, un concentrado debe tener entre 65 y 90% de proteína en base seca y en el caso de productos de otro tipo de vegetales son considerados

proteicos cuando tienen un porcentaje de proteína mayor de 40%. (Herrera P. , 2015)

2.2.7. Electroforesis de proteínas

La técnica de electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas, de otros factores, fue empleada por primera vez por Tiselius (1937), quien descubre que las proteínas se podían separar por acción de un campo eléctrico. Raymond y Weintraub (1959), emplearon como soporte un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente la técnica fue perfeccionada. Laemmli (1970) describió una nueva técnica que logra un aumento en la resolución por la utilización de dodecil sulfato de sodio (SDS). En los años posteriores se emplearon agentes reductores y SDS, para la determinación del peso molecular de las proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS o bien SDS-PAGE. (Garcia, 2000)

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. Es una técnica de separación basada en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico. Las moléculas que posean carga negativa migraran hacia el polo positivo de un aparato electroforético y viceversa. (Peña, Ramirez, & Barrera, 2013)

La electroforesis en geles de poliacrilamida ha sido la técnica de elección para el análisis de la composición proteica de un determinado tipo de células. Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migraran hacia el cátodo (+) o hacia el ánodo (-). La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Cuando se ha completado una electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo, entonces se pueden “revelar” mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Hoy en día se emplea la tinción con plata, azul de Coomassie o reactivos fluorescentes para las proteínas. Es esencial, para el caso de las proteínas pequeñas, una rápida tinción, destinción y fijación de color, para evitar su elución.

La tinción con nitrato de plata es exclusivamente cualitativa y no puede ser utilizada para cuantificar proteínas. El colorante azul de Coomassie es el más aceptado para el gel de electroforesis, el cual se une a las proteínas y la intensidad de coloración es relativamente hasta cierto punto independiente de la concentración y naturaleza química de las proteínas, es el más recomendado para cuantificar una proteína. (Carrillo, Candia, Lugo, Espinoza, & Noriega, 2013)

2.2.8. Técnicas *in vitro*

Los estudios en humanos se dificultan por consideraciones éticas y técnicas. Por esta razón se ha desarrollado la aplicación de modelos *in vitro* que utilizan condiciones que ocurren en los procesos *in vivo*. En general lo que le sucede a las proteínas durante el proceso de digestión ha sido estudiado en sistemas *in vitro* usando proteasas. (Carrillo W. , 2014)

El método *in vitro* que simula los procesos de digestión son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o productos farmacéuticos. Este método tiene la ventaja de ser más rápido, menos costoso, menos intensivo en mano de obra y no tiene restricciones éticas, tienen en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sal, entre otros factores. (Minekus, y otros, 2014)

2.2.9. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

La digestibilidad es el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido por el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestión que corresponde al hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos y a la absorción de pequeñas moléculas con aminoácidos y ácidos grasos en el intestino.

El organismo humano ha desarrollado un sistema complejo para descomponer los alimentos y extraer los nutrientes que necesitan para mantener una adecuada salud. Los estudios en sistemas animales son una alternativa

eficaz para remplazar los estudios en sistemas humanos especialmente cuando se refiere al caso de las alergias. (Vallejo Ibarra & Ramos Moya)

La digestibilidad de las proteínas vegetales es muy importante para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y médica. Por esta razón es importante conocer su contenido de posibles alérgenos. (Greffa, Barrionuevo, Vilcacundo, & Carrillo , 2018)

2.3. Definición de términos

Moringa: Se trata de un árbol originario de la India, la planta y sus frutos son empleados para la alimentación de los animales y de los humanos ya que presenta un alto contenido de vitamina, proteínas, minerales y antioxidantes que confieren sobresalientes cualidades para la nutrición.

Oleífera: se atribuye a la planta que contiene aceite.

Punto isoeléctrico: Se define como el pH en el cual el número de cargas positivas se iguala al número de cargas negativas que aportan los grupos ionizables de una molécula. En el punto isoeléctrico la carga neta de la molécula es (0).

pH: Es un parámetro utilizado para medir el grado de acidez y alcalinidad de una sustancia, específicamente mide la cantidad de iones de hidrógeno que contiene una solución determinada.

Liofilización: Es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otros solventes) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida, es el mejor método para secar compuestos orgánicos e inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa.

Electroforesis: Este método consiste en la separación de partículas por medio de una corriente eléctrica, dividiendo las moléculas de una solución según su tamaño y su carga eléctrica dependiendo del pH de la solución, estas se desplazarán en el momento que sean sometidos a un campo eléctrico, la movilización de las partículas se desarrollara al polo, es decir si la molécula es de carga negativa se desplaza al polo positivo y viceversa.

Digestibilidad: La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, es decir, la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición. Comprende dos procesos, la digestibilidad que corresponde a la hidrólisis de las moléculas complejas de los alimentos, y la absorción de pequeñas moléculas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino.

In vitro: Es la técnica que se realiza fuera del organismo, dentro de un tubo de ensayo, en un medio de cultivo o en cualquier otro ambiente artificial estéril.

Concentrado proteico: Se denomina concentrado proteico a aquel producto alimenticio obtenido de harinas de origen vegetal o animal. A estas harinas se les ha elevado el contenido proteico mediante una serie de tratamientos originando un producto alimenticio con menos contenido graso, mayor contenido de proteínas y con un valor nutritivo.

Sobrenadante: Parte superior clara de cualquier mezcla después de ser centrifugada.

Centrifugación: Se usa para separar muestras heterogéneas en función de parámetros como la velocidad de sedimentación o la densidad de flotación. Método por el cual se genera una fuerza vectorial mediante la rotación de un rotor en una maquina llamada centrifuga. En el rotor se puede disponer tubos conteniendo material en solución o suspensión.

Filtración: Separación de partículas sólidas de líquidos, usando un material poroso que solo permite el paso del líquido.

Enzima: Proteína producida por células vivas que actúa como catalizador de reacciones químicas específicas en los procesos metabólicos.

Pepsina: Enzima digestiva que se segrega en el estómago y que hidroliza las proteínas en el estómago. Fue la primera enzima animal en ser descubierta, por Theodor Schwann en 1836.

2.4. Sistema de hipótesis

2.4.1. Determinación cuantitativa de proteína de concentrados proteicos de *Moringa Oleifera*.

H0: El contenido proteico de concentrados de *moringa* es igual en todos los pH de precipitación.

H1: Por lo menos uno de los contenidos proteicos no es igual a los demás.

2.4.2. Digestibilidad gastrointestinal de concentrados proteicos de *Moringa Oleifera*.

H0: Todos los concentrados proteicos de *moringa oleifera* son digeridos a nivel gastrointestinal.

H1: Al menos una de las proteínas caracterizadas de la *moringa oleifera* no es digeridas a nivel gastrointestinal.

2.5. Sistema de variables

2.5.1. Variable independiente

Precipitación de concentrados proteicos de *Moringa Oleifera* por su punto isoeléctrico.

2.5.2. Variable dependiente

Digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro* de concentrados proteicos de *Moringa Oleifera*.

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de investigación

3.1.1. Tipo de investigación

Este estudio es de tipo experimental con abordaje cuantitativo.

