

# **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

## **ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE AMARANTO (*amaranthus dubius*).**

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por los Brs. Urdaneta H. Alejandro G.,  
Zambrano A. José A.  
Para optar al Título  
de Ingeniero Químico

Caracas, 2010

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE  
AMARANTO (*amaranthus dubius*).**

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Johliny Casanova

TUTOR INDUSTRIAL: Dra. Susana Lobos

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por los Brs. Urdaneta H. Alejandro G.,  
Zambrano A. José A.  
Para optar al Título  
de Ingeniero Químico

Caracas, 2010.

Caracas, 01 de Noviembre de 2010

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por los Bachilleres Alejandro Gabriel Urdaneta Herrera y José Antonio de Jesús Zambrano Andazol, titulado:

**“ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE  
AMARANTO (*amaranthus dubius*).”**

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Ingeniero Químico y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran APROBADO.

---

Prof. Francisco Yáñez

Jurado

---

Profa. Alejandra Meza

Jurado

---

Prof. Johliny Casanova

Tutor

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirnos alcanzar la gran meta de graduarnos y cumplir con nuestras aspiraciones profesionales.

A la Universidad Central de Venezuela por darnos la posibilidad de formarnos como Ingenieros Químicos dentro de sus espacios. Por permitirnos crecer como personas integrales y consientes de la realidad de nuestro país.

Al Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) por darnos la oportunidad y todo lo necesario para la realización de este Trabajo Especial de Grado.

A nuestra tutora industrial la Dra. Susana Lobos por brindarnos sus valiosos conocimientos en el área de laboratorio y por la gran amistad y confianza mostrada a lo largo de la realización de este trabajo de grado.

A la Profesora Johliny Casanova por el apoyo y disponibilidad mostrada en todo momento. Por todo el conocimiento brindado para realizar, de la mejor manera posible, este trabajo especial de grado.

A Dubrasvka Rodríguez, por sus consejos y orientación prestada además de su valiosa colaboración y apoyo para llevar a cabo, los diferentes ensayos requeridos para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo. A Tomás Bonillo e Iván Sojo, sus consejos y el conocimiento brindado. A Yulissa Antequera y Elisamelis Martínez, por sus consejos y apoyo. A todos los miembros del Laboratorio de Estructura Molecular del Centro de Biociencias de la Fundación IDEA, por su amabilidad y por estar pendientes de nuestro buen desempeño en el laboratorio.

Al Ing. Blas Brando y a la Ing. Laura Bónoli por facilitarnos la materia prima necesaria para realizar los estudios de laboratorio.

A mi madre por apoyarme en todo los proyectos que emprendo, por estar siempre cerca para guiarme por el buen camino, gracias a su sabiduría y experiencia, por estar presente en los momentos más importantes y por darme su amor incondicional en todo momento, ¡te quiero de aquí al cielo!.

A mi papá que sé que desde el cielo está orgulloso de mi.

A mi hermano por ser como un padre para mí, por estar pendiente de mí en todo momento, por ser mi gran amigo y porque me ha dado alguien a quien admirar, gracias hermano eres un ejemplo a seguir.

A Ángela, mi vida, mi amor, mi mejor amiga, mi jarita, gracias por estar siempre junto a mí en todo momento, por ser una persona tan maravillosa, por apoyarme en mis proyectos de vida, por todo lo que he aprendido junto a ti. ¡Te Adoro mi princesa!

Alejandro Urdaneta

Agradezco a mi Madre por ser esa maravillosa persona que con su sabiduría y experiencia de vida siempre luchó por hacer de mí una mejor persona... simplemente no existen palabras para expresar todo ese cariño y ese amor que siento por ti.

A mi hermana Carolina por ser mi segunda madre y siempre estar pendiente de que no me faltara nada en ningún momento, por representar un modelo a seguir como profesional y como persona.

A mi hermana Iriana por el inmenso cariño que siempre me ha dado y por la confianza que siempre tuvo en mí. Eres una persona con una calidad humana insuperable.

A mis compañeros y grandes amigos Alejandro y Ángela por ser las maravillosas personas que son.

**José Antonio Zambrano Andazol**

**Urdaneta H., Alejandro G. y Zambrano A., José Antonio**

**ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
PROTEÍNA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE  
AMARANTO (*amaranthus dubius*).**

**Tutor académico: Prof. Johliny Casanova. Tutor industrial: Dra. Susana  
Lobos. Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de  
Ingeniería Química .Año 2010, 57 páginas.**

**Palabras clave:** Amaranto, extracción sólido-líquido, proteínas, escalamiento

**Resumen.**

El Amaranto es un cultivo que ha sido olvidado a lo largo de la historia a pesar de poseer propiedades nutricionales extraordinarias. Contiene en sus estructuras una mayor cantidad de proteínas en comparación con otras plantas como la espinaca. En este Trabajo Especial de Grado se planteó proponer un escalamiento del proceso de extracción de la proteína de la hoja del follaje de la planta de amaranto.

El proceso de extracción de proteínas vegetales a partir de la harina de la hoja de la planta de amaranto (*amaranthus dubius*) fue realizado tomando como base el protocolo desarrollado por R. Juan y colaboradores en el año 2007, en el cual se utilizó como solvente extractor una solución de NaOH y agua destilada con una concentración de 0,2% (p/v). La relación de harina/solvente utilizada fue de 1:12. Se varió el tiempo, la temperatura de extracción y el número de lavados con solvente fresco para identificar la influencia de estos parámetros en el rendimiento del proceso de extracción proteica. Se establecieron entonces las condiciones más favorables para la extracción como las siguientes:  $T = 40^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 30$  minutos y tres lavados con solvente puro. Partiendo de esta premisa se procedió a proponer un escalamiento del proceso de extracción usando el procedimiento descrito por Giankoplis, (1998).

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	2
FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.2 ANTECEDENTES.....	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.3.1 General .....	4
1.3.2 Específicos .....	4
CAPITULO II .....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 EL CULTIVO DE AMARANTO .....	6
2.1.1 Productos alimenticios desarrollados a partir del amaranto.....	8
2.2 LAS PROTEÍNAS .....	8
2.2.1 Características .....	9
2.2.2 Clasificación de las Proteínas.....	9
2.2.3 Extracción de proteínas .....	10
2.2.4 Método de identificación de grupos proteicos .....	10
2.2.5 Método de cuantificación de proteínas .....	12
2.3 ESCALAMIENTO.....	14
2.3.1 Aplicaciones de las plantas piloto. ....	15
2.3.2 Análisis Dimensional. ....	16
2.3.3 Cambio de escala en procesos químicos .....	17
2.3.4 Consideraciones del cambio de escala .....	18
2.3.5 Teoría de la Semejanza .....	18
CAPÍTULO III.....	21
METODOLOGÍA .....	21
3.1 ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO .....	21
3.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	22
3.3 PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....	22



3.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	23
3.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS PROTEICOS .	24
3.5.1 Identificación de grupos proteicos .....	24
3.5.2 Cuantificación de grupos proteicos.....	31
3.6 ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	32
3.6.1 Análisis Dimensional .....	33
3.6.2 Teoría de la Semejanza .....	34
3.7 LISTA DE REACTIVOS.....	35
3.8 LISTA DE EQUIPOS .....	35
CAPÍTULO IV .....	37
DISCUSION DE RESULTADOS .....	37
4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LABORATORIO .....	37
4.2 BASES DEL ESCALAMIENTO.....	43
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1 Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad.....	12
Tabla N°2 Principales métodos para la cuantificación de proteínas, con sus ventajas e inconvenientes .....	13
Tabla N°3 Contenido de cada pozo en los geles estudiados.....	39
Tabla N°4 Valores de concentración en función a las diferentes condiciones de operación estudiadas.....	39
Tabla N°5 Porcentaje de rendimiento del proceso a las diferentes condiciones estudiadas.....	42
Tabla N°6 Dimensiones del tanque de preparación de la solución de NaOH.....	45
Tabla N°7 Estudio de volumen de mezcla amaranto/solvente.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Plantas de Amaranto.....	7
Figura N°2: Esquema General del Proceso .....	19
Figura N°3: Muestra luego de la centrifugación.....	22
Figura N°4: Kit de Bio-Rad Laboratories para la electroforesis en gel.....	23
Figura N°5: Pasos para el montaje del molde del gel.....	24
Figura N°6: Representación gráfica del recorrido de las muestras a través del gel durante la electroforesis.....	26
Figura N°7: Características principales de la celda y gel de electroforesis.....	27
Figura N°8: Gel revelado con la tinción de plata.....	29
Figura N°9: Microplaca usadas para el método de Bradford.....	31
Figura N°10: Gel 1. Estudio electroforético.....	37
Figura N°11: Gel 2. Estudio electroforético.....	38
Figura N°12: Estudio de cuantificación de proteínas mediante el método de BCA...	43
Figura N°13 Diagrama de Flujo de Procesos de la planta a escala piloto.....	44
Figura N°14: Gráfica del número de potencia en función del Reynolds.....	49
Figura N°15: Especificaciones del Tanque de Agitación.....	54

## **INTRODUCCIÓN**

A nivel mundial existen altos niveles de desnutrición en poblaciones de bajos recursos, teniendo en común la deficiencia del consumo de proteínas. Esta problemática es la principal causante de muchas enfermedades como la enfermedad de Kwashiorkor. El amaranto es un cultivo que ha sido olvidado a lo largo de la historia a pesar de poseer un alto nivel nutricional, conteniendo en sus estructuras una mayor cantidad de proteínas en comparación con otras plantas como la espinaca, es por esto que en el presente trabajo se propuso un escalamiento del proceso de extracción de proteínas totales a partir de la harina de la hoja de amaranto, tomando en consideración algunas de las variables del procesos (tiempo de agitación de la mezcla harina/solvente, temperatura de extracción y números de lavados con solvente fresco). La propuesta de escalamiento contempló llevar el proceso desde la escala de laboratorio hasta una escala piloto.

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron ensayos de laboratorio variando los parámetros mencionados anteriormente. Se tomó como base el proceso desarrollado por R. Juan y colaboradores para el año 2007.

Para determinar los tipos de grupos proteicos y la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras se usaron métodos como la electroforesis en gel de poliacrilamida y de cuantificación por BCA respectivamente. El comportamiento de las variables estudiadas permitió establecer unas condiciones óptimas de extracción que fueron utilizadas como base para el desarrollo del proceso de extracción de proteínas de la hoja de la planta de amaranto.

## CAPÍTULO I

### FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Venezuela cuenta con una población total aproximada de 28 millones de habitantes (The World Bank, IBRD & IDA (s.f)), de los cuales alrededor de un 12% se encuentra en estado de subnutrición (Food and Agriculture Organization (FAO), 2010). Se estima de igual forma que los casos de malnutrición infantil por falta de peso y por retraso en el crecimiento oscilan entre un 5 y 13% de la población total del país (FAO, 2010). Una posible solución a dicha problemática podría ser el desarrollo de un cultivo poco aprovechado en la actualidad y que históricamente ha sido olvidado a pesar de que posee propiedades nutricionales extraordinarias, como es el caso del amaranto (*amaranthus dubius*), planta conocida mayormente con el nombre de Bledo o Pira. Una de sus principales propiedades es que cuenta con un contenido proteínico comparativamente superior a plantas similares, como la espinaca, además de la presencia de aminoácidos esenciales como lisina y metionina (encargados de funciones vitales para el organismo como lo es su participación en la síntesis hormonal (Muñoz, 2009), alto contenido de fibra, calcio, hierro y vitaminas A y C (Alimentación Sana, 2010). Asimismo, es una planta muy adaptable a condiciones de crecimiento limitadas en agua y nutrientes minerales, resiste mucho el calor extremo. La calidad de proteína de amaranto y su perfil de aminoácidos esenciales permite la elaboración a gran escala de diversos productos con excelentes relación costo-beneficio. Se puede usar la hoja fresca y seca, el grano seco molido, el grano seco

reventado, y con combinaciones como complemento alimenticio e incluso es posible realizar extracciones proteicas con el fin de enriquecer otros alimentos. En este Trabajo Especial de Grado se plantea realizar extracciones de proteína total proveniente de la hoja de la planta, debido a que existen numerosos estudios realizados al grano y como se sabe la hoja también posee un notable contenido proteico que debería ser aprovechado, tomando como referencia un procedimiento de extracción de proteínas ya establecido (R. Juan y col. 2007) con la finalidad de obtener un producto que pueda ser utilizado por las industrias de alimentos para enriquecer los mismos y de esta manera combatir los problemas de nutrición de las poblaciones de bajos recursos.

## 1.2 ANTECEDENTES

- En el año 2007 Juan y col. realizaron un estudio titulado “**Caracterización proteica de las semillas de once especies de Amarantho**”. El objetivo de este estudio fue determinar la composición aminoacídica y perfil proteico de las semillas de once especies de amaranto. El perfil proteico se estudió mediante electroforesis en el gel desnaturizante y cromatografía de filtración. Este perfil fue similar en todas las especies. Los resultados mostraron el potencial que tienen estos cultivos silvestres. A las muestras que se estudiaron se le hicieron extracciones a partir de las semillas molidas usando hidróxido de sodio como solvente.
- En el año 2007 Acevedo y col. realizaron un estudio titulado “**Valor nutritivo del Bledo (*amaranthus spp*) identificado en el municipio Morán, Estado Lara**” en el cual se determinó el valor nutritivo mediante la composición química y mineral. Llegando a los siguientes resultados: Se identificaron tres (3) especies de amaranto como las más abundantes *amaranthus dubius*, *amaranthus espinosus* y *amaranthus gracilis*, siendo la de mayor abundancia el *amaranthus dubius*. Se determinó que los amarantos identificados poseen una concentración de proteínas de 18% aproximadamente. También se comparó la cantidad de proteína para cada tipo de amaranto según las

diferentes estructuras (tallos, hojas e inflorescencia), siendo la hoja la poseedora del mayor contenido proteico para todas las especies.