3.1.2. Investigación experimental

Se entiende por investigación experimental a la aplicación de un conjunto de manipulaciones, procedimientos y operaciones de control, de tal forma que proporcionan información no ambigua sobre el fenómeno que se trata de estudiar. Se trata de demostrar que la manipulación de una variable independiente produce un cambio en la variable dependiente. Esto permite cuantificar el cambio inducido por el tratamiento experimental y garantiza la posibilidad de verificar las variaciones.

3.1.3. Investigación de laboratorio

Se desarrolla en un ambiente artificial, para realizar la investigación, ya sea en un aula de laboratorio o un centro de simulación de eventos que cuenta con las instalaciones necesarias y el equipamiento adecuado.

3.1.4. Investigación prospectiva

Se registra la investigación según van ocurriendo los fenómenos.

3.2. Diseño

El diseño utilizado fue completamente al azar y la técnica estadística de ANOVA de un factor con tres repeticiones.

3.2.1. Localización de la investigación

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones de los Laboratorios de Investigación (Biofabrica) de la Universidad Estatal de Bolívar

ubicada en la ciudad de Guaranda, Sector campus Laguacoto II. Dirección Vía Guaranda-San Simón Km 1 ½.

3.3. Técnicas e instrumentos

3.3.1. Material experimental

Hojas de *Moringa oleifera*, planta originaria de la comunidad Chazo Juan, adquirida en la parroquia de Salinas del Cantón Guaranda.

3.3.2. Obtención de harina, aislados y concentrados proteicos de *Moringa oleifera*

Para la obtención de la harina, las hojas de *Moringa* fueron colocadas en el molino electrónico Retsch CYCLONE MILL, a 10 g le fueron añadidos 100mL de agua destilada, esta mezcla fue llevada a agitación a temperatura ambiente durante 30 min.

Se obtuvieron los aislados proteicos siguiendo el método descrito por Martínez y Añón (1996), con modificaciones. La técnica utilizada es la de extracción de proteína por su punto isoeléctrico. Se trabajó con una relación de peso/volumen 1:10, 10 g de harina de *Moringa* fueron disueltos en 100 mL de agua destilada.

Para ajustar el pH hasta llegar a 8.0 fue añadido NaOH 2N, el pHmetro utilizado fue un HANNA HI 2221, la mezcla fue centrifugada a una Temperatura de 5°C y 4500 RPM durante 20 min utilizando la Centrifuga Eppendorf 5804R. El sobrenadante fue filtrado descartando los residuos. Dicho sobrenadante se llevó a agitación durante 30 min, y se ajustó a pH 3.0 con una solución de HCl 2N. El mismo procedimiento fue repetido a pHs de 4.0, 5.0 y 6.0. Las muestras fueron refrigeradas a 5°C durante 48 h. La proteína precipitada fue neutralizada a pH 7.0. Las muestras fueron ultracongeladas a -80°C y finalmente liofilizadas en el equipo CHRIST modelo Alpha 1-4 LDplus.

3.3.3. Cálculo del porcentaje de proteínas

Se realizó la cuantificación de proteína de *Moringa oleifera* mediante la norma española 15104. Para esta determinación se utilizó el equipo Analizador Elemental marca VARIO MACRO CUBE, obteniendo el porcentaje de Nitrógeno que posee la muestra y el factor de corrección de 6.25.

Se elaboraron 6 pastillas sin muestra para calibrar el equipo. Estas se construyen sobre una envoltura de aluminio en forma de canasta, y se añade sulfanilamida en un rango de 19 a 23mg, con una mínima cantidad de tungsteno. Luego se realiza el mismo proceso, pero con las muestras de *Moringa oleifera* analizando 4 muestras de acuerdo a cada pH de precipitación y tres repeticiones de cada una.

3.3.4. Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

El método utilizado fue el de digestibilidad *in vitro* que simula las condiciones del proceso gastrointestinal que ocurre en el ser humano, en condiciones de laboratorio.

3.3.4.1. Digestibilidad gástrica

Para el proceso de simulación gástrica se empleó la enzima Pepsina de origen porcino de nombre comercial SIGMA ALDRICH y un Simulador de Fluido Gástrico (SFG: NaCl 0.35 M).

Para la Simulación de Fluido Gástrico (SFG) las muestras se ajustaron a pHs 1.2 (persona con problemas gástricos) 2.0 (personas sanas) y 3.2 (niños no lactantes), simulando diferentes condiciones gástricas.

Se pesaron 10 mg de la muestra, a la cual se le añadió 1 mL de agua destilada y 1 mL de SFG a pH 1.2, 2.0, 3.2 conteniendo 2000U de enzima pepsina. La mezcla resultante fue calentada a 37°C y agitada a 500 RPM durante 2 horas, estos parámetros simulan el proceso de digestión gástrica en el ser humano. Se sometió al termoagitador marca TR100-G. Una vez concluido el tiempo de digestión gástrica, se coloca 200µL de bicarbonato de sodio 1M para parar la reacción.

3.3.4.2. Digestibilidad duodenal

Para simular la digestión duodenal se manejó la enzima Pancreatina marca SIGMA ALDRICH a una concentración de 100U y un simulador de fluido duodenal (SFD: 8% de hidróxido de sodio y 92% de fosfato monobásico) ajustados a pH 7.0.

Se tomó 1 mL del digerido gástrico y se mezcló con 1 mL de solución pancreatina ajustado a pH 7.0 neutro. Posteriormente se añadieron 1 mL de SFD. Las muestras fueron sometidas a 37°C y 500 RPM durante 2 horas simulando el proceso de digestión duodenal del ser humano en el termoagitador marca TR100-G. Finalmente se elevó a una temperatura de 80°C durante 10 min, lo cual permite parar la reacción de la enzima.

Cada ensayo tuvo 3 repeticiones.

3.3.5. Caracterización de proteínas y determinación de digestibilidad por electroforesis SDS - PAGE

Para establecer diferencias entre las proteínas de las muestras puras y las muestras después de haber sido sometidas al proceso de simulación gástrica y duodenal se elaboraron dos geles de separación por el método de electroforesis de proteínas según Laemmli en 1970 con modificaciones.

La técnica de electroforesis usada fue la SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) en un equipo BioRad Mini – PROTEAN® Tetra System, para ello se prepararon soluciones de 10 mg/mL de los concentrados proteicos y de los hidrolizados, de estas soluciones se tomaron 200 µL y se mezclaron con 200 µL de buffer de muestra (en presencia y ausencia del agente reductor). El buffer se encarga de desnaturalizar las proteínas conjuntamente con el calentamiento debido a la presencia del SDS, están constituidos como se describe a continuación:

- **Buffer con agente reductor:** 3.55 mL de agua destilada, 1.25 mL de Tris-HCl con pH 6.8 y 0.5 M, 2.5 mL de glicerol, 2 mL de SDS al 10%, 50 µL de 2-mercaptoetanol por cada 950 µL de buffer (actúa como agente reductor de puentes disulfuro, facilitando así la desnaturalización

completa y el desplegado de las moléculas de proteína) y 0.2 mL de azul de bromofenol al 0.5%.

- **Buffer sin agente reductor:** tiene la misma composición que el buffer antes descrito a excepción del 2-mercaptoetanol.
- Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 95°C durante 4 min con agitación constante a 500 RPM.