- En el año 2010 Bónoli L. llevó a cabo la evaluación del proceso de extracción de proteínas totales del follaje de amaranto, empleando NaOH 0,2% (m/v) como solvente extrayente y harina de hojas de *Amaranthus dubius*, enfocado en el efecto de determinadas variables sobre el rendimiento de extracción. Se diseñó un experimento completamente aleatorio de tres factores fijos (relación masa de harina de hoja de amaranto/volumen de solvente, carga de solvente y tiempo de agitación) con tres niveles cada uno. Para el factor relación masa de harina/volumen de solvente se establecieron los niveles de dilución 1:10, 1:12 y 1:15. Para el factor carga de solvente se usaron los niveles, una, dos y tres cargas con solvente fresco, empleando, para cada carga, el volumen correspondiente a las relaciones masa/ volumen evaluadas. Para el factor tiempo de agitación se emplearon los niveles: 1, 2 y 3 horas. El mayor rendimiento de extracción se obtuvo con la dilución 1:15, 2 horas de agitación y 3 cargas de 15 mL cada una

### **1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **1.3.1 General**

Establecer los parámetros básicos requeridos para el escalamiento del proceso de extracción de proteína total a partir de hojas de amaranto (*amaranthus dubius*) a escala piloto.

#### **1.3.2 Específicos**

- Realizar una revisión bibliográfica correspondiente a los procesos de extracción de proteína total de amaranto y métodos de escalamiento (Análisis Dimensional y Teoría de las Semejanzas).

- Evaluar los parámetros relacionados con la extracción de proteína total de la hoja de amaranto con experimentos de laboratorio (variables: tiempo de agitación, temperatura de extracción y número de lavados)
- Analizar la influencia de los parámetros estudiados con relevancia del proceso de extracción de proteína total de amaranto.
- Proponer un escalamiento a escala piloto de la fase de extracción de proteína total de amaranto usando los parámetros relevantes del proceso.



## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 EL CULTIVO DE AMARANTO**

El amaranto es una planta que pertenece a la familia de las amarantáceas; según evidencias arqueológicas se cree que es originario de Puebla, México. Se ha cultivado desde Arizona y Nuevo México en Estados Unidos, hasta Perú y Bolivia. Su nombre significa vida eterna debido a que crece en tierra poco fértil y con una mínima cantidad de agua (Amarantum, 2005).

Tiene un alto contenido de proteínas (15 al 18 %) con respecto al maíz, trigo y arroz mejorados genéticamente, el cual oscila entre 10 y 13%. Además su calidad proteica es superior comparativamente, ya que es la única proteína entre los vegetales de su tipo que contiene todos los aminoácidos esenciales (aquellos que el organismo no puede producir, por lo que se hace indispensable consumirlos en la dieta diaria), como la leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, treonina e isoleucina. Estos aminoácidos, básicos para la buena salud del organismo se encuentran en mayor proporción en la proteína del amaranto. En general, los cereales tienen una deficiencia de lisina, por lo tanto éste constituye un aminoácido limitante en muchas de las proteínas de origen vegetal. El amaranto, por el contrario, contiene el doble de lisina que la proteína del trigo, el triple que la del maíz y es equiparable en contenido a la proteína en leche de vaca, la cual se considera el estándar de excelencia nutricional. Las hojas contienen mucha fibra, vitamina A, C, así como hierro, calcio y

magnesio. El amaranto es, por lo tanto, un complemento con alta calidad nutricional y balanceado en comparación con los cereales convencionales (Amarantum, 2005).

La calidad de la proteína del amaranto y su perfil de aminoácidos esenciales permite la elaboración a gran escala de una diversa gama de productos con excelentes relación costo-beneficio debido a la simplicidad asociada a su cultivo, resistencia a plagas y crecimiento en condiciones ambientales extremas.

La planta contiene entre un 5 y 8% de grasas saludables. Destaca la presencia de escualeno, un tipo de grasa que hasta ahora se obtenía especialmente de tiburones y ballenas, la cual es usada como adyuvante (sustancia que potencia, de forma no específica, la respuesta inmunitaria frente a un antígeno) en algunos tipos de vacunas contra la gripe y el paludismo. El aceite de amaranto es de buena calidad y el contenido es superior al de maíz, cereal que se emplea comercialmente como fuente de aceite; contiene altos niveles de ácido linoleico. El aceite no tiene colesterol y las semillas prácticamente no tienen sustancias que favorecen la adsorción de nutrientes tan frecuentes en leguminosas como soja (Alimentación Sana, 2010).

Es una planta con mucho futuro, dado que aparte de su interés nutricional también se puede aprovechar en la elaboración de cosméticos, colorantes e incluso plásticos biodegradables (Amarantum, 2005).

Por su elevado nivel nutricional, desde 1979 la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (NAS, por sus siglas en inglés) y la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) determinaron al amaranto como uno de los cultivos en el mundo con un elevado potencial para su explotación económica y nutricional a gran escala, además de calificarlo como el mejor alimento de origen vegetal para consumo humano.



**Figura N°1. Plantas de Amaranto.**

En la figura N°1 se puede observar un sembradío de Amaranto donde se puede observar sus inflorescencias características.

### **2.1.1 Productos alimenticios desarrollados a partir del amaranto**

Existen diversos productos nutricionales destinados a mejorar la dieta de deportistas, personas de la tercera edad y niños, estos productos son complementos alimenticios enriquecidos con proteína proveniente del amaranto. Por otra parte, la harina de amaranto puede ser usada como sustitutivo de la harina de trigo, de manera de obtener un alimento hipoalergénico destinado a personas con intolerancia al gluten. Un ejemplo de ello son los panificados a base de harina de amaranto, los cuales cabe destacar contienen un mayor contenido nutricional. Sólo en Europa hay más de diez millones de personas con este padecimiento; dato que permite dimensionar la potencialidad de estos productos en el mercado (Alimentación Sana, 2010).

## **2.2 LAS PROTEÍNAS**

Las proteínas son macromoléculas con un elevado peso molecular que desempeñan el mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos. Por un lado, forman parte de la estructura básica de los tejidos (músculos, tendones, piel, uñas, etc.) y, al mismo tiempo, desempeñan funciones metabólicas y reguladoras (asimilación de nutrientes, transporte de oxígeno y de grasas en la sangre, inactivación de materiales tóxicos o peligrosos, etc.) También son los elementos que

definen la identidad de cada ser vivo, ya que son la base de la estructura del código genético (ADN) y de los sistemas de reconocimiento de organismos extraños en el sistema inmunológico. Las propiedades de cada una de las proteínas al igual que su funcionalidad dependen de la secuencia de aminoácidos que la componen (Muñoz, 2009).

### **2.2.1 Características**

Las proteínas son largas cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo (-COOH) y el grupo amino (-NH<sub>2</sub>). La secuencia de aminoácidos en una proteína está codificada en su gen (una porción de ADN) mediante el código genético. Se pueden considerar biopolímeros debido a que están conformadas por la repetición de unidades simples (monómeros) y éstas a su vez están conformadas esencialmente por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno y casi todas poseen azufre en su estructura. Las proteínas también pueden trabajar juntas para cumplir una función particular, a menudo asociándose para formar complejos proteicos estables (Murray, 1988).

### **2.2.2 Clasificación de las Proteínas (Alimentación Sana, 2010)**

Las proteínas se clasifican de acuerdo a diversos parámetros dentro de los cuales destaca el contenido de aminoácidos esenciales y su estructura química.

- **Contenido en aminoácidos esenciales:**
  - ✓ **Proteínas completas o de gran importancia biológica:** si contienen los aminoácidos esenciales en cantidad y proporción adecuadas. Generalmente provienen de fuentes animales.
  - ✓ **Proteínas incompletas o de bajo valor biológico:** son aquellas que presentan una relación de aminoácidos esenciales escasa. Generalmente, provienen de fuentes vegetales. Las legumbres y los frutos secos son deficitarios en metionina, mientras que los cereales son deficitarios en lisina.

- **Según su estructura química:**

- ✓ **Simples:** son aquellas que al hidrolizarse sólo forman grupos aminoácidos. Incluyen la albúmina del huevo, las globulinas del plasma sanguíneo, las prolaminas, el colágeno, etc.
- ✓ **Conjugadas:** son aquellas formadas por la unión de una fracción nitrogenada y otra fracción de naturaleza no proteica. En este grupo se encuentran las lipoproteínas (que combinan proteínas y lípidos), las glucoproteínas y mucoproteínas, las metaloproteínas (como la hemosiderina o ferritina), las fosfoproteínas y las nucleoproteínas (formadas al combinarse una proteína simple con un ácido nucleico - ADN, ARN).

### 2.2.3 Extracción de proteínas

La extracción sólido-líquido es un proceso en el que un disolvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado de manera que se produzca la disolución de uno de los componentes del sólido (Lixiviación, 2008).

La extracción con solventes se basa en la afinidad que puede tener uno o varios componentes del soluto con el solvente (Lixiviación, 2008). Existen diversos medios capaces de solubilizar proteínas, como agua, soluciones salinas, alcoholes etc. Para efectos de este Trabajo Especial de Grado se utilizará como solvente una solución salina de hidróxido de sodio capaz de solubilizar las proteínas de mayor interés para el consumo humano presentes en la hoja de la planta de amaranto.

### 2.2.4 Método de identificación de grupos proteicos (García, 2000).

**Electroforesis en Gel:** es un grupo de técnicas analíticas empleadas para separar e identificar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoeléctrico. La electroforesis se refiere a la fuerza electromotriz empleada para desplazar las moléculas a través del gel. Las moléculas se dirigen al cátodo y al ánodo a diferentes velocidades según sea su carga.

El gel es un polímero entrelazado de porosidad controlable, el cual es preparado según el tipo de muestra a estudiar, es decir, para identificar ácidos nucleicos o proteínas. Dicha porosidad es la que permite poder separar las moléculas presentes en la solución de estudio. El gel está constituido por dos secciones (apilamiento y separación). Existen diversas soluciones llamadas marcadores moleculares o estándares las cuales contienen mezclas de grupos proteicos con conocido peso molecular usadas para identificar las muestras desconocidas.

Existen técnicas más sofisticadas con herramientas más costosas que suelen usarse para análisis más complejos, como por ejemplo las técnicas de inmunodifusión radial, inmunodifusión doble o técnica de Ouchterlony, etc., pero en este caso en particular se utilizará la electroforesis en gel por su simplicidad y disponibilidad de los materiales y reactivos de trabajo.

- **Aplicaciones**

- ✓ **Ácidos Nucleicos:** en este caso se utiliza un gel de agarosa y la dirección de migración es del electrodo positivo al negativo, esto se debe a la carga negativa presente en el esqueleto azúcar-fosfato.
- ✓ **Proteínas:** en este caso se utiliza un gel de acrilamida y bis-acrilamida. Las proteínas no tienen una estructura predecible como los ácidos nucleicos, es por ello que la velocidad de migración no son similares entre ellas, incluso pueden estar en su punto isoeléctrico razón por la cual no migran, ante esta situación en particular se desnaturalizan las proteínas usando un detergente que proporciona una carga negativa neta a la molécula, es decir, dependerá del tamaño de la misma. La migración dependerá del tamaño de la molécula exclusivamente.

- **Revelado y visualización**

Una vez completado el proceso electroforético se pueden adicionar colorantes específicos de manera de hacer visibles las moléculas. En el caso de los ácidos

nucleicos se debe usar bromuro de etidio y en el caso de las proteínas se usa la tinción de plata, azul de coomassie o tinción fluorescente. Una vez finalizado el proceso de tinción se puede realizar la interpretación de los resultados por comparación con el marcador molecular usado como referencia en el gel.

### 2.2.5 Método de cuantificación de proteínas

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el espectro ultravioleta (UV), para la formación de derivados químicos o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

En la tabla N°1, se recogen los métodos más usados así como sus respectivas sensibilidades. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, las principales se recogen en la tabla N°2.

**Tabla N°1: Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad (Fernández y Galván, s.f.).**

Método	Rango de sensibilidad (µg)	Coefficiente de extinción o cálculo de la concentración
<i>Métodos de Absorción</i>		
$A_{280}$	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
$A_{205}$	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
$A_{280} - A_{260}$	100-3000	Proteína (mg/mL) = $(1,55A_{280} - 0,76A_{260})$
$A_{235} - A_{280}$	25-700	Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2,51$
$A_{224} - A_{236}$	5-180	Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{236})/0,6$
$A_{215} - A_{225}$	2-45	Proteína (µg/mL) = $144(A_{215} - A_{225})$
<b>Métodos Derivados Colorimétricos</b>		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0,06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
BCA	0,5- 10	Usar curva estándar

<i>Métodos Derivados Fluorimétricos</i>		
<i>o</i> -ftalaldehido	1-5 $\lambda$ <sub>excitación</sub> a 340 nm $\lambda$ <sub>emisión</sub> a 475 nm	Usar curva estándar

En la tabla N°2 se muestran las ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos para cuantificación de proteínas.

**Tabla N°2: Principales métodos para la cuantificación de proteínas, con sus ventajas e inconvenientes** (Fernández y Galván, s.f.)

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
<i>Métodos de Absorción</i>	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
<i>Métodos Derivados Colorimétricos</i>		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA	Es el método más sensible Es el que muestra menos interferencias	
<i>Métodos Derivados Fluorimétricos</i>		
<i>o</i> -ftalaldehido	Muy sensible	La interferencia de aminas contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual

- **Método de BCA** (Fernández y Galván, s.f.).

El ácido bicinconínic, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre



las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

En este Trabajo Especial de Grado se usará el método de BCA, debido a la disponibilidad que existe de todos los reactivos y equipos necesarios en los laboratorios; además del hecho de que el límite de detección se ajusta a las determinaciones realizadas.

### **2.3 ESCALAMIENTO (PID eng & tech, s.f).**

El escalamiento a realizar en este Trabajo Especial de Grado implica llevar un proceso de escala laboratorio a una escala piloto, se hace importante entonces entender con claridad cómo se define cada una de estas escalas. A continuación se hace una breve reseña acerca de que significan o a que se refieren los términos laboratorio y piloto.

En una escala de laboratorio se llevan a cabo aquellos procesos que implican generalmente cantidades pequeñas de materia prima y otros suministros usando equipos e instrumentación básica de laboratorio, como por ejemplo beakers, cilindros graduados, platos de agitación magnética, espectrofotómetros, etc.

A diferencia de la escala de laboratorio, el fin que se persigue al diseñar, construir y operar un proceso a escala piloto o una planta piloto es obtener información sobre un determinado proceso físico o químico, que permita determinar si el proceso es técnica y económicamente viable, así como establecer los parámetros de operación óptimos de dicho proceso para el posterior diseño y construcción de la planta a escala industrial.

### **2.3.1 Aplicaciones de las plantas piloto.**

La investigación para el estudio de nuevos procesos físico-químicos, o para la mejora de procesos ya existente se lleva a cabo en plantas a escala piloto, reduciéndose así los costes asociados a la inversión y a los gastos fijos de operación inherentes a una planta industrial. Igualmente, se utilizan plantas piloto para la investigación de bioprocesos, o procesos químicos que involucran organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. En el caso de un biorreactor se debe mantener un ambiente biológicamente activo y propicio para el organismo que se cultiva, por lo que el control de las variables de proceso es crítico. En el caso de procesos catalíticos, se emplean plantas piloto para el ensayo de nuevos catalizadores, con el objeto de estudiar su actividad y selectividad para una determinada reacción química y de optimizar las variables de proceso.

Por último, también se utilizan plantas piloto como equipamiento científico para educación en Universidades, o como sistemas para demostración.

El término “Planta Piloto” abarca un amplio rango de escalas, desde plantas inclusive a escala laboratorio hasta plantas a escala semi-industrial. Los avances tecnológicos en distintas áreas (electrónica, comunicaciones, micromecanizado, etc.) han hecho posible que hoy día se disponga de instrumentación y dispositivos adecuados para el diseño y construcción de plantas a escala muy reducida, plantas a microescala, capaces de operar en idénticas condiciones de presión y temperatura que las plantas industriales. Estos avances ha conducido igualmente a que estas plantas a microescala cuenten con sistemas de adquisición de datos, supervisión y control (sistemas SCADA) y puedan ser automatizadas, de manera que la producción experimental se multiplique y se reduzca, así, considerablemente el tiempo necesario para el estudio y la optimización de un proceso físico-químico concreto.

Una planta piloto debe ser mucho más flexible que una planta a escala industrial en cuanto al rango permisible de sus parámetros de operación o variables de proceso, ya que una planta industrial opera siempre en las mismas condiciones, mientras que una

planta piloto, por el hecho de estar destinada a la investigación o estudio de un proceso, debe permitir trabajar en un amplio rango de valores de temperatura, presión, etc., de manera que puedan realizarse experimentos o ensayos con valores bien distintos de las variables de proceso y poder determinar, así, los valores óptimos.

Aunque, en los últimos años se han desarrollado diversas herramientas para simulación de procesos por ordenador, estos sistemas no pueden sustituir a las plantas piloto, ya que no son capaces de predecir el comportamiento de nuevos procesos, de los que no existen datos disponibles, ni de procesos complejos.

Las plantas piloto reducen el riesgo asociado con la construcción de plantas de gran escala, siempre y cuando hayan sido diseñadas y operadas correctamente.

### **2.3.2 Análisis Dimensional** (Calleja, 1999).

Cuando en un fenómeno fisicoquímico se conocen todas las variables que intervienen pero se desconoce la relación exacta que existe entre ellas, debido a la dificultad de integración de las ecuaciones diferenciales u otras causas, el análisis dimensional puede ser un instrumento adecuado para facilitar el establecimiento de una relación empírica entre dichas variables, resultando de gran utilidad tanto para la planificación de experimentos como para la interpretación de los resultados obtenidos en los mismos.

El método de análisis dimensional opera agrupando las variables que intervienen en el fenómeno en un conjunto de combinaciones sin dimensiones físicas denominadas módulos o “números adimensionales”. De este modo la ecuación empírica que relacione las variables entre sí podrá expresarse en función de dichos módulos, en lugar de hacerlo en función de cada variable por separado.

El análisis dimensional se fundamenta en los siguientes principios:

- Todas y cada una de las magnitudes físicas pueden expresarse como un producto de potencias de un reducido número de magnitudes fundamentales.

- Las ecuaciones que representan fenómenos fisicoquímicos han de ser dimensionalmente homogéneas. Es decir, todos los términos aditivos de sus miembros han de tener las mismas dimensiones en el sistema de magnitudes elegido.
- Cualquier relación general entre magnitudes físicas puede expresarse en función de un conjunto de números adimensionales que contengan las variables que intervengan en el fenómeno y las constantes dimensionales del sistema de magnitud utilizado.

Para obtener los módulos adimensionales que caracterizan un fenómeno físico-químico se emplean tres métodos, dos de los cuales son algebraicos: los de Rayleigh y de Buckingham, y uno que no lo es: el método de las ecuaciones diferenciales. Para efectos de este Trabajo Especial de Grado se usará únicamente el primero de ellos, por mayor sencillez y amplia utilización.

El método de Rayleigh fue propuesto en 1899, constituye un procedimiento simple y directo de agrupar las variables en números adimensionales.

### **2.3.3 Cambio de escala en procesos químicos (Calleja, 1999).**

En los estudios de investigación y desarrollo de los procesos químicos uno de los problemas que tiene más atención y es complejo es la extensión y aplicación de los resultados de laboratorio a escala industrial y comercial, es decir, el denominado cambio de escala.

La operación de cambio de escala requiere pasar de manejar cantidades que oscilan entre los gramos y kilogramos, a hacerlo con cantidades que frecuentemente se extienden desde las toneladas hasta los miles de toneladas; Su objetivo es reproducir en escala superior los resultados alcanzados en el laboratorio. En términos prácticos, se trata de obtener al menos las mismas conversiones, selectividades y rendimientos cumpliendo con las especificaciones exigidas. En este Trabajo Especial de Grado el escalamiento se realizará desde la escala de laboratorio hasta la escala piloto.

Pasar de la escala de laboratorio a escala piloto no es tarea sencilla, es necesario realizar una serie de experimentos complementarios que permitan obtener toda la información necesaria en el mínimo tiempo y costo posible.

#### **2.3.4 Consideraciones del cambio de escala** (Calleja, 1999).

Cuando se hace el cambio de escala hay que tener en cuenta que los sistemas de transformación de materia son sistemas complejos, en el sentido de que están formados por un gran número de elementos que se encuentran conectados por numerosas variables, y que tienen que satisfacer, además de las leyes de equilibrio y de cinética química, los balances de materia, cantidad de movimiento y energía para cada una de las fases presentes.

Todos los procesos químicos implican, además de la conversión química, diversos fenómenos que no actúan de modo independiente sino acoplados de forma simultánea. Entre estos se encuentran: los equilibrios termodinámicos físicos y químicos, las reacciones químicas paralelas, la transmisión de calor, la transferencia de materia y la circulación de fluidos.

Cuando uno de los fenómenos que determina la velocidad con que transcurre el proceso global es mucho más lento que los demás, se denomina etapa controlante y las ecuaciones que han de considerarse en el diseño resultan simplificadas en cada caso particular dependiendo de cuál sea el fenómeno más lento.

#### **2.3.5 Teoría de la Semejanza** (Calleja, 1999).

Se ocupa únicamente de la forma de los sistemas fisicoquímicos, prescindiendo del resto de sus características (tamaño y composición), entendiendo por forma no sólo la que se refiere a la geometría de los equipos sino a los perfiles de las propiedades intensivas en el interior de los mismos: perfiles de velocidad, fuerza o presión, temperatura y concentraciones. En la teoría de las semejanzas, se parte del

conocimiento previo de los módulos adimensionales que caracterizan los principales mecanismos que controlan el proceso.

Para poder determinar las condiciones que han de cumplirse para cada uno de los tipos de semejanza es necesario establecer previamente la existencia en maqueta (escala de partida) y prototipo (escala de llegada) de los denominados puntos correspondientes, aquellos que mantienen una relación constante entre sus coordenadas de posición (x, y, z) en ambas escalas, de modo que se cumple la siguiente relación:

$$x'/x = y'/y = z'/z = K_G \quad \text{Ecuacion 2.1}$$

Donde  $K_G$  se conoce como *factor de escala geométrico* (x, y, z) son las coordenadas de posición de la maqueta o modelo y (x', y', z') las coordenadas de posición en el prototipo

Se pueden establecer distintos tipos de semejanzas en orden creciente de complejidad:

- Semejanza geométrica: existe semejanza geométrica cuando todos los puntos del modelo tienen un punto correspondiente en el prototipo y viceversa. Es decir, todas las dimensiones lineales del sistema aumentan o disminuyen en una misma proporción, denominada, como ya se ha indicado, factor de escala geométrico,  $K_G$ .
- Semejanza mecánica (dinámica y cinemática): dos sistemas son dinámicamente semejantes cuando, además de existir semejanza geométrica entre ambos, también existe semejanza de los perfiles de fuerza. Por su parte, la semejanza cinemática (semejanza de los perfiles de velocidad), se encuentra ligada a la semejanza dinámica debido a que los elementos de fluidos situados en puntos correspondientes recorrerán trayectorias semejantes con velocidades proporcionales siempre que los sistemas sean dinámicamente semejantes.

- Semejanza térmica: la existencia de semejanza térmica supone la igualdad de forma de los perfiles de temperatura en ambas escalas. Para ello, es condición previa la existencia no sólo de semejanza geométrica, sino también de semejanza cinemática, como consecuencia de la directa intervención del movimiento fluido (convección) en la velocidad con que se produce la transmisión de calor lo que determina el perfil térmico.
- Semejanza de concentraciones: La semejanza de concentraciones aparece cuando son semejantes los perfiles de concentraciones en maqueta y prototipo. Precisa de la existencia previa de semejanza geométrica y cinemática y, análogamente al caso anterior, la condición de semejanza se traduce en la necesaria igualdad en maqueta y prototipo de todos los módulos adimensionales que relacionan velocidades de transporte de materia del componente de interés por diferentes mecanismos y, en su caso, de su velocidad de generación por reacción química.
- Semejanza química: La velocidad con que transcurren los procesos químicos viene determinada por la temperatura y la concentración de los reaccionantes que intervienen en la misma. Por ello, la condición de semejanza química precisa de la existencia de semejanza térmica y de semejanza de concentraciones, requiriendo la igualdad de maqueta y prototipo de todos los módulos adimensionales correspondientes a las mismas que intervengan en cada caso concreto.

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO

A continuación en la Figura N°2 se presenta un esquema que permite un mejor entendimiento del proceso general usado para poder realizar el escalamiento del proceso de extracción.

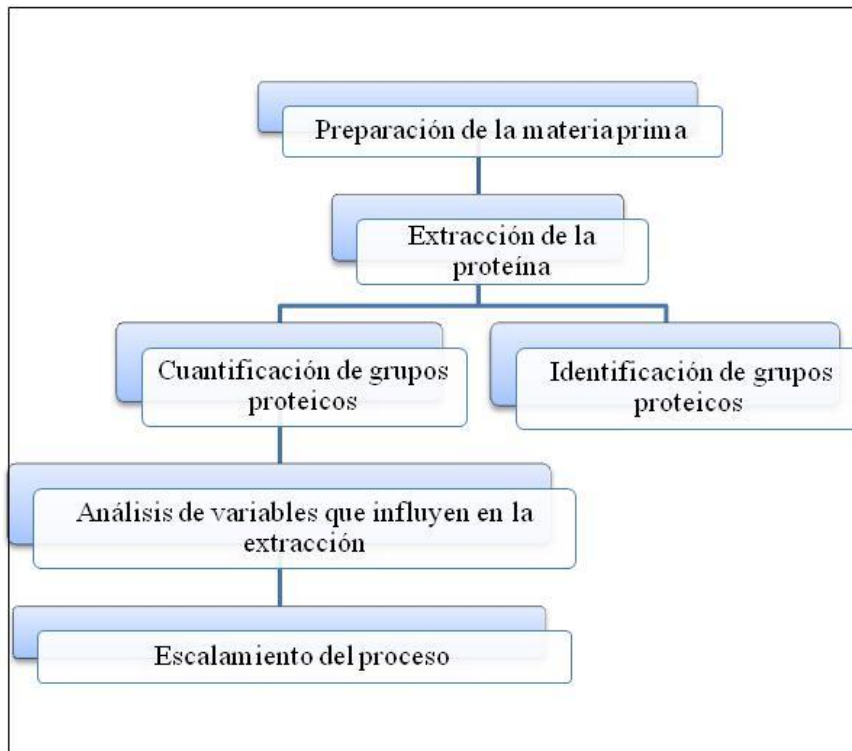


Figura N°2: Esquema general del proceso.



### 3.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se hizo una revisión bibliográfica que contempló los tópicos relacionados con el tema a tratar, con el objetivo de obtener los conocimientos básicos necesarios para el entendimiento del proceso. Inicialmente se presentó lo referente a la materia prima, es decir, propiedades y características más resaltantes del amaranto, luego se explicó lo concerniente a proteínas y se dio una explicación amplia de los procedimientos utilizados para poder detectarlas y cuantificarlas. Por último, se desarrolló lo relativo al escalamiento del proceso de extracción de la proteína.