Antes de la inyección de las muestras previamente preparadas se elaboraron los geles, que actúan como un tamiz molecular permitiendo separar las moléculas en función de su tamaño y peso molecular. La composición de los geles se describe posteriormente en las tablas 1 y 2. Se gelificaron en la cuba del equipo de electroforesis vertical, colocando primero la solución del gel separador y después la solución del gel concentrador.

Tabla 1.
Composición del gel separador o de resolución

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.530 mL
Acrilamida/Bis	1.800 mL
Tris-HCL 1.5 M, pH 8,8	1.125 mL
SDS	0.045 mL
PSA	22.5 µL
Temed	2.3 mL

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

Fuente: Departamento de Investigación e Innovación de la U.E.B.

Tabla 2.
Composición del gel concentrador o de apilamiento

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.22 mL
Acrilamida/Bis	0.260 mL
Tris-HCL 0.5M, pH 6.8	0.500 mL
SDS	0.020 mL
PSA	10.00 µL
Temed	2.0 µL

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

Fuente: Departamento de Investigación e Innovación de la U.E.B.

3.3.6. Carga de las muestras, proceso de separación y teñido de los geles

Una vez formado el gel se inyectaron 10 µL de cada muestra y del estándar de pesos moleculares Dual Color de Bio Rad de 2 a 250 kDa # 161-

03734. La separación de las proteínas se efectuó a un voltaje de 200 V por 45 min.

Después de retirar el gel del equipo, fue sumergido en la solución de tinte (95% metanol, 5% azul de Coomassie) durante 4 horas, con la finalidad de que se tiñan las proteínas, para desteñir el resto del gel se utilizó una solución compuesta de 50 % de metanol, 5 % de ácido acético y 45 % de agua destilada.

Finalmente, los geles fueron analizados mediante un equipo de fotodocumentación AnalytikJena GelTower y el software Vision Works versión 8.20, el mismo que permite calcular el peso molecular de las proteínas encontradas.

3.4. Técnicas de procesamientos y análisis de datos

Los datos serán tabulados con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI a través de un análisis de varianza de ANOVA y TUKEY con un nivel de confianza de 95%.

CAPÍTULO 4

LOGROS ALCANZADOS SEGÚN LOS OBJETIVOS PLANTEADOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.
Resultados por objetivos

N°	Objetivos de investigación	Resultados alcanzados
1	Identificar el porcentaje de proteínas que contiene la <i>Moringa oleifera</i> .	Se encontraron porcentajes que van desde el 36.66 al 40.66% de proteínas en las hojas de <i>Moringa oleifera</i> de acuerdo a cada uno de los pHs de precipitación.
2	Caracterizar a nivel molecular las proteínas de <i>Moringa oleifera</i> .	Los pesos moleculares identificados varían desde 13 hasta 218 kDa como muestra la figura 3.
3	Verificar si las proteínas son digeridas en su totalidad a nivel gástrico y duodenal mediante técnica <i>in vitro</i> .	En la simulación realizada a distintos pHs: 1.2 (Personas con enfermedades gástricos) 2.0 (adultos sanos) 3.2 (niños no lactantes) se encontraron problemas de digestibilidad para el pH3.2 como se muestra en la figura 4.

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de la harina obtenida de *Moringa oleifera* se determinó un porcentaje de 25.77%. **Witt (2013)** determinó un 24% de proteína, mientras que **Stohs & Harmant (2015)** determinaron un 28,7% de la fracción proteica en las hojas secas de Moringa. El valor obtenido es totalmente comparable con los reportados bibliográficamente.

En la tabla 4, se observan los porcentajes de proteína de los concentrados proteicos de cada uno de los tratamientos estudiados (pHs 3.0, 4.0, 5.0, 6.0). Se determinó que a pH 3.0, pH 5.0 y pH 6.0 el porcentaje de proteína varía entre 39,66% y 40,66%, sin presentar diferencias significativas a nivel estadístico. A pH 4.0 se determinó un 36,66 en su valor de proteína siendo un valor diferente a nivel estadístico.

Tabla 4: Determinación del porcentaje de proteínas de los concentrados proteicos de *Moringa*

Tabla 4.
Proteínas por concentrados

(pH) de solubilización	(pH) de precipitación	Promedio de concentración de proteína (%)
	3.0	39,66
	4.0	36,66 *
8.0	5.0	40,66
	6.0	39,66

(*) Representa diferencia significativa

Editado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucumbamba

Tabla 5.
Prueba ANOVA para el porcentaje de proteínas por pH de precipitación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27	3	9	27	0,0002
Intra grupos	2,667	8	0,333333		
Total (Corr.)	29,67	11			

Como resultado del ANOVA realizado. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % proteína entre un nivel de pH de precipitación y otros, con un nivel del 95,0% de confianza.

Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido establecer que las proteínas aisladas mediante la extracción por su punto isoelectrico, es la técnica más apropiada en la obtención de concentrados proteicos de *Moringa oleifera*.

Segal & Ortega (2015) menciona que la composición química de cada proteína es característica y presenta un número diferente de grupos ionizables que se neutralizan a diferentes pHs, razón por la cual no se pudo identificar claramente el punto isoelectrico (PI) de precipitación de las proteínas de *Moringa*.

De acuerdo a los porcentajes de proteína obtenidos, se afirma la obtención de concentrados proteicos. Según el Codex, en el caso de productos de tipo vegetal excepto la soya, son considerados concentrados proteicos cuando tienen un porcentaje de proteína cercano de 40% de acuerdo a lo expresado por **Herrera (2015)**.

Caracterización de proteína mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE

De los datos observados en la figura 3:

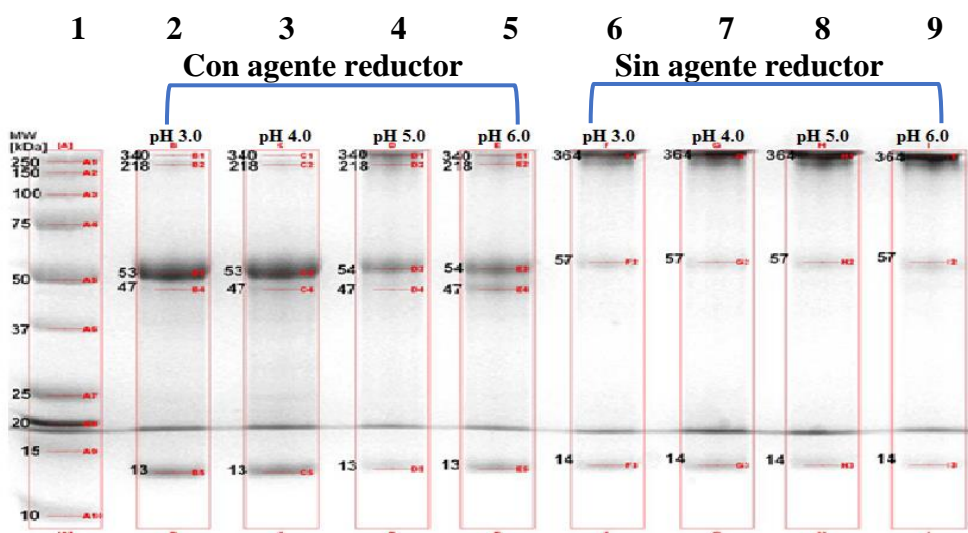


Figura 3. Caracterización de proteínas de hojas de *Moringa oleifera* mediante electroforesis SDS-PAGE. Pocillo 1: pesos moleculares del estándar; pocillo 2: pH 3.0 + 2-mercaptoetanol; pocillo 3: pH 4.0 + 2-mercaptoetanol; pocillo 4: pH 5.0 + 2-mercaptoetanol; pocillo 5: pH 6.0 + 2-mercaptoetanol; pocillo 6: pH 3.0; pocillo 7: pH 4.0; pocillo 8: pH 5.0; pocillo 9: pH 6.0.