### 3.3 PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA (Vasco M. Nora L. y col, 1999)

- Se obtuvieron las plantas de *amaranthus dubius* después de 4 meses de haber sido cultivadas, para garantizar que estuvieran lo suficientemente maduras para su procesamiento.
- Una vez en el laboratorio se procedió a la selección de únicamente las hojas de la planta (sin distinción de tamaño o forma) para posteriormente realizar la limpieza con agua, con el propósito de retirar los posibles restos de tierra y suciedad presentes, teniendo cuidado de no romperlas.
- Después de ser lavadas, se secaron en una estufa a una temperatura de 60° C por 24 horas aproximadamente para garantizar que la cantidad de humedad presente en ellas fuera la más baja posible.
- Luego de estas 24 horas las hojas fueron molidas con un molino casero marca MAXI-MATIC® modelo TS-630.
- Para garantizar que el tamaño de las partículas fuera uniforme se procedió a llevar las hojas molidas a un tamizador Cole Parmer, modelo RX-812, empleando tamices Cole Parmer. El tamaño usado para la extracción fue de 70 Mesh que son aproximadamente 0,0083 pulgadas o 212  $\mu\text{m}$
- La harina se almacenó en bolsas plásticas herméticas a una temperatura de 4°C (nevera) para evitar la desnaturalización de la proteína.

### 3.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN (R. Juan y col, 2007).

La evaluación de los parámetros que influyen en el rendimiento de la extracción de proteínas es de gran importancia antes de realizar el proceso de escalamiento del mismo. Dicha evaluación se hizo haciendo cambios en parámetros como el tiempo de agitación, temperatura de extracción y número de lavados.

El proceso de extracción de proteínas totales del amaranto que se llevó a cabo a nivel de laboratorio consistió de los siguientes pasos:

- En primer lugar se pesó 0,8 gramos de harina de hoja de amaranto (70 Mesh) y se agregó el solvente manteniendo una relación peso/volumen (p/v) de 1:12; el solvente utilizado durante el proceso de extracción fue NaOH con una concentración de 0,2% p/v, preparado a partir de hojuelas puras. Ambos componentes fueron mezclados en un beaker con una plancha de agitación magnética. Cabe destacar que las extracciones se hicieron por triplicado. Se variaron tres parámetros: tiempo (15, 30 y 60 minutos), temperatura (8, 25 y 40 °C) y el número de lavados (1, 2 y 3)
- Luego de la agitación se procedió a la separación de fases a través de la centrifugación de las muestras. La centrifugación se hizo en un equipo de marca Beckman, modelo J2-21M, por un tiempo de 15 minutos a 12000 rpm a una temperatura de 4°C.
- Una vez concluida la etapa de centrifugación se obtuvieron dos productos en fases bien definidas, la primera de ellas fue el sobrenadante, y la segunda fase llamada pellet, quedó en el fondo del recipiente. El sobrenadante se trasvasó a un recipiente mientras que el pellet se retiró usando una espátula. Ambas fases fueron dispuestas por separado en dos recipientes herméticos a una temperatura de 4°C para su posterior estudio.
- El pellet obtenido durante la primera centrifugación fue remezclado y agitado con el solvente (NaOH 0,2% p/v) en la misma proporción usada inicialmente (1:12 p/v) y se repitieron los primeros tres pasos.

- Los productos obtenidos del paso anterior (sobrenadante y pellet) corresponden al segundo lavado. El número de lavados es una variable que también se sometió a estudio para verificar su influencia sobre la extracción de las proteínas. Se planteó realizar 3 lavados, para verificar mediante métodos cuantitativos y cualitativos la cantidad y la presencia de proteínas en las muestras.
- Una vez terminado el proceso de extracción las proteínas se concentraron en el sobrenadante.



**Figura N°3: Muestra luego de la centrifugación.**

En la Figura N°3 se puede apreciar la diferencia entre el sobrenadante y el pellet o residuo formado luego de la centrifugación de una muestra.

### **3.5 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS PROTEICOS**

En esta sección se va a describir cuáles son los métodos que fueron empleados para identificar los grupos proteicos y para determinar la concentración de proteína (cuantificación) en las muestras a estudiar.

#### **3.5.1 Identificación de grupos proteicos**

El método cualitativo que se empleó para verificar la presencia de las proteínas presentes en la muestra analizada se conoce como electroforesis en gel de poliacrilamida. Éste método permitió determinar si las proteínas presentes en las

muestras pertenecen al grupo de “proteínas esenciales para el correcto funcionamiento del organismo” (albúminas y globulinas).

En la electroforesis se utilizaron todos los componentes pertenecientes al Kit desarrollado por Bio-Rad Laboratories, el cual consiste de lo siguiente:

- a) Una cámara de electroforesis con dos electrodos.
- b) Dos placas de vidrios de 0,75 y 1,5 mm de espesor respectivamente.
- c) Un peine de 10 espacios con 0,75 mm de espesor.
- d) Un sujetador de placas de vidrio.
- e) Un soporte utilizado para colocar el sujetador de placas de vidrio durante la polimerización del gel.
- f) Una fuente de poder de hasta 300 voltios.

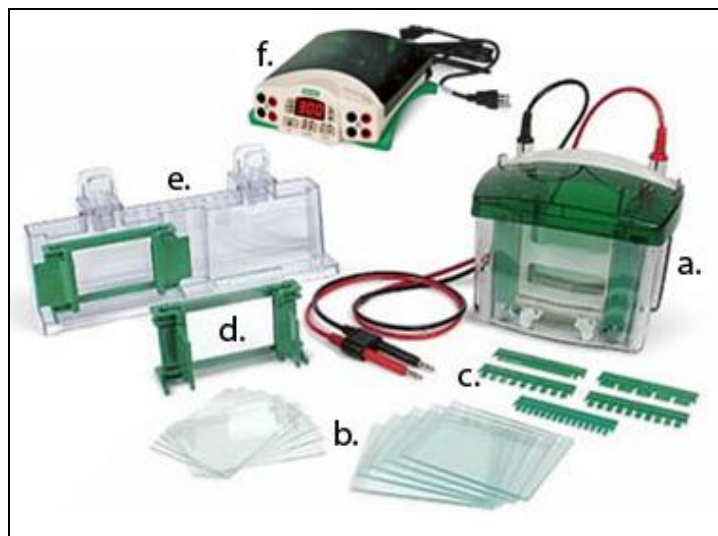


Figura N°4: Kit de Bio-Rad Laboratories para la electroforesis en gel (Bio-Rad, 2010)

En la Figura N°4, se puede observar todos los elementos antes enumerados que forman parte del Kit Bio-Rad para tener una idea del equipo que se manipuló durante la realización de la electroforesis de proteínas.

El método de electroforesis se puede dividir en cuatro partes:

### Parte 1: Montaje del sistema de polimerización de ambos geles, preparación del gel de separación y del gel de apilamiento (Stacking)

En primer lugar se hizo el montaje del molde antes de la preparación de la solución colocando los dos vidrios en el sujetador de manera de formar la cavidad necesaria para darle la forma al gel, posteriormente se colocó el sujetador en el soporte de sujetador de placas de vidrio como se muestra en la figura N° 5:

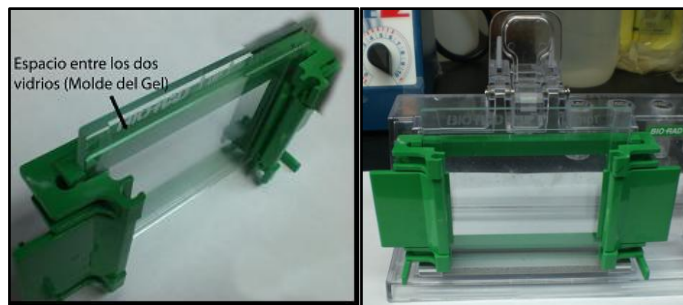


Figura N°5: Pasos para el montaje del molde del gel.

En la figura N°5 se muestra el molde donde se vierte el gel de separación y de apilamiento. El espacio formado entre las dos placas de vidrio (molde del gel) fue llenado en primer lugar con el gel de separación, dejando dos centímetros de espacio para que luego de la polimerización del mismo fuera agregada la sección de apilamiento. El gel de apilamiento posee una densidad menor que la del gel de separación, esto con la finalidad de que todas las proteínas, sin importar su peso molecular, se nivelen y lleguen a la sección de separación en el mismo instante de manera que no exista diferencia entre el tiempo de corrida de cada muestra.

Una vez montado el sujetador de vidrios (molde) en el soporte se procedió a la preparación del gel de separación, el cual se realizó de la siguiente manera tomando como base la preparación de un solo gel (unos 5 mL de preparación total):

- ✓ En un “Falcon” (Recipiente cónico de poliestireno similar a un tubo de ensayo) de 15 mL se vertieron 2,05 mL de agua des-ionizada (milli-Q).
- ✓ Se añadió 1,65 mL de Monómero de Acrilamida al 30 % (Ver Anexo A).

- ✓ Seguidamente se agregó 1,25 mL del buffer de separación TRIS-HCl 1,5M a pH 8,8 (Ver Anexo A).
- ✓ Se añadió 0,05 mL SDS (dodecil sulfato sódico) al 10 % (Ver Anexo A).
- ✓ Finalmente se le añadió 25 y 5  $\mu$ L de APS (persulfato de amonio) al 10 % y de TEMED (Tetrametilendiamina) respectivamente (Ver Anexo A).
- ✓ Se agitó la mezcla cuidadosamente y se vertió en el molde del gel, se debe recordar dejar el espacio requerido para el gel de apilamiento (aproximadamente dos centímetros).
- ✓ Se dejó polimerizar el gel por una hora aproximadamente.

El procedimiento que se usó para realizar el gel de apilamiento es muy similar al del gel de separación, pero en vez de ser usado el TRIS-HCl 1,5M a pH 8,8 se usó TRIS-HCl 1M a pH 6,8. De este gel cabe destacar que el tiempo de polimerización es mucho menor al del gel de separación, por lo que debe colocarse rápidamente en el molde. Una vez en el molde se le colocó el peine de 10 espacios, el cual al ser retirado luego de la polimerización dejó formado los pocillos requeridos para añadir las muestras.

Cabe destacar que el gel fue trabajado siempre dentro de las dos placas de vidrio, es decir, sólo se retiró de las mismas para el proceso de revelado una vez realizada la corrida electroforética.

## **Parte 2: Preparación de las muestras**

En esta sección se explica lo que fue la preparación de las muestras problemas usadas en el estudio de electroforesis. Se debe recordar que existen diez pocillos disponibles para dicho estudio, sin embargo en uno de ellos se colocó el marcador molecular de manera de poder comparar las muestras desconocidas con un estándar. El estándar no es más que una muestra que contiene proteínas conocidas y que se distribuyen según su peso molecular a lo largo del gel. El conjunto de pasos a implementar se explican a continuación:

- ✓ Se mezcló en un recipiente hermético de 500µL una cantidad de 8 µL de muestra con 8 µL del buffer de carga (Ver Anexo A), de la misma manera se preparó el marcador molecular (Amersham RPN 755).

### Parte 3: Montaje de la celda de electroforesis

El proceso de montaje de la celda de electroforesis se realizó de la siguiente forma:

- ✓ Se adosó el gel (aún dentro de las placas de vidrio) a la cámara de electroforesis.
- ✓ Se llenó la cámara de electroforesis con buffer de corrida (solución electrolítica) ya preparado previamente (Ver Anexo A).
- ✓ Se vertió mediante el uso de una micropipeta el marcador molecular en el primer pocillo del gel.
- ✓ Se vertió de la misma manera las muestras en los pocillos restantes de manera ordenada.
- ✓ Se conectaron los electrodos para comenzar el proceso de la electroforesis a un voltaje inicial de 60V con el objetivo de permitir el apilamiento de la muestra por 15 o 20 minutos.
- ✓ Una vez apilada la muestra sobre el gel de separación se aumentó el voltaje de la cámara hasta unos 120V y se esperó a que recorriera todo el gel de separación. El buffer de carga posee una coloración azul oscuro, la cual permitió verificar el avance de las muestras a través del gel.
- ✓ La corrida duró aproximadamente 70 minutos para cada gel que se realizó.

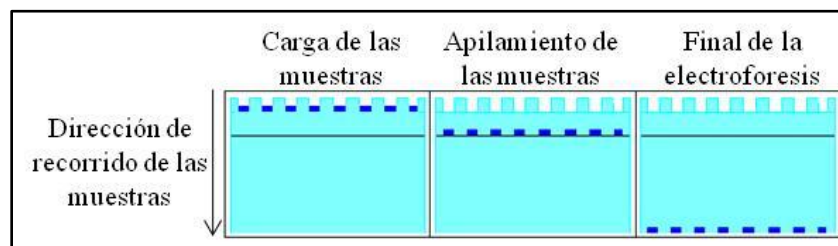


Figura N°6: Representación gráfica del recorrido de las muestras a través del gel durante la electroforesis.

En la figura N°6 se puede observar la representación gráfica del recorrido de las muestras a través del gel durante la electroforesis, además de apreciar el distintivo color azul del buffer de carga, el cual permite ver la ubicación de las muestras en tiempo real.

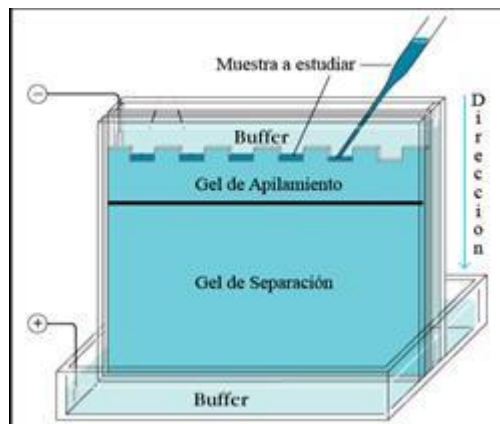


Figura N°7: Representación gráfica del montaje de la celda de electroforesis. (Karp, 1998).

En la figura N°7 se muestra una representación gráfica de las características principales del montaje de la celda de electroforesis.

#### Parte 4: Revelado del gel

Después de finalizada la corrida del gel en la cámara de electroforesis se procedió a desmontarlo teniendo mucho cuidado de no romperlo al separar las placas de vidrio. Una vez desmontado el sistema, se reveló el gel usando el kit de tinción de plata de Bio-rad. A continuación se presenta una lista de las soluciones usadas durante el proceso de revelado con plata. Cabe destacar que el proceso de revelado aplicado en este Trabajo Especial de Grado procede de un protocolo ya establecido por Bio-Rad:

- Una solución con una concentración (v/v) de 40% metanol, 10% ácido acético, la cual se llama “Fixative 1”. Se preparó 1000 mL de esta solución, los cuales fueron suficientes para revelar la cantidad de geles realizados.



- Una solución con una concentración (v/v) de 10% de etanol y 5% de ácido acético, la cual se llama “Fixative 2”.
- Solución “Oxidizer”. Esta solución forma parte del kit Bio-Rad.
- Solución “Silver Reagent”. Esta solución forma parte del kit Bio-Rad.
- Solución “Developer”. Esta solución forma parte del kit Bio-Rad.
- Solución “Stop”. Esta solución tiene una concentración de 5% (v/v) de ácido acético.

Una vez establecidas las soluciones a usar sólo queda la descripción del proceso a seguir para realizar la tinción con plata:

- El gel se sumergió en la solución “Fixative 1” por un tiempo de 30 minutos.
- Posteriormente se retiró totalmente la solución “Fixative 1”, sumergiendo seguidamente el gel en la solución “Fixative 2” por un tiempo de 15 minutos.
- Una vez cumplidos los 15 minutos se repitió el paso anterior una vez más.
- Al culminar los 15 minutos del paso anterior se procedió a retirar la solución “Fixative 2” y se sumergió el gel en la solución Oxidizer, la cual tiñe de color amarillo al gel en cuestión. Se expone el gel a esta solución durante un tiempo de 5 minutos.
- Una vez culminado el tiempo de exposición al Oxidizer se procedió a realizar una serie de lavados con agua des-ionizada sumergiendo el gel durante 5 minutos. Se repitieron los lavados hasta que se retiró el color amarillo del gel.
- Una vez finalizados los lavados con agua des-ionizada se colocó el gel en la solución Developer, en un principio durante un tiempo de 30 segundos. Finalizados los 30 segundos se retiró el Developer y se repitió el paso con la misma solución hasta comenzar a observar las bandas características que denotan la presencia de proteína en las muestras estudiadas. Una vez reveladas estas bandas se detuvo la acción del Developer usando la solución “Stop” durante un tiempo de 5 minutos.

- Finalmente se dejó el gel sumergido en agua des-ionizada por el tiempo necesario para el estudio del mismo.



**Figura N°8: Gel revelado con la tinción de plata.**

En la figura N°8 se puede observar un ejemplo de un gel revelado con el método de la tinción con plata, donde se puede apreciar la coloración característica de las bandas formadas durante la electroforesis.

### **3.5.2 Cuantificación de grupos proteicos**

Para cuantificar la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras obtenidas en la extracción se usó el método BCA (ácido bicinonónico) de las microplacas desarrollada por Thermo Scientific, la cual consistió de los siguientes pasos:

- Se prepararon 8 diluciones de una proteína estándar que fue representativa de la solución de proteína a ensayar de manera de tener un rango entre 25 y 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Se utilizó BSA (albúmina bovina) como estándar.
- Se vertieron 25  $\mu\text{L}$  de cada estándar y de cada solución muestra en una microplaca de muestra limpia y seca. Las soluciones con proteínas fueron colocadas por triplicado.
- Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución previamente preparada con el Kit Thermo Scientific (Ver Anexo A) a cada recipiente de la micro-placa.
- Se incubaron las muestras a 37 °C por 5 minutos.

- La microplaca con las muestras ya listas fueron colocadas en un espectrofotómetro, el cual leyó las mismas a una longitud de onda de 562 nm.
- Un programa de computadora integrado con el espectrofotómetro reportó los valores de absorbancia obtenidos a través de una curva de calibración construida con los estándares y determinó la concentración de las muestras problemas, empleando la ley de Lambert-Beer donde está planteada una relación directa entre la concentración y la absorbancia obtenida en cada medida.



**Figura N°9: Microplaca usada para el método de BCA**

En la figura N°9 se puede observar el tipo de microplaca usada en el ensayo de cuantificación de proteínas de BCA, la cual posee una capacidad suficiente para estudiar 96 muestras.

### **3.6 ESCALAMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN (Calleja, 1999).**

Como ya se mencionó en el capítulo II el procedimiento que se usó para el escalamiento de la Etapa de Extracción de la Proteína procede del método de Análisis Dimensional y de la Teoría de la Semejanza. A continuación se mostrará primeramente el proceso a seguir para realizar el análisis dimensional y posteriormente se presentará lo que corresponde al análisis de las variables que influyen en el cambio de escala:

### 3.6.1 Análisis Dimensional

- Se expresa una de las variables,  $Y$ , generalmente la de mayor interés, como una función potencial de las restantes variables,  $X_i$ , y de las constantes dimensionales del sistema de magnitudes elegido, que estarán elevadas a exponentes a determinar,  $a_i$ .

$$Y = C * X_1^{a_1} * X_2^{a_2} * X_3^{a_3} \dots X_n^{a_n} \quad \text{Ecuacion 3.1}$$

Donde  $C$  es un factor adimensional, habitualmente relacionado con la geometría del sistema.

- Las variables y constantes dimensionalmente son sustituidas en función potencial por sus ecuaciones de dimensiones, en un mismo sistema de magnitudes.
- Se plantea una ecuación de condición de homogeneidad para cada una de las magnitudes fundamentales, estableciendo que en éstas ha de cumplirse que en el exponente al que está elevada cada una de las magnitudes fundamentales en el primer miembro de la ecuación ha de ser igual a la suma de los exponentes a los que se encuentra elevada esa misma magnitud en los términos que constituyen el producto en el segundo miembro.
- Siendo  $n$  el número de variables a considerar, el número de incógnitas (exponentes a determinar) será  $n-1$ , por lo que si el sistema elegido tiene  $p$  magnitudes fundamentales y por lo tanto  $p$  ecuaciones de condición, el sistema normalmente estará indeterminado, ya que  $(n-p-1) > 0$ . Dicha circunstancia hace que sea necesario fijar  $(n-p-1)$  incógnitas para que el sistema pueda ser resuelto y calcular de ese modo las  $p$  incógnitas (exponentes) restantes, expresadas en función de las fijadas previamente. Cuando dos o más ecuaciones de condición,  $c$ , resulten equivalentes, únicamente una de ellas establece una condición independiente, por lo que el

número de ecuaciones útiles se reduce a  $p' = p - c + 1$  y habría de fijarse un número mayor de incógnitas ( $n - p' - 1$ ) para obtener las  $p'$  restantes.

- Los exponentes así calculados juntos con los elegidos previamente se sustituyen en la función inicial, agrupándose las variables elevadas a los mismos exponentes. De este modo se obtiene un módulo adimensional  $\pi_1$  elevado a exponente unidad, que suele mantenerse en el primer miembro, mientras que en el segundo miembro aparecen ( $n - p - 1$ ) o ( $n - p' - 1$ ) grupos adimensionales  $\pi_1$  elevados a los exponentes fijados previamente, constituyéndose en las nuevas variables independientes del sistema.

Finalmente, se obtiene una relación de la forma  $\pi_1 = \phi(\pi_2, \pi_3, \dots)$ , la cual contiene algunos módulos que representan razones con un solo término en el numerador y otro en el denominador, dichos módulos se denominan *factores de forma* y suelen representarse por  $w_1, w_2$ , etc. Así, es frecuente expresar la ecuación anterior como  $\pi_1 = \phi(\pi_2, \pi_3, w_1, w_2, \dots)$ .

### 3.6.2 Teoría de la Semejanza

Una vez establecidos los módulos adimensionales se prosigue a aplicar la teoría de la semejanza. En primera instancia se verifica si el sistema estudiado cumple con:

- Semejanza geométrica
- Semejanza mecánica (dinámica y cinemática)
- Semejanza térmica
- Semejanza de concentraciones
- Semejanza química

A continuación se hace una lista de equipos y reactivos que se usaron durante la realización del trabajo experimental así como de los equipos necesarios.

### 3.7 LISTA DE REACTIVOS

- NaOH al 0,2% p/v (Solvente de la extracción)
- Monómero de Acrilamida al 30%
- Buffer de separación TRIS-HCl 1,5M a pH 8,8
- SDS (dodecil sulfato sódico) al 10 %
- APS (persulfato de Amonio) al 10%
- TEMED (Tetrametilendiamina)
- TRIS-HCl 1M a pH 6,8
- Solución “Fixative 1” con una concentración (v/v) de 40% metanol, 10% ácido acético.
- Solución “Fixative 2” con una concentración (v/v) de 10% metanol, 5% ácido acético.
- Solución “Oxidizer”
- Solución “Silver Reagent”
- Solución “Developer”
- Solución “Stop” con una concentración de 5% (v/v) de ácido acético.
- BSA (albúmina bovina). Concentraciones entre 1,2 y 10  $\mu\text{g/mL}$
- Buffer de corrida
- Agua des-ionizada.

### 3.8 LISTA DE EQUIPOS

- Hojas de amaranto
- Hielo
- Beakers de 250 mL
- Balones aforados de 250 mL a 500 mL
- Picetas
- Espátulas de acero inoxidable
- Micropipetas

- Pastillas de agitación
- Falcons de 15 mL y 50 mL
- Bolsas plásticas herméticas
- Tijeras
- Etiquetas
- Kit Bio-Rad de electroforesis
- Kit Thermo Scientific para estudio BCA
- Estufa
- Balanza digital
- Refrigeradores estándar
- Espectrofotómetro
- Molino de café casero
- Tamices
- Agitador magnético
- Centrifugadoras
- Tapabocas
- Guantes

## CAPÍTULO IV

### DISCUSION DE RESULTADOS

Las tres variables estudiadas durante el proceso de extracción de proteína total a partir de la hoja de la planta de amaranto (*amaranthus dubius*), entendiéndose el tiempo de agitación, temperatura y número de lavados con solvente fresco ha permitido conocer la influencia de dichos parámetros en la obtención de este valioso producto, básico y necesario para una completa alimentación.

#### 4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LABORATORIO

Como se sabe para determinar la calidad de la proteína se hizo un estudio de electroforesis en gel de acrilamida, a través del cual se obtuvieron dos geles.

A continuación se presentan los geles contenedores de las muestras donde se estudiaron todos los primeros lavados y las muestras con condiciones críticas para la desnaturalización de proteínas:

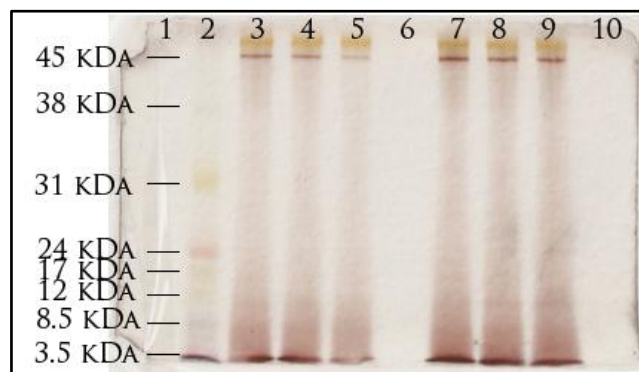


Figura N°10: Gel 1. Estudio electroforético.



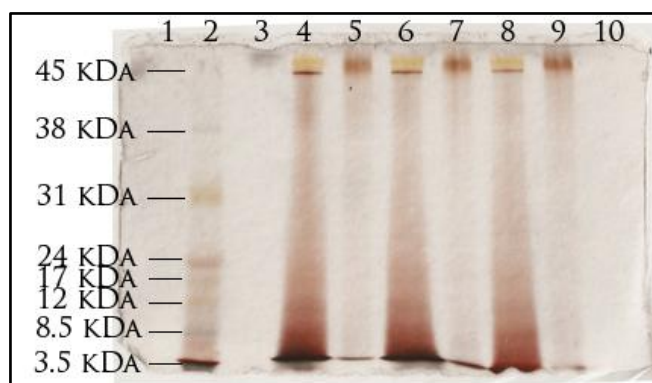


Figura N°11: Gel 2. Estudio electroforético.

A continuación se presenta el contenido de cada pozo de cada gel con el propósito de lograr un mejor entendimiento en el análisis de los resultados (Figuras N°10 y 11).

Tabla N°3: Contenido de cada pozo en los geles estudiados

Gel	Pozo	Muestra
1	1	Sólo Buffer Muestra
	2	Marcador Molecular
	3	8°C, 60 minutos, 1er Lavado
	4	8°C, 30 minutos, 1er Lavado
	5	8°C, 15 minutos, 1er Lavado
	6	Sólo Buffer Muestra
	7	25°C, 60 minutos, 1er Lavado
	8	25°C, 30 minutos, 1er Lavado
	9	25°C, 15 minutos, 1er Lavado
	10	Sólo Buffer Muestra
2	1	Sólo Buffer Muestra
	2	Marcador Molecular
	3	Sólo Buffer Muestra
	4	40°C, 60 minutos, 1er Lavado
	5	40°C, 60 minutos, 3er Lavado
	6	40°C, 60 minutos, 1er Lavado
	7	40°C, 60 minutos, 3er Lavado
	8	40°C, 60 minutos, 1er Lavado
	9	40°C, 60 minutos, 3er Lavado
	10	Sólo Buffer Muestra

En las Figuras N°10 y N°11 se pueden observar las muestras estudiadas a través de la electroforesis en gel de acrilamida y reveladas con la tinción de plata, donde se aprecia la coloración característica de este método, además de observar las bandas coloreadas en el pozo número 2 características del marcador molecular. Ambos geles fueron preparados al 12% de acrilamida y en cada pozo se agregaron 8µL de muestra y 8µL buffer muestra.