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucumba

Fuente: Departamento de Investigación e Innovación de la U.E.B

Los pocillos 2,3, 4 y 5 con agente reductor identificaron 4 proteínas con pesos moleculares 13, 47, 53 y 218 kDa en comparación con el estándar (BIO-RAD).

En los pocillos 6,7, 8 y 9 sin la presencia del agente reductor se identificaron 2 proteínas con pesos moleculares 14 y 57 kDa

El uso del agente reductor para la identificación molecular de proteínas de *Moringa oleifera* es altamente recomendado como se evidencia en nuestro estudio.

Según **Tarone, Fasolin, Perrechil, Dupas, & Lopes (2013)** mencionan que las globulinas 7S son glicoproteínas triméricas que comprenden pesos moleculares entre: (57 kDa), (58 kDa) y (42 kDa), asociadas mediante interacciones hidrófobas. Por lo tanto, las proteínas identificadas en el presente estudio podrían corresponder al grupo de las globulinas 7S. Mientras que **Cordero & Jarma (2011)** concuerda que la globulina 7S o vicilina es una estructura trimérica que consisten de subunidades de aproximadamente 50 kDa a 70 kDa.

El uso de agente reductor en las muestras, ha permitido identificar la presencia de puentes disulfuro en las proteínas, debido a que la banda proteica de 57 kDa se ha dividido en proteínas con pesos moleculares de 47 y 54 kDa. **Lomonte (2004)** refiere que si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales.

Resultados reportados por **Pavankumar y otros (2013)** sobre el análisis del perfil de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida mostró la posible existencia de un homodímero de peso molecular de 14 kDa, de igual manera **Katre, Suresh, Islam, & Gaikwad (2008)** determinan que es un homodímero la proteína con una masa molecular de 14 kDa, al comparar con los valores obtenidos en nuestro estudio se logró identificar la presencia de estos homodímeros en los concentrados proteicos de las hojas de *Moringa* de pesos moleculares de 13 y 14 kDa.

Determinación de la digestibilidad gástrica y duodenal *in vitro* mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE

El método *in vitro* intenta imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas, sus concentraciones, el pH gástrico, tiempo de digestión, concentraciones de sal, entre otros factores. (Minekus, y otros, 2014)

De los datos de la figura 4:

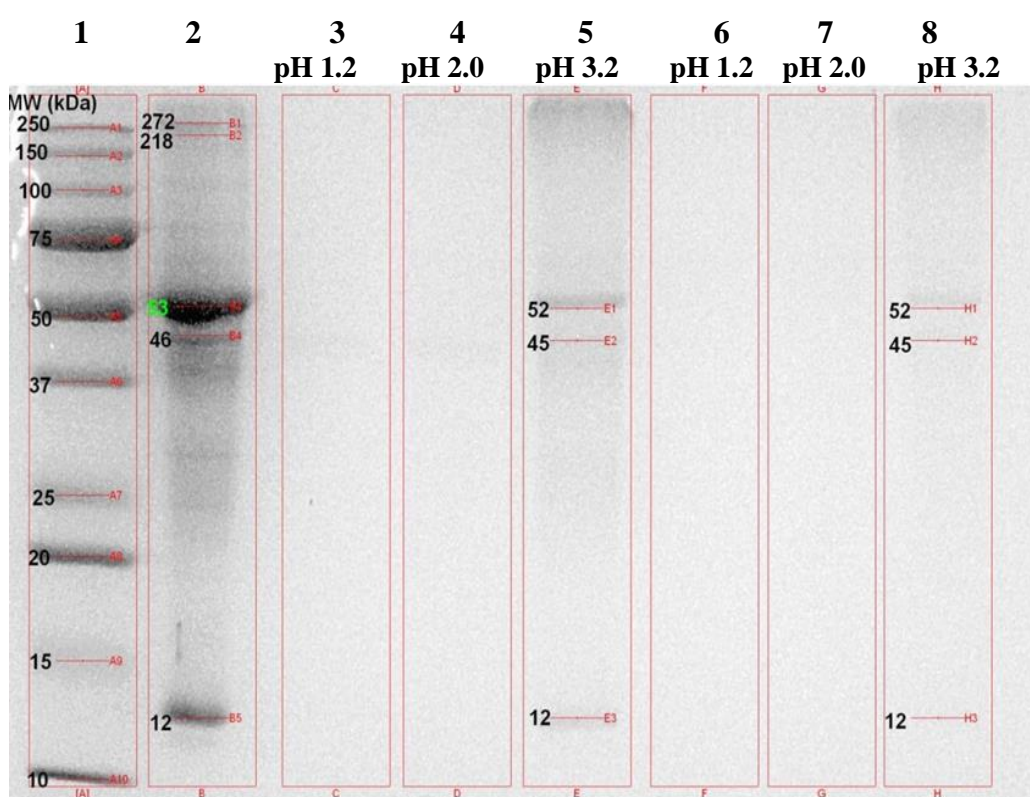


Figura 4. Determinación de la digestibilidad gástrica (3,4,5) y duodenal (6,7,8) *in vitro* de concentrados proteicos de *Moringa oleifera* mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. Pocillo 1: pesos moleculares del estándar; pocillo 2: tratamiento a pH 4.0; pocillo 3: digestibilidad gástrica de Moringa a pH 1.2; pocillo 4: digestibilidad gástrica de Moringa a pH 2.0; pocillo 5: digestibilidad gástrica de Moringa a pH 3.2; pocillo 6: digestibilidad duodenal a pH 1.2; pocillo 7: digestibilidad duodenal a pH 2.0; pocillo 8: digestibilidad duodenal a pH 3.2.

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

Fuente: Departamento de Investigación e Innovación de la U.E.B

En los pocillos 3 y 6 que simulan un pH (1.2) de adultos con problemas gástricos comparados con el estándar (BIORAD) las bandas desaparecen por completo, lo que evidencia la digestibilidad en los dos niveles.

En los pocillos 4 y 7 donde el pH (2.0) simula el estómago de un adulto sano las bandas también desaparecen por completo si las comparamos con el estándar (BIORAD).

Los pocillos 5 y 8 donde el pH (3.2) que simula el estómago de un niño no lactante, se evidencian tres proteínas con pesos moleculares de 12, 45 y 52 kDa, lo que evidenciaría que no son digeribles ni a nivel gástrico ni duodenal por lo que podrían representar un peligro para la salud.

Según **Hochwallner** , **Schulmeister** , **Swoboda**, **Spitzauer** , & **Valenta (2014)** la variabilidad en la digestibilidad *in vitro* de las proteínas en parte puede deberse a las diferencias en el pH del ensayo, la pureza de la pepsina, la relación enzima/sustrato, la pureza de la proteína y su estructura, tratamientos térmicos y, por último, el método de detección. De igual manera **Carrillo (2014)** manifiesta que otros trabajos proponen que la resistencia a la digestión por pepsina no puede utilizarse como un método para predecir el poder alergénico. Razón por la cual las proteínas de pesos moleculares de 12, 45 y 52 kDa no podrían calificarse como alérgenos, pero podrían representar riesgos para la salud al no poder asimilarse, manifestándose al menos en un proceso diarreico.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Comprobación de las Hipótesis.