Se sabe que la albumina y la globulina poseen un peso molecular aproximado de 45 y 35 kDa respectivamente, como se puede observar en ambos geles ambas bandas se observan en todas las muestras, además se observarse otras proteínas de bajo peso molecular en la parte inferior de los geles. En el gel número dos se aprecia que los terceros lavados muestran una coloración muy tenue lo que indica que el contenido proteínico en este lavado es escaso. También se puede observar como las muestras procesadas a 40°C tienen una coloración más intensa que el resto.

Con este estudio se obtuvo un rango similar y amplio de proteínas en todas las condiciones de extracción lo que sugiere que a 40 grados no hubo desnaturalización de la proteína. De esa manera se corroboró que la condición óptima no afecta la calidad proteínica del extracto.

Luego del proceso extracción de proteína y una vez concluido el estudio de cuantificación se obtuvieron los siguientes valores de concentración.

**Tabla N°4: Valores de concentración en función a las diferentes condiciones de operación estudiadas.**

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Lavado	Promedio de Concentración µg/mL
8,0 ±0,1	60	1	752,725 ±0,001
8,0 ±0,1	60	2	283,396 ±0,001
8,0 ±0,1	60	3	162,958 ±0,001
8,0 ±0,1	30	1	752,379 ±0,001
8,0 ±0,1	30	2	313,764 ±0,001

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Lavado	Promedio de Concentración µg/mL
8,0 ±0,1	30	3	74,441 ±0,001
8,0 ±0,1	15	1	710,450 ±0,001
8,0 ±0,1	15	2	303,239 ±0,001
8,0 ±0,1	15	3	111,021 ±0,001
25,0 ±0,1	60	1	769,449 ±0,001
25,0 ±0,1	60	2	323,123 ±0,001
25,0 ±0,1	60	3	137,988 ±0,001
25,0 ±0,1	30	1	739,468 ±0,001
25,0 ±0,1	30	2	272,478 ±0,001
25,0 ±0,1	30	3	98,352 ±0,001
25,0 ±0,1	15	1	732,862 ±0,001
25,0 ±0,1	15	2	353,104 ±0,001
25,0 ±0,1	15	3	128,333 ±0,001
40,0 ±0,1	60	1	871,790 ±0,001
40,0 ±0,1	60	2	362,400 ±0,001
40,0 ±0,1	60	3	131,962 ±0,001
40,0 ±0,1	30	1	874,620 ±0,001
40,0 ±0,1	30	2	328,643 ±0,001
40,0 ±0,1	30	3	134,589 ±0,001
40,0 ±0,1	15	1	815,393 ±0,001
40,0 ±0,1	15	2	329,451 ±0,001
40,0 ±0,1	15	3	110,547 ±0,001

En la tabla N°4 se observan los valores promedio de concentración de las diferentes condiciones de operación donde se puede verificar el valor óptimo dentro de los parámetros estudiados.

Como se sabe fueron evaluadas tres temperaturas diferentes en el proceso de extracción (8, 25 y 40°C). A medida que aumentaba la temperatura aumentaba de igual forma la concentración de proteína en el extracto resultante como puede observarse en el estudio cuantitativo realizado a dichas muestras (Tabla N° 4). Otro punto importante a destacar es que en los estudios realizados a la temperatura de 40°C no se observó degradación de los grupos proteicos importantes (albúminas, globulinas), como se puede observar en las figuras 10 y 11, por lo que en primera instancia es factible el uso de esta temperatura ya que proporciona una fuerza impulsora que incrementa la transferencia de masa debido a que la difusividad de un soluto diluido en líquido es proporcional a la temperatura según Geankoplis (1998) y

de esta manera aumenta la eficiencia del proceso, ya que se obtienen mayor cantidad de proteína en el extracto, sin perder la calidad de la misma.

Además de los cambios de temperatura realizados durante el proceso de extracción se estudió la posibilidad de realizar varios lavados con solvente fresco al residuo obtenido de la primera separación de fases llevada a cabo, como se sabe, a través de la centrifugación de la mezcla amaranto/solvente. Tomando en cuenta los resultados cuantitativos obtenidos del estudio BCA y de lo que se puede observar de los geles de poliacrilamida, más de tres lavados con solvente fresco no aporta una cantidad significativa de proteína total adicional a los lavados anteriores, por lo que haría innecesario un cuarto, quinto o “n” número de lavados posteriores. Como se puede observar en la Tabla N°4 los terceros lavados tienen en promedio entre 80 y 90% menos cantidad de proteína que el primero.

El tiempo de agitación fue variado tomando como base al tiempo original establecido por Juan y col. (2007) el cual fue de 30 minutos. Se probó la posibilidad de usar un tiempo menor y uno mayor al establecido originalmente (15 y 60 minutos respectivamente). Los resultados obtenidos muestran como el rendimiento del proceso de extracción no aumenta significativamente con el aumento del tiempo, menos de 1% aproximadamente, de igual manera al disminuir el tiempo a 15 minutos el rendimiento del proceso disminuye en 2% aproximadamente como se puede observar en la Tabla N°5 y por lo que en conclusión para este parámetro no vale la pena cambiar las condiciones iniciales establecidas por Juan y col. (2007) (30 minutos, 3 lavados y 25°C). Una vez tomadas en cuenta todas las variables estudiadas se procedió a elegir las condiciones de operación del proceso de extracción de proteínas totales de la harina de amaranto, llegando a que dicha condición corresponde a la realizada a una temperatura de 40° C en un tiempo de 30 minutos y con un máximo de tres lavados con solvente fresco. A estas condiciones la eficiencia del proceso de extracción aumentó en aproximadamente 5% con respecto a las condiciones planteadas por Juan y col (2007).

Para determinar el rendimiento del proceso se utilizó un valor de contenido proteico en las hojas de la planta igual a  $29,75 \pm 0,94\%$ . Determinado por Bónoli (2010) mediante el método de Kjeldahl.

**Tabla N°5: Porcentaje de rendimiento del proceso a las diferentes condiciones estudiadas.**

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Porcentaje de rendimiento
60	8,0	$29,98 \pm 0,01$
30	8,0	$28,52 \pm 0,01$
15	8,0	$28,12 \pm 0,01$
60	25,0	$30,76 \pm 0,01$
30	25,0	$27,76 \pm 0,01$
15	25,0	$30,36 \pm 0,01$
60	40,0	$34,15 \pm 0,01$
30	40,0	$33,45 \pm 0,01$
15	40,0	$31,39 \pm 0,01$

El porcentaje de rendimiento se obtuvo calculando la cantidad de proteína extraída durante los tres lavados consecutivos de cada condición de operación y comparándola con el valor de  $29,75 \pm 0,94\%$  determinado por Bónoli (2010), tomando este último como el 100% de proteína presente en la hoja, es decir, se toma el 29,75% de la masa pesada y ese es el valor total de proteínas presente en la muestra, luego a través de la concentración y el volumen de extracto se determina la cantidad de proteína extraída, posteriormente se determina qué porcentaje representa este valor.

Como se puede observar en la tabla N°5 los porcentajes de rendimiento que se obtuvieron a partir de las diferentes condiciones de operación sugieren que 30 minutos y 40 °C es la condición óptima dentro del rango de trabajo. Cabe destacar que con 40°C y 60 minutos se obtiene mayor porcentaje sin embargo este valor solo difiere en aproximadamente 1% del antes mencionado y tomando en cuenta que esta condición implica usar el doble de tiempo de extracción, se decidió descartar esta

opción, sin embargo se debe estudiar a una mayor escala si la diferencia de porcentajes es representativa o no entre los tiempos empleados.



**Figura N°12: Estudio de cuantificación de proteínas mediante el método de BCA.**

En la Figura N°12 se puede observar el color de las muestras luego de agregar el reactivo de BCA en la microplaca. El color más intenso indica mayor contenido proteico y como se sabe la microplaca es llevada a un espectrofotómetro para la respectiva medición de las muestras.

#### **4.2 BASES DEL ESCALAMIENTO**

Para el diseño a escala piloto del proceso de extracción de proteínas hay que tomar en primer lugar la posible ubicación de la planta, en este caso en las instalaciones del IDEA (Valle de Sartenejas, Baruta), además de las condiciones a las que tiene que mantenerse la materia prima antes de ser procesada (harina de amaranto), establecer cuáles son los insumos necesarios y determinar cuáles son los equipos requeridos para llevar a cabo dicho proceso. En la sección metodológica se explicó con detalle cuáles eran las condiciones a las que debía mantenerse la materia prima antes de iniciar el proceso de extracción, dichas condiciones de almacenamiento (4°C en recipientes herméticos) se mantienen sin cambio a pesar de variar la escala. En cuanto a los insumos, en este caso en particular sólo se requiere una solución de NaOH en agua destilada al 0,2% p/v.

A continuación se muestra un diagrama de flujo de proceso de la planta piloto y será explicado a lo largo de esta sección.

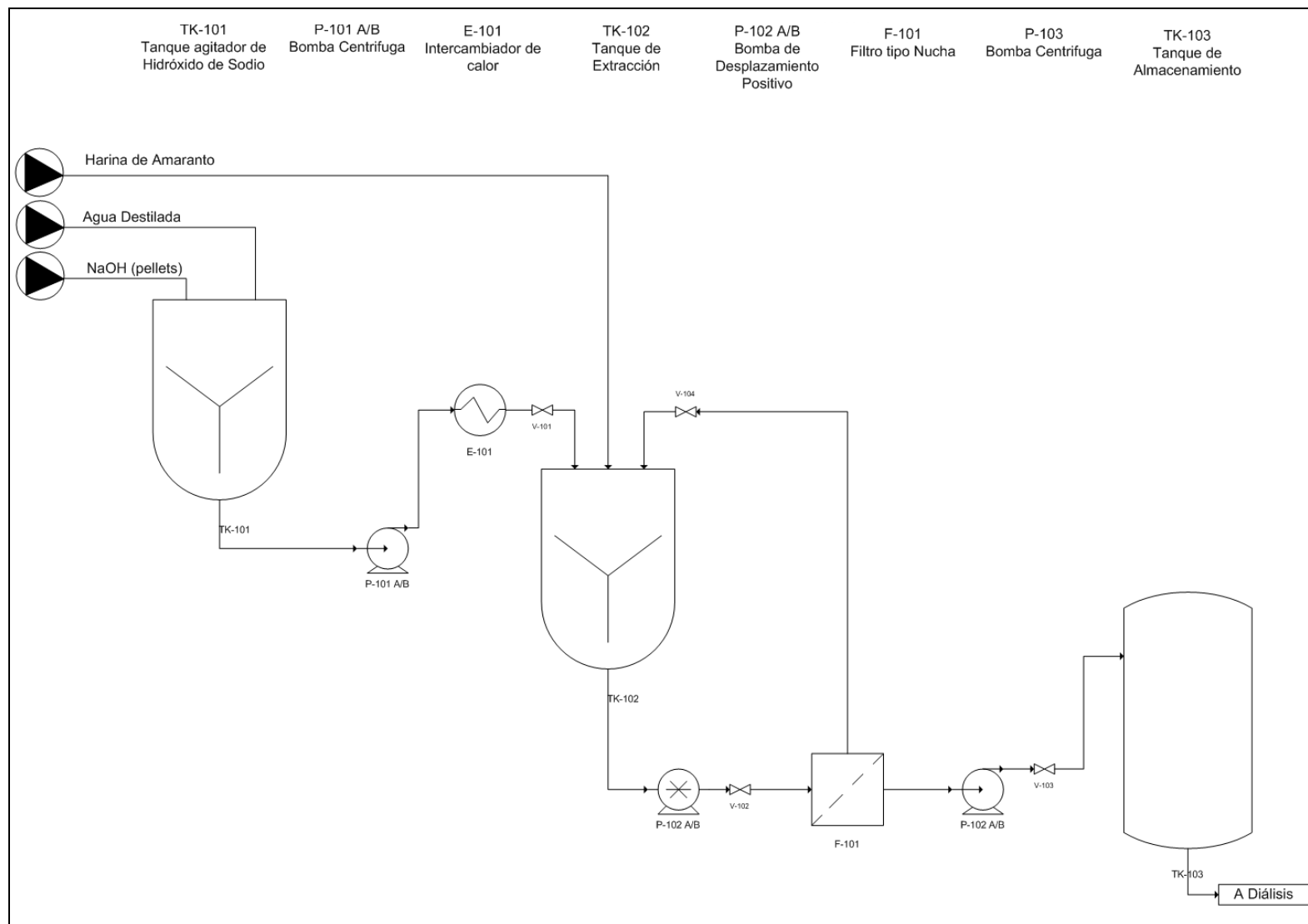


Figura N° 13 Diagrama de Flujo de procesos de la planta a escala piloto.