Determinación cuantitativa de proteínas de concentrados proteicos de *Moringa oleifera*.

Se rechaza la hipótesis nula **H₀**: El contenido proteico de concentrados de *moringa* es igual en todos los pH de precipitación.

Se acepta la hipótesis alternativa **H₁**: Por lo menos uno de los contenidos proteicos no es igual a los demás.

Digestibilidad gastrointestinal de concentrados proteicos de *Moringa oleifera*.

Se rechaza la hipótesis nula **H₀**: Todos los concentrados proteicos de *moringa oleifera* son digeridos a nivel gastrointestinal.

Se acepta la hipótesis alternativa **H₁**: Al menos una de las proteínas caracterizadas de la *moringa oleifera* no es digeridas a nivel gastrointestinal.

5.2. Conclusiones

El contenido de proteínas encontrado en las muestras utilizadas para el estudio (25.77%) coinciden con los resultados obtenidos por otros autores ofreciéndonos una garantía sobre el proceso analítico posterior.

Las proteínas de peso molecular de 47, 53 y 57 podrían considerarse como globulinas 7S y finalmente las proteínas de peso molecular de 13 y 14 kDa se podrían denominar como homodímeros.

Las proteínas con un peso molecular de 218 kDa no se encuentran descritas en ninguna base de datos disponible para el efecto.

Luego de la simulación de la digestibilidad gástrica y duodenal se ha establecido que las proteínas de la *moringa* son de fácil digestión en adultos mientras que en la simulación *in vitro* a menores no lactantes a pH: 3,2, las proteínas son parcialmente digeribles y podrían representar un riesgo para la salud.

5.3. **Recomendaciones**

Se puede recomendar el consumo de la *Moringa oleifera* analizada en los adultos, sus altos contenidos de proteínas permitirían: reparar tejidos de la piel, órganos, músculos, uñas, pelo y huesos, generar anticuerpos que refuerzan el sistema inmunológico, aportan energía, mantener los correctos niveles de azúcar en nuestra sangre basados en la bibliografía consultada.

Se recomienda el uso de la Cromatografía líquida para identificar el tipo de proteína de acuerdo a los pesos moleculares identificados y los beneficios que pueden generar.

Realizar estudios en los cuales se determine las cantidades en las que se puede consumir la *Moringa* tanto en adultos y niños de acuerdo a la capacidad de absorción de los individuos.

Realizar investigaciones adicionales que corroboren los resultados obtenidos en el presente estudio, permitiéndose descartar o no la presencia de alérgenos en las proteínas encontradas.

El profesional de salud debe actualizar sus conocimientos sobre la medicina tradicional enfocándose en los beneficios que proporciona el consumo de las hojas de Moringa y aquellos efectos adversos que pueden surgir.

El personal de enfermería debe educar a los usuarios acerca de la ingesta de dicha planta ya que la ONU menciona que el consumo Moringa es de 1g por kg de peso corporal, si este excede pueden presentar molestias tales como: náuseas, diarrea y acidez estomacal.

Se recomienda que el consumo de las hojas de Moringa es segura a diferencia de la raíz ya que esta contiene sustancias tóxicas.

Mediante la consejería se puede promocionar que dentro de la dieta se encuentre el consumo de las hojas de Moringa ya que contiene vitaminas y minerales indispensables para el desarrollo.

5.4. Bibliografía

- Bakker, L. (2017). CONSEJO LATINOAMERICANO DE PROTEINA ANIMAL. *COLAPA*, 1-38.
- Carrillo, J., Candia, M., Lugo, R., Espinoza, E., & Noriega, J. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *INVURNUS*, 19-26.
- Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 109-122.
- Chuku, E. (2013). STUDIES ON THE NUTRIENT COMPOSITION OF MORINGA OLEIFERA AND ITS. *ResearchGATE*, 27-37.
- Cordero, C., & Jarma, A. (2011). PRODUCTOS DE LA ASIMILACIÓN DEL NITRATO SE DEPOSITAN EN PLANTAS COMO PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO. 9-22.
- Coz, X., Campos, R., Reynoso, R., Ramos, M., Loarca, F., & Guzmán, S. (2018). La infusión de Moringa (*Moringa oleifera*), rica en compuestos fenólicos y con alta capacidad antioxidante, atenúa el óxido nítrico mediador proinflamatorio in vitro X. *ELSIEVER*, 1.
- Cuellar, M., Ocampo, L., Vega, R., Gallegos, M., Gonzales, E., & Loarca, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food Research International*, 159-168.
- Doménech, G., Durango, A., & Ros, G. (2017). MORINGA OLEIFERA: REVISION SOBRE APLICACIONES Y USOS EN ALIMENTOS. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 86-96.
- Duarte, P. (3 de 02 de 2012). Aislamiento y caracterización de las fracciones proteicas de las semillas de Moringa oleifera. *Trabajo de titulación*. Obregon Sonora, Mexico.

- Estrada, O., Hernandez, O., & Guerrero, V. (2016). MULTIPLES FORMAS DE APROVECHAR LOS BENEFICIOS DE LA MORINGA (Moringa oleifera Lam.). *Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*, 101-108.
- Estupiñan , L. (OCTUBRE de 2017). TRABAJOS FINALES DE MAESTRIA. *FACTIBILIDAD DE IMPLEMENTACION DEL PROCESO DE PRODUCCION ORGANICA Y COMERCIALIZACION DE LA MORINGA OLEIFERA y comercialización de la Moringa oleifera en la finca Valeria. Guayas. GUAYAQUIL, ECUADOR: Universidad Espiritu Santo.*
- Garcia, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *SCRIBD*, 31-41.
- Gomez, D., Pita, V., & Zumalacárregui, B. (2016). CARACTERIZACION DE ACEITES DE LAS SEMILLAS DE MORINGA A PARTIR DE LA EXTRACCION POR DIFERENTES METODOS. *BDIGITAL*, 106-111.
- Gomez, L. (4 de Noviembre de 2013). *Moringa El Arbol Maravilloso*. Obtenido de <http://vivamoringa.blogspot.com/2013/11/la-moringa-alimento-de-primer-orden-en.html>
- Greffa, J., Barrionuevo, A., Vilcacundo, E., & Carrillo , W. (2018). GASTROINTESTINAL DIGESTION OF KAHAI PROTEIN CONCENTRATE (CARYODENDRON ORINOCENSE KARST). *Asian Juornal of Pharmaceutical and Clinical REsearch*, 397- 400.
- Gunaid , F., & Ibrahim, M. (2013). Moringaoleifera: Nature is Most Nutritious and Multi-Purpoce Tree. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 1-5.
- Herrera, F., Mares, E., Del Rinco , M., Ordoñez, L., & Leon, M. (2016). ANALISIS PROTEOMICO PRELIMINAR DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DE LA SEMILLA DE CHICAYOTA (cucurbita argyrosperma sororia). *Investigacion y Desarrollo en Ciencias y Tecnologia de Alimentos*, 430-435.

- Herrera, P. (2015). *Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción*. Obtenido de Extracto Proteico del Salvado de Arroz”: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwjLkNTJypfdAhUtzlkKHc8_CHgQFjAAegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.dspace.espol.edu.ec%2Fretrieve%2F94382%2FD-CD88201.pdf&usg=AOvVaw3CFu7vq4UUMCGIFYRtqdeA
- Hochwallner , H., Schulmeister , U., Swoboda, I., Spitzauer , S., & Valenta, R. (2014). Cow’s milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 22-33.
- Katre, U., Suresh, C., Islam, M., & Gaikwad, S. (2008). Structure activity relationship of a hemagglutinin from. *ELSEVIER*, 203-207.
- Landázuri, A., Villarreal, J., Núñez, E., Pico, M., Lagos, A., Caviedes, M., & Espinosa, E. (2018). Evaluación experimental de Moringa oleifera triturada Lam. Semillas y residuos de polvo durante los procesos de coagulación-floculación. *ELSIEVER*, 3.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2016). Semillas y aceites de Moringa oleifera: Características y usos para la salud humana. *Revista Internacional de Ciencia Molecular*, 1.
- Lomonte, B. (s.f.). Obtenido de <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Lomonte%20-%20Cap13%20PAGE.pdf>
- Martin, C., Martin, G., Garcia, A., Fernandez, T., Hernandez, E., & Puls, J. (2013). Potenciales aplicaciones de Moringa oleifera. Una revisión. *Scielo*, 137-149.
- Mengfei, L., Junjie, Z., & Xiaoyang, C. (2018). Los flavonoides bioactivos en la Moringa oleifera y sus promotores de la salud. propiedades. *ELSIEVER*, 1-2.

- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., & Carriere, F. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function-The Royal Society of Chemistry*, 1113-1124.
- Montesano, D., Cossignani, L., & Blasi, F. (2018). Cultivos sostenibles para la seguridad alimentaria: Moringa (*Moringa oleifera* Lam.). *ELSIEVER*, 1.
- Mora, J., & Gacharná, N. (2015). *EL ÁRBOL MILAGROSO: LA MORINGA OLEIFERA*. Biodiversidad - Colombia .
- Ndabigengesere, A., Subba, K., & Talbot, B. (1995). Active Agents and Mechanism of Coagulation of Turbid Water Using *Moringa oleifera*. *ELSEVIER*, 703-710.
- Olson, M., Sankaran, R., Fahey, J., Grusak, M., Odee, D., Nouman, W., & Aroca, R. (2016). Leaf Protein and Mineral Concentrations across the “Miracle Tree” Genus *Moringa*. *PLoS One*, 1-17.
- Omotoso, G., Gbadamosi, I., Olajide, O., Dada, S., Arogundade, T., & Yawson, E. (2018). *Moringa oleifera* phytochemicals protect the brain against experimental nicotine-induced neurobehavioral disturbances and cerebellar degeneration. *Pathophysiology*, 57-62.
- Pavankumar , A., Kayathri, R., Murugan, N., Zhang, Q., Srivastava, V., Okoli, C., & Bulone, V. (2013). Dimerization of a flocculent protein from *Moringa oleifera*: experimental evidence and in silico interpretation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.*, 406-415.
- Peña, J., Ramirez, O., & Barrera, B. (2013). LOS METODOS EXPERIMENTALES QUE PERMITEN EL ESTUDIO DE LAS MACROMOLECULAS DE LA VIDA: HISTORIA, FUNDAMENTOS Y PERSPECTIVAS. *Educación química*, 237-246.
- Puruncajas, Y. (Marzo de 2017). *Método de secado en frío (liofilización) y secado en calor (spray dryer) para la obtención*. Ambato, Tungurahua, Ecuador: UTA.

- Raman, J., Alves, C., & Gnansounou, E. (2018). A review on moringa tree and vetiver grass – Potential biorefinery feedstocks. *Bioresource Technology*, 1044-1051.
- Sanchez, Y., Martinez, G., Sinagawa, S., & Vazquez, J. (2013). Moringa oleifera. importancia, Funcionalidad y Estudios Involucrados. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 24-30.
- Sausedo, S., Torres, J., Castro, C., Rojas, R., Sanchez, E., Ngangyo, M., & Martínez, G. (2018). Moringaplants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *PubMed*, 1-58.
- Stohs, S., & Harmant, M. (2015). Review of the Safety and Efficacy of Moringa. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 796–804 .
- Suradech Kongkiatpaiboon. (4 de Agosto de 2016). Moringa (también conocido como Moringa oleifera Lam., MORINGACEAE, Futaba martillo Kom, hum vegetal, insecto del ronquido de moringa, moringa error Hoo) de la hoja en el fondo tablero de madera.
- Tarone, A. G., Fasolin, L. H., Perrechil, F. A., Hubinger, M. D., & Cunha, R. L. (2013). Influence of drying conditions on the gelling properties. *Food and Bioproducts Processing*, 111-120.
- Teixeira, E., Barbieri, M., Neves, V., Silva, M., & Arantes, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from Moringa oleifera Lam. leaves. *Food Chemistry*, 51-54.
- Terrazas, V., García del Carpio, H., Albarracin, H., & Fernández, K. (2017). Estudio histoquímico, morfológico y anatómico de Moringa oleifera. *SCRIBD*, 9.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G., Balters, M., Dearman, R., & Esdaile, D. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 87-98.

- Tiloke, C., Anand, K., Gengan, R., & Chuturgoon, A. (2018). Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative. *ELSEVIER*, 2.
- Vallejo Ibarra, Y. E., & Ramos Moya, M. R. (s.f.). OBTENCION DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE LA HARINA DE ARVEJA(Pisum Sativum) Y DETERMINACION DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL METODO DEL ACIDO TIOBARBITURICO (TBA). *TESIS*. UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO, AMBATO.
- Velazquez, M., Peon, I., Zepeda, R., & Jimenez, M. (2016). Moringa (Moringa oleifera Lam.): potential uses in agriculture, industry and medicine . *Chapingo Serie Horticultura* , 95-116.
- Villareal, A., & Ortega, K. (2014). REVISIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS Y USOS DE LA PLANTA Moringa oleifera. *Investigación & Desarrollo*, 309-330.
- Witt, K. (2013). El contenido de nutrientes de las hojas de Moringa oleifera . *ECHOcommunity*.
- Yang, L., Xiao yue Wang, W., Xue Min, W., Zi Tong, G., & Jian Pping, H. (2018). Valores, propiedades y utilidad de diferentes partes de la Moringa oleifera: una visión general. *Chinese Herbal Medicines*, 2-4.

5.5. Anexos

Anexo 1. Recursos

Tabla 6.
Recursos humanos

Autoras:	Srta. Carolina Carvajal. Srta. Elizabeth Catucuamba.
Tutor:	Ing. Edgar Marcelo Vilcacundo MSc.
Personal Colaborador:	Ing. María Fernanda Quinteros. Ing. Roberto Moran.