Se planteó preparar la solución de NaOH en un tanque con agitación, tomando en consideración los cuidados que hay que tener al preparar dicha solución debido a las características químicas del reactivo (reacción exotérmica). Tomando en cuenta lo anterior el material que se recomienda a usar para este tipo de reactivo es acero inoxidable 316L, ya que este posee una composición química (cromo, níquel y molibdeno) resistente a la corrosión (Inoxidable, 2006). Este tanque estaría conectado al tanque de extracción a través de una sección de tubería, donde en primer lugar el fluido pasará por una bomba centrífuga, de baja potencia (entre 0,5 a 1,5 Hp), encargada de llevar el solvente desde el tanque de preparación de NaOH hasta un intercambiador de calor de tubos y carcasa, el cual calentará la solución desde una temperatura ambiente (dependiente de la zona geográfica en la que se ubicará la planta piloto) hasta la temperatura de extracción (40°C) y posteriormente al ya mencionado tanque de extracción, el cual tendrá un aislamiento con el propósito de mantener la temperatura dentro del mismo. Cabe destacar que por la naturaleza corrosiva del hidróxido de sodio el material que se podría usar tanto en bombas, tuberías e intercambiadores de calor será Acero Inoxidable 316L. A continuación se presenta una tabla con las especificaciones básicas del tanque de preparación.

**Tabla N°6: Dimensiones del tanque de preparación de la solución de NaOH.**

<b>Número de tanques a emplear</b>	2
<b>Volumen del tanque (m<sup>3</sup>)</b>	0,12
<b>Diámetro del tanque (m)</b>	0,53
<b>Altura del tanque (m)</b>	0,64
<b>Material</b>	Acero Inoxidable 316L

En la tabla N° 6 se muestran las especificaciones básicas del tanque de preparación del solvente, calculadas a partir de la misma metodología (relaciones de altura, diámetro y volumen) usada para escalar el tanque de extracción. Se decidió utilizar dos tanques con el propósito de tener la cantidad suficiente para realizar los tres lavados por cada una de las cargas a procesar diariamente, realizando la preparación requerida para completar la cantidad necesaria por día, es decir, mientras está en uso



el primer tanque, el segundo se encuentra preparado para suplir solvente al termino del anterior.

El intercambiador de calor y la bomba no van a operar de manera continua ya que el proceso llevado a cabo es por cargas y por lo tanto estos dispositivos serán activados en el momento que sean requeridos para iniciar la etapa de extracción. La cantidad de calor a generar por el intercambiador va a depender de la temperatura ambiente, en este caso entre 25 y 30°C. Se estima que el flujo que maneje la bomba será aproximadamente entre 0,30 y 0, 50 L/s.

Para el proceso de selección de la tecnología de separación de fases para el escalamiento es importante destacar que se decidió sustituir la centrifugación por un proceso de filtración debido a que este presenta un menor costo de inversión y mantenimiento, además de operar de manera sencilla.

Una vez terminado el proceso de lavado la mezcla es llevada a través del uso de una bomba de desplazamiento positivo hasta un filtro donde se procede a separar el material sólido de la mezcla y posteriormente realizar el siguiente lavado agregando solvente puro. Cabe destacar que es de vital importancia recuperar el sólido por lo que se debe usar un filtro que provea dichas características. Para este propósito se decidió utilizar un filtro de mono placa o tipo nucha que consiste en un reactor cilíndrico en el que la filtración tiene lugar sobre tela o papel en el fondo del depósito. Su superficie actúa como medio filtrante y es ideal para poder retirar los sólidos filtrados. La separación sólido/líquido tiene lugar gracias a la presurización del depósito (TEFSA, s.f).

Principales características:

- Filtro cerrado y estanco. Ideal para la filtración de líquidos peligrosos y/o de alto valor.
- Posibilidad de filtrar sobre tela y/o sobre papel. Ideal para la separación de sólidos con un alto valor.

- Realización íntegra del filtro en acero inoxidable. Ideal para tratar productos alimentarios.
- Ausencia de volúmenes muertos en el interior del filtro con un escurrido total de líquido en el sólido separado. Ideal para trabajar por lotes con nulas pérdidas de producto.
- Construcción simple y robusta. Notable reducción de los costes de mantenimiento.
- Posibilidad de encamisar. Apto para procesos con la temperatura como factor crítico.

Para el diseño del tanque en donde se lleva a cabo la extracción de proteínas (que a partir de ahora se llamará tanque de mezclado) es de vital importancia tener bien claras las condiciones de operación del mismo. Estas condiciones fueron establecidas con los ensayos de laboratorio realizados como ya se ha mencionado en la sección anterior.

El dimensionamiento del recipiente de mezclado ameritó estudiar el comportamiento del volumen total de la mezcla de harina de amaranto y solvente (NaOH 0,2% p/v), usando para ello cantidades distintas de harina. Para el primer ensayo se pesaron 0,8 g de harina y se mezclaron con 9,8 mL del solvente (considerando la relación 1:12 de harina/solvente). Para el segundo y tercer ensayo se duplicó sucesivamente la cantidad de harina a usar, todo esto con el propósito de hallar el comportamiento del volumen total de la mezcla. A continuación se presenta una tabla que resume lo ya mencionado:

**Tabla N° 7: Estudio de volumen de mezcla amaranto/solvente.**

Masa de Amaranto (g)	Volumen de Solvente (mL)	Volumen de mezcla (mL)
0,8007 ± 0,0001	9,6 ± 0,1	10,0 ± 0,1
1,6002 ± 0,0001	19,2 ± 0,1	20,0 ± 0,1
2,4008 ± 0,0001	28,8 ± 0,1	30,0 ± 0,1

De la tabla N°7 se puede observar que el volumen de la mezcla aumenta de forma lineal a medida que se duplica la cantidad de harina. Este estudio permitió predecir el volumen de muestra a tratar usando 5 Kg de materia prima por carga, tomando en cuenta para determinar esta cantidad una siembra de ¼ de hectárea y una relación de 171000 plantas por hectárea (Alvarado y de la Rosa, s.f). Se planteó trabajar con dos cargas de harina por día, cada una de 5 Kg, tomando en consideración el tiempo necesario para la preparación del proceso en su totalidad. Solamente el proceso de extracción tiene una duración de 30 minutos pero de igual forma se tomó en cuenta todo el tiempo que es necesario para la carga de materia prima, para la limpieza del filtro y para la recarga del mezclador (segundo y tercer lavado). Se estimó que para llevar a cabo un proceso completo de extracción incluyendo los tres lavados, el tiempo total debería no ser mayor a las 4 horas, por lo que si se plantea una jornada de producción de 8 horas, se estaría hablando de dos cargas de harina como ya se mencionó anteriormente.

Tomando en cuenta la relación 1:12 entre la harina y el solvente se puede deducir el volumen de NaOH necesario para cada una de las cargas. Si por cada carga la cantidad de harina es de 5 Kg, entonces la cantidad de solvente que se usaría sería:

$$V_s = \frac{5kg \times 12L}{1Kg} = 60L \quad \text{Ecuacion 4.1}$$

El estudio del volumen total realizado muestra como al agregar una cantidad determinada de harina el aumento del volumen total de la mezcla es 4,17 % mayor al volumen inicial de solvente puro, es decir, se determinó cuanto representa la diferencia entre el volumen final de la mezcla con respecto al volumen inicial de solvente puro. Con este valor se determinó que el volumen total esperado de la mezcla a trabajar es de 62,5 litros. Finalmente se decidió diseñar el tanque de agitación para abarcar un volumen máximo de 70 litros, dando así un margen de sobre-diseño de un 12% con respecto al volumen teórico requerido.

Seguidamente, una vez establecido el volumen del tanque, se procedió a determinar el diámetro del mismo a escala piloto mediante el uso de una razón de escalamiento entre el volumen de la escala de partida y el volumen de la escala de llegada, cumpliendo con los principios establecidos para que exista una semejanza geométrica. Tanto el beaker como el tanque agitador poseen una forma cilíndrica por lo que se empleó la ecuación del volumen de un cilindro para ambos casos.

A continuación se muestra el procedimiento completo del escalamiento (Geankoplis, 1998).

$$V = \frac{(D)^2}{4} \times H \times \pi \quad \text{Ecuacion 4.2}$$

Donde:

V: Volumen [m<sup>3</sup>]

D: Diámetro [m]

H: Altura del líquido [m]

Se sabe que la relación entre la altura del líquido y el diámetro para un tanque de agitación normal es:

$$\frac{H}{D} = 1 \quad \text{Ecuacion 4.3}$$

Por lo que la ecuación genérica del volumen se transforma en la siguiente relación matemática:

$$V = \frac{(D)^3}{4} \times \pi \quad \text{Ecuacion 4.4}$$

Se hizo la igualación de las ecuaciones de volumen para obtener la relación de escalamiento y de esta manera hallar el diámetro del tanque mezclador.

$$\frac{V_t}{V_b} = \frac{\pi \times D_t^3 / 4}{\pi \times D_b^3 / 4} = \frac{D_t^3}{D_b^3} \quad \text{Ecuacion 4.5}$$

Donde:

Sub índice t: Tanque

Sub índice b: Beaker

Finalmente se pudo calcular el diámetro con la simplificación y despeje de la ecuación 4.5 como se muestra a continuación:

$$D_t = D_b \times \left(\frac{V_t}{V_b}\right)^{1/3} \quad \text{Ecuacion 4.6}$$

Donde:

$$R = \left(\frac{V_t}{V_b}\right)^{1/3} = \frac{D_t}{D_b} \quad \text{Ecuacion 4.7}$$

Es la razón de cambio de escala.

Mediante la relación de diámetro de tanque y de diámetro del agitador se obtuvo el tamaño del Agitador de la siguiente manera:

$$\frac{D_a}{D_t} = 0.5 \quad \text{Ecuacion 4.8}$$

El Ancho de la paleta del aspa del impulsor se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\frac{W}{D_a} = \frac{1}{5} \quad \text{Ecuacion 4.9}$$

Donde:

W = ancho de la paleta del impulsor [m]

A continuación se muestra una tabla resumen de los resultados obtenidos para el diseño del tanque mezclador.

**Tabla 8: Dimensiones del tanque de agitación.**

Escala	Razón de Escala (adim)	Diámetro del tanque (m)	Diámetro del aspa (m)	Ancho de la paleta (m)
Piloto	10,89	0,45	0,22	0,04
Laboratorio		0,04	0,02	-

Una vez establecido las dimensiones del tanque a escala piloto se calculó el Reynolds a escala de laboratorio usando para ello los datos de velocidad radial, diámetro, viscosidad y densidad, todos obtenidos a través de los ensayos experimentales. La ecuación usada para determinar el Reynolds fue la siguiente:

$$Re = \frac{D \times N \times \rho}{\mu} \text{ Ecuacion 4.10}$$

Re: Número de Reynolds [Adimensional]

N: Velocidad radial [RPM]

$\rho$ : Densidad [Kg/m<sup>3</sup>]

$\mu$ : Viscosidad [cP]

El valor densidad fue determinado a partir de estudios experimentales usando un picnómetro el cual fue 1020 Kg/m<sup>3</sup>, mientras que para la viscosidad se tomó un promedio viscosidades reportado por (Kaura y Singha, 2010) el cual fue de 150 cP.

Para garantizar que el comportamiento entre ambas escalas sea el mismo es necesario que el valor del Reynolds sea igual tanto para la escala piloto como para la escala de laboratorio. Bajo esta premisa se planteó lo siguiente:

$$\frac{Dt \times Nt \times \rho}{\mu} = \frac{Db \times Nb \times \rho}{\mu} \quad \text{Ecuacion 4.11}$$

Se estableció que el valor de la viscosidad y la densidad tanto para la escala de laboratorio como para el tanque a escala piloto son iguales debido a que las condiciones son las mismas, la ecuación 4.11 se simplifica a:

$$Dt \times Nt = Db \times Nb \quad \text{Ecuacion 4.12}$$

De la ecuación 4.11 se despeja el valor de  $Nt$ , el cual representa el valor de la velocidad radial del agitador para el tanque a la escala piloto.

Con el Reynolds calculado con la ecuación 4.10 se procedió a determinar el número de potencia ( $Np$ ) usando la Figura N°14 mostrada a continuación:

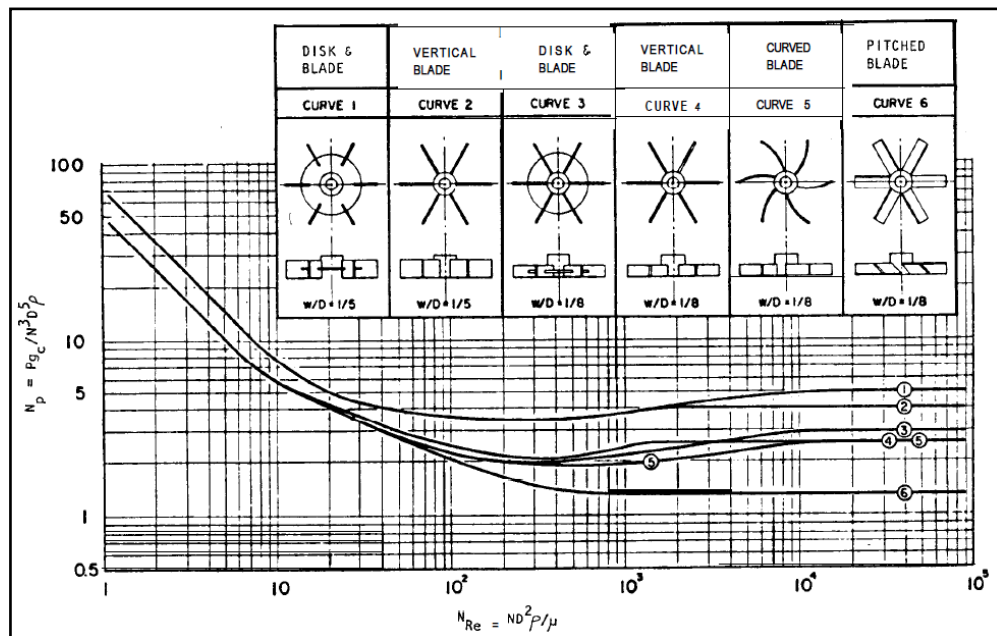


Figura N°14: Gráfica del número de potencia en función del Reynolds (Geankoplis, 1998).