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

Materiales de oficina

- Libreta de apuntes
- Hojas Tamaño A4
- Computadora
- Internet
- Calculadora
- Esferos gráficos
- Cámara fotográfica
- Marcador para rotulas las muestras

Anexo 2. Presupuesto

Tabla 7.
Presupuesto

Materiales	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Internet	380h	\$0.60	\$228
Impresión de oficios de presentación y validación del tema.	16	\$0.10	\$1.60
Impresión de borradores Anillados	3	\$10.00	\$30.00
	3	\$1.50	\$4.50
Empastado del Proyecto de Investigación.	1	\$15.00	\$15.00
Cd y portada	1	\$4.00	\$4.00
Muestra de <i>Moringa</i>	12	\$1.60	\$19.20
Frascos de muestras	12	\$0.35	\$4.20
Movilización	150	\$0.30 Guaranda \$0.30 Laguacoto	\$90.00
Total de gastos			\$396.50

Presupuesto financiado por la U.E.B

Hidróxido de Sodio	12	\$0.03	\$0.35
Ácido Clorhídrico	1	\$3.75	\$3.75
Análisis de proteína	4	\$12.31	\$49.24
Proceso de liofilización	2	\$22.51	\$45.02
Ultra congelación	2	\$24.35	\$48.70
Pepsina	9	\$0.44	\$4.00
Pancreatina	9	\$0.05	\$0.45
SFG	1	\$0.05	\$0.05
SFD	1	\$0.10	\$0.10
Kit de electroforesis+proceso	2	\$112	\$224
Otros			\$85.00
Total			\$460.66

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba

Anexo 3. Cronograma de Actividades

Tabla 8. Tabla 9.
Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO
Entrega de documentos a Consejo Universitario.	X					
Asignación de tutor y entrega de oficios	X					
Planteamiento del problema	X					
Formulación del problema	X					
Objetivos generales y específicos	X					
Justificación de la investigación		X	X			
Marco teórico		X	X			
Marco metodológico		X	X			
Desarrollo de la fase experimental	X	X	X			
Procesamiento de información.				X		
Conclusiones y recomendaciones.					X	
Redacción de la bibliografía					X	
Revisión y corrección de tutoras.					X	
Corrección de primer borrador.						
Autorización del tutor para la entrega del borrador.						X
Entrega de borrador del proyecto para la asignación de pares.						
Entrega de primer borrador a los pares académicos.						
Calificación final del proyecto.						
Sustentación del proyecto de investigación						X

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucucamba

Anexo 4. Evidencias pruebas de laboratorio

OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE *MORINGA OLEIFERA*



Figura 5. Obtención de la harina de las hojas de *Moringa*



Figura 6. Peso de las muestras



Figura 7. Precipitación de la muestra con agua destilada.

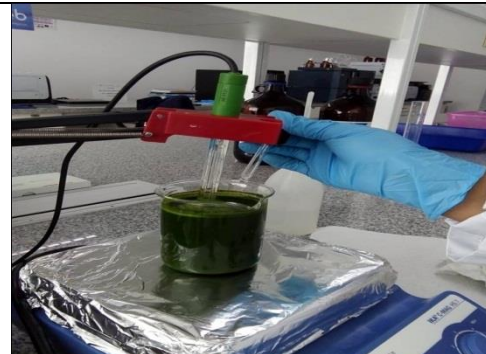


Figura 8. Proceso de agitación y ajuste a un pH de solubilidad de 8.0 de *Moringa Oleifera*.(NaOH)

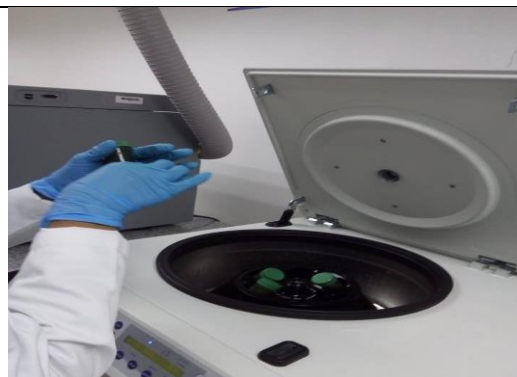


Figura 9. Proceso de centrifugación de la muestra

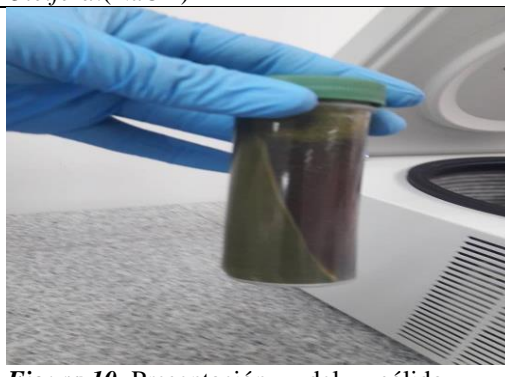


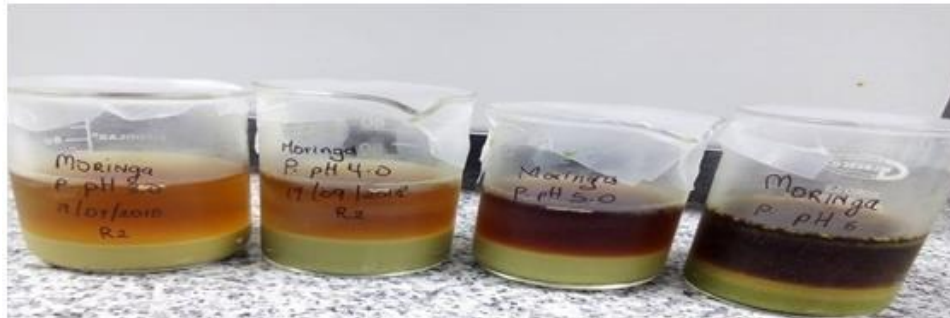
Figura 10. Presentación del sólido y sobrenadante al finalizar la centrifugación.



Figura 11. Proceso de filtración



Figura 12. Proceso de agitación y ajuste a un pH de precipitación de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0. (HCL)



pH 3.0

pH 4.0

pH 5.0

pH 6.0

Figura 13. Obtención de la proteína y sobrenadante de acuerdo al pH de precipitación posterior a las 48h de refrigeración

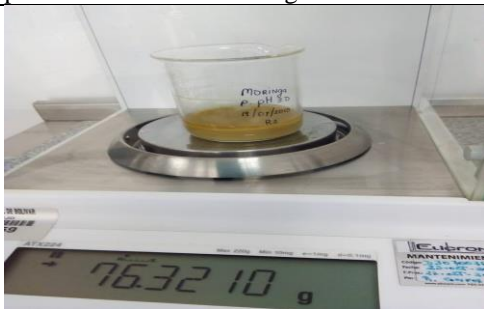


Figura 14. Eliminación del sobrenadante y peso de la proteína de *Moringa*

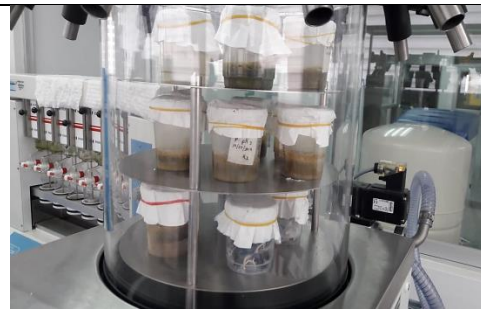


Figura 15. Secado por Liofilización

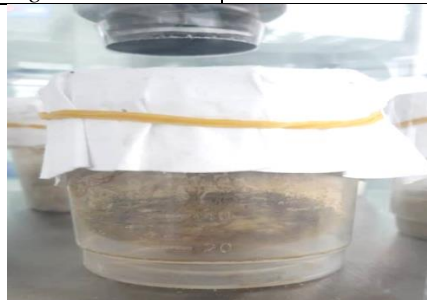


Figura 16. Concentrado de proteína (LIOFILIDAZA)



Figura 17. Peso de los comprimidos para calibración



Figura 18. Elaboración de las canastas de aluminio

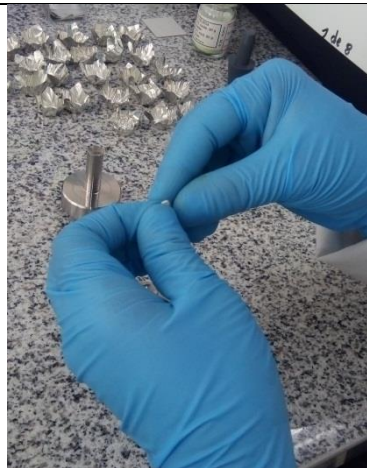


Figura 19. Elaboración de los comprimidos de calibración



Figura 20. Elaboración de los comprimidos de las muestras



Figura 21. Obtención de las pastillas.



Figura 22. Muestras para el análisis elemental.

TÉCNICA DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE

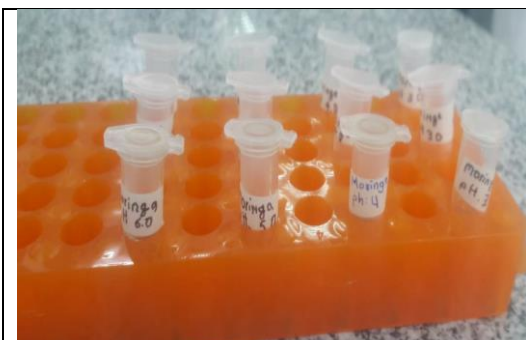


Figura 23. Muestras para la realización de electroforesis



Figura 24. Termo agitación de las muestras

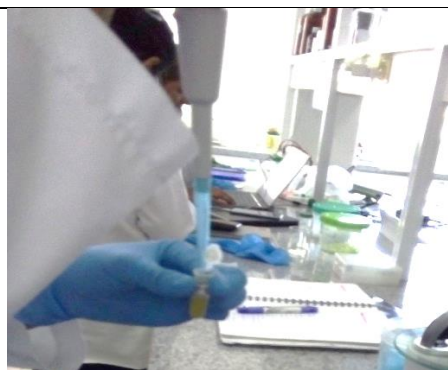


Figura 25. Colocación de agente reductor (2-mercaptoetanol)

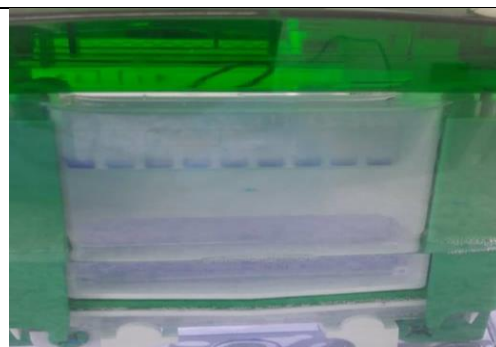


Figura 26. Muestras en la cuba de electroforesis



Figura 27. Migración de las partículas desde el cátodo hacia el ánodo



Figura 28. Coloración con Azul de Coomassie en el gel obtenido

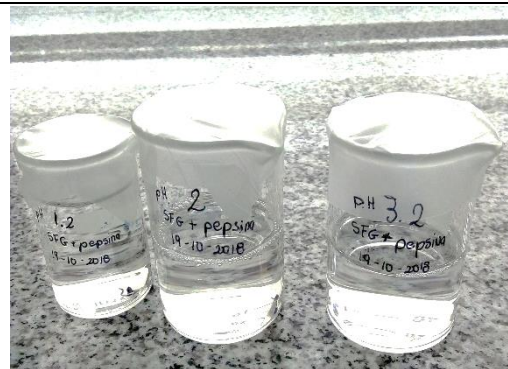


Figura 29. pHs para la simulación de la digestibilidad



Figura 30. Colocación de pHs de simulación gástrica para posterior electroforesis.

Tabla 10.*Porcentaje de proteínas de acuerdo a los pHs y sus replicas*

IDENTIDAD	% NITROGENO	FACTOR	% DE PROTEINA
Moringa O pH 3.0	6,31	6,25	39
Moringa O pH 4.0	5,88	6,25	37
Moringa O pH 5.0	6,44	6,25	40
Moringa O pH 6.0	6,47	6,25	40
Moringa O pH 3.0	6,39	6,25	40
Moringa O pH 4.0	5,82	6,25	36
Moringa O pH 5.0	6,6	6,25	41
Moringa O pH 6.0	6,43	6,25	40
Moringa O pH 3.0	6,37	6,25	40
Moringa O pH 4.0	5,91	6,25	37
Moringa O pH 5.0	6,58	6,25	41
Moringa O pH 6.0	6,27	6,25	39

Elaborado por: Carolina Carvajal y Elizabeth Catucuamba**Fuente:** Departamento de Investigación e Innovación de la U.E.B.**Tabla 11.***Prueba ANOVA para el porcentaje de proteínas por pH de precipitación*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27	3	9	27	0,0002
Intra grupos	2,667	8	0,333333		
Total (Corr.)	29,67	11			

Fuente: ANOVA

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % proteína entre un nivel de pH de precipitación y otros, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 12.*Porcentaje de concentrados proteicos*

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	3	36,6667	X
3	3	39,6667	X
6	3	39,6667	X
5	3	40,6667	X

Fuente: TUKEY HSD

Tabla 13.
Determinación de diferencias estadísticas significativas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3	*	3	1,50907
3		-1	1,50907
3		0	1,50907
4	*	-4	1,50907
4	*	-3	1,50907
5		1	1,50907

*** indica una diferencia significativa.**

Fuente: ANOVA

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Tabla 14.*Caracterización de proteínas e identificación del peso molecular.*

Band	CON 2-MERCAPTOETANOL					SIN 2-MERCAPTOETANOL			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
		pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0
1	250 kDa	339,66	339,66	339,66	339,66	363,60	363,60	363,60	363,60
2	150 kDa	218,16	218,16	218,16	218,16	56,99	56,99	56,99	56,99
3	100 kDa	52,55	52,55	54,22	54,22	13,74	13,74	13,74	13,77
4	75 kDa	47,12	47,12	47,12	47,12				
5	50 kDa	13,13	13,13	13,43	13,43				
6	37 kDa								
7	25 kDa								
8	20 kDa								
9	15 kDa								
10	10 kDa								

Fuente: Foto documentación AnalytikJena GelTower y el software Vision Works versión 8.20

Tabla 15.

Digestibilidad gastrointestinal.

Band	DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA					DIGESTIBILIDAD DUODENAL.		
	A	B	C pH 1.2	D pH 2.0	E pH 3.2	F pH 1.2	G pH2.0	H pH 3.2
1	250 kDa	271,74			52,16			52,16
2	150 kDa	218,31			44,71			44,71
3	100 kDa	52,80			12,33			12,33
4	75 kDa	45,79						
5	50 kDa	12,33						
6	37 kDa							
7	25 kDa							
8	20 kDa							
9	15 kDa							
10	10 kDa							

Fuente: Foto documentación AnalytikJena GelTower y el software Vision Works versión 8.20