Para poder usar la Figura N°14 fue necesario seleccionar con anterioridad el tipo de impulsor o agitador a utilizar en el tanque mezclador. El agitador que más se adapta a las características del fluido y a las características del proceso es el agitador tipo

turbina con hojas inclinadas a 45° ya que esta garantiza tanto un flujo radial como un flujo axial necesario para un buen mezclado en suspensiones (Geankoplis, 1998). Este tipo de agitador es útil para sólidos en suspensión, ya que las corrientes fluyen hacia abajo y luego levantan los sólidos depositados. Este impulsor está representado por la curva 6 en la gráfica.

El número de potencia determinado gráficamente corresponde a la ecuación presentada a continuación:

$$Np = \frac{P}{\rho \times N^3 \times D^5} \quad \text{Ecuacion 4.13}$$

$Np$ : Numero de Potencia [Adimensional]

$P$ : Potencia [Vatios]

De la ecuación 4.13 se despejó la potencia del impulsor y se usó como valor de  $N$  y de  $D$  a los ya determinados por las ecuaciones 4.12 y 4.6 respectivamente, los cuales corresponden al tanque agitador en la escala piloto. La ecuación quedó de la siguiente forma:

$$P = \rho \times N^3 \times D^5 \times Np \quad \text{Ecuacion 4.14}$$

La potencia calculada fue de 0,0007 hp, el cual es un valor que según la bibliografía corresponde o está dentro del rango normal para procesos de agitación y mezclado suave (0,0005 a 0,001 hp/gal).

Para el estudio de la transferencia de calor y masa en el proceso es necesaria la medición de parámetros como la conductividad térmica y la difusividad del componente soluble en el solvente. Debido a que no se dispuso de los equipos necesarios para medir estos parámetros característicos de la mezcla no fue posible estimar los coeficientes de transferencia de calor y masa del sistema por lo que no se pudo corroborar la semejanza térmica del sistema sin embargo es importante destacar que la transferencia de calor afecta a la extracción de la proteína.



En cuanto al almacenamiento del producto se sabe que en primer lugar se debe retirar el hidróxido de sodio mediante una diálisis a fin de evitar la desnaturalización de las proteínas a mediano y largo plazo. Es importante destacar que este debe hacerse en tanques de acero inoxidable, ya que posee un fin alimentario, a una temperatura de 4°C con el fin de conservar las proteínas durante un tiempo prolongado

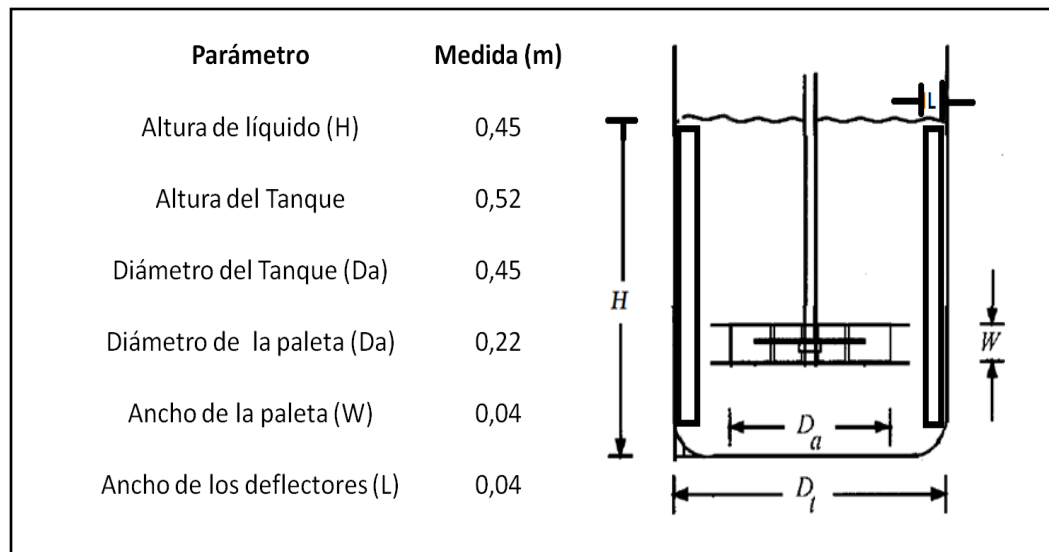


Figura N°15: Especificaciones del Tanque de Agitación.

En la Figura N°15 se pueden observar las características o especificaciones del Tanque de Agitación donde se lleva a cabo la extracción de la proteína de la hoja de la planta de Amaranto

## **CONCLUSIONES**

Una vez obtenidos y analizados los resultados del presente Trabajo Especial de Grado se puede concluir lo siguiente:

- La eficiencia del proceso de extracción de proteína total se incrementó en 5% aproximadamente al aumentar la temperatura del mismo sin producir la desnaturalización de los grupos proteicos presentes en las muestras.
- La variación del parámetro tiempo de extracción no generó cambios significativos en el rendimiento del proceso lo que lleva a considerar el tiempo original de 30 minutos como tiempo suficiente para realizar la extracción.
- Tomando en consideración los datos obtenidos a nivel experimental a través de la cuantificación de grupos proteicos, el número de lavados que se puede realizar obteniendo una cantidad de producto significativa es de tres.
- Se escaló el proceso de extracción, usando para ello la información recopilada por los ensayos experimentales, dando como resultado el diseño de un tanque agitado de 70 litros con 0,43m de diámetro y 0,52 m de alto.
- Se planteó el procesamiento de 10 Kg de harina de amaranto por día considerando una jornada de labores no mayor a 8 horas.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar ensayos de laboratorio que contemplen el estudio de otras variables importantes en el proceso con el objetivo de afinar los detalles del escalamiento. Un ejemplo de variable a estudiar podría ser el tamaño de partícula de la harina de amaranto.
- Realizar estudios de diálisis con el propósito de eliminar el hidróxido de sodio de las muestras de manera de evitar la desnaturalización de las proteínas.
- Ver la posibilidad de realizar estudios de laboratorio o a escala piloto en donde se use la filtración en lugar de la centrifugación como método para separar el sobrenadante del residuo generado durante el proceso de extracción.
- Realizar estudios más minuciosos para poder identificar con exactitud todos los grupos proteicos presentes en la hoja de la planta.
- Realizar estudios para verificar el comportamiento termodinámico de la mezcla.
- Se debe realizar un Análisis Estadístico de manera de verificar la repetitividad y reproducibilidad del método de extracción.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo, Iria y col. (2007). Valor nutritivo del Bledo (*amaranthus*) identificado en el Municipio Morán, Estado Lara. *Agrollania* (Vol. 4).
2. Alimentación Sana. (2010). El Amaranto. Consultado el 28 de abril de 2010, en <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/chef/amaranto.html>.
3. Alvarado, Sofía y de la Rosa, Liberto. (s.f). Guía Técnica para la Producción Orgánica de Amaranto. *Revista Alimentos Argentina*. Edición 18.
4. Amarantum. (2005). Amarantum la proteína. Consultado el 9 de abril de 2010 en <http://www.amarantum.com>
5. Bio-Rad. Find Products & Information. Consultado el 25 de mayo de 2010 en <http://www.bio-rad.com/evportal/evolutionPortal.portal>
6. Bónoli, Laura. (2010). Evaluación del proceso de extracción de proteínas totales del follaje de Amaranto (*amaranthus dubius*). Barcelona, Venezuela.
7. Calleja P., Guillermo. (1999). Introducción a La Ingeniería Química. Primera Edición. Editorial Síntesis. 523 p.
8. Fernández E. y Galván A. (s.f.). Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Córdoba, España. Consultado el 25 de abril de 2010 en <http://www.uco.es>
9. Food and Agriculture Organization. (FAO). (2010). Resumen de país, Venezuela. Consultado el 20 de abril de 2010 en <http://www.fao.org/countries/55528/es/ven>.
10. García, Hilda. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnostico*. Consultado el 16 de abril de 2010 en [http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1\\_2\\_00/uni07200.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm)
11. Geankoplis, Christie. (1998). Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. Tercera Edición. Editorial Continental. México.

- 
12. Inoxidable. (2006). Corrosión. Consultado el 19 de octubre de 2010 en [www.inoxidable.com](http://www.inoxidable.com)
  13. Juan R. y col. (Enero 2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y Aceites* (Vol. 58).
  14. Kaura S. y Singha N. (2010). *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food Chemistry* Volume 123, Issue 4.
  15. Karp, Gerald. (1998). *Biología celular y molecular*. Editorial McGraw Hill. Quinta Edición. 782p.
  16. Lixiviación. (2008). Consultado el 6 de mayo de 2010 en <http://www.lixiviacion.com/pagina/lixiviacion-definicion>.
  17. Muñoz P., Francisco. (2009). Nutriweb, Proteínas. Consultado el 28 de abril de 2010 en <http://www.aula21.net/Nutriweb/proteinas.htm>.
  18. Murray, Robert K. (1988). *Bioquímica de Harper*. Undécima Edición. México. El Manual Moderno. S.A de C.V. 708 p.
  19. PID Eng & Tech. (s.f). Consultado el 12 de octubre de 2010 en <http://pidengtech.com/>.
  20. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación. (S.F). Introducción a la nutrición. <http://www.mailxmail.com/curso-introduccion-nutricion/ingestion-recomendada-proteinas>
  21. The World Bank, IBRD & IDA (s.f). Datos estadísticos. Consultado el 24 de abril de 2010 en <http://siteresources.worldbank.org/DATASTATISTICS/Resources/POP.pdf>
  22. TEFSA (s.f). Técnicas de Filtración S.A. Consultado el 8 de octubre de 2010 en <http://www.gruptefsa.com/sp/index.htm>.
  23. Vasco M., Nora L. (1999). Purification, Crystallization, and Preliminary X-ray Characterization of 36kDa Amaranth Globulin. *J. Agric. Food Chem.*

## REACTIVOS

### 4X Running Gel Buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Buffer para preparar el gel de separación:

36.3 g Tris (FW 121.1)

Añadir 150 ml ddH<sub>2</sub>O

Ajustar a pH 8.8 con HCl

ddH<sub>2</sub>O a 200 ml

Almacenar hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.

18.15 g

75 mL

idem

hasta 100 mL.

### 4X Stacking Gel Buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Buffer para preparar el gel de stacking:

3.0 g. Tris (FW 121.1)

Añadir 40 ml ddH<sub>2</sub>O

Ajustar a pH 6.8 con HCl

ddH<sub>2</sub>O a 50 ml

Almacenar hasta 3 meses a 4°C en la oscuridad.

### 10% SDS

10 g. SDS

ddH<sub>2</sub>O a 100 ml

Almacenar hasta 6 meses a T<sup>a</sup> ambiente.

### 10% Ammonium Persulfate (Initiator)

0.05 g ammonium persulfate

ddH<sub>2</sub>O a 0,5 ml.

No almacenar, prepararlo en el momento de usar.

### 2X Treatment Buffer (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v Glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8)

2.5 ml. 4X Stacking Gel Buffer

4.0 ml. 10% SDS

1.0 ml. Glycerol

2.0 mg. Bromophenol blue

0.31 g. dithiothreitol (DTT; FW 154.2)

ddH<sub>2</sub>O a 10.0 ml

Almacenar en alícuotas de 0.5 ml a -20°C hasta 6 meses.

### Monomer Solution (30.8%T 2.7%Cbis)

60 g. Acrilamida (FW 71.08)

Precaución: La Acrilamida es neurotóxica y debe ser manipulada con cuidado.

1.6 Bisacrilamida (FW 154.2)

ddH<sub>2</sub>O a 200 ml

### Tank Buffer (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3)

Buffer para los reservorios del ánodo y cátodo:

Tris:	24.22 g.	12.12 g	6.06 g
Glicina:	115.3 g	57.60 g	28.8 g
SDS:	8g.	4.0 g	2.0 g
DdH <sub>2</sub> O:	8 L	4 L	2 L

No es necesario comprobar el pH.

**Transfer Buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin, SDS 0.04%, 20% Methanol)**

Tris	3.03 g	1.65 g
Glicina	14.41 g	7.20 g
SDS 20%	2 ml	1 ml
DdH <sub>2</sub> O hasta	1 L	0.5 L

Ajustar el pH a 8.3

Añadir leche descremada al 5% el día en que se use

Ojo: SDS sólo se añade para transferir proteínas desnaturalizadas

**Buffer de bloqueo (250 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 250 mM PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.5 % Tween-20)**

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na	16.0 g	3.0 g
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	17.8 g	3.6 g
NaCl	4.4 g	0.9 g
Tween-20	2.5 ml	0.5 ml
DdH <sub>2</sub> O hasta	500 ml	100 ml

**Buffer de lavado (0.15 M NaCl, 0.5% Tween-20, Volúmen final 1000 ml.)**

	<u>200 ml</u>	<u>500 ml</u>	<u>1000 ml</u>
NaCl:	1.75 g	4.39 g	8.77 g
Tween-20	1 ml	2.5 ml	5 ml

## TINCIÓN DE GELES

### Tinción con Coomassie 0.2%

Preparación de **solución stock**:

Añadir una tableta de Coomassie (Fast Gel Blue R de Pharmacia) a 80 ml de ddw

Agitar 5-10 mins

Añadir 120 ml de metanol y agitar 2-3 mins

Filtrar a través de papel de filtro. Almacenar a T<sup>a</sup> ambiente.

En el momento de usar preparar la **solución de trabajo**:

4 ml ac. Acético

16 ml ddw

20 ml sc. Stock

### **Solución de desteñido**

Metanol	30% ml
Ac. Acético	10% ml
Ddw	60% ml

**Solución preservadora**

Glicerol 5%	0.5 ml
Ac. Acático 10%	1 ml
Ddw 85%	8.5 ml

**ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

**Gel del 10%**

**Gel de separación**

	<u>2 geles</u>	<u>1 gel</u>
Agua redestilada	4.1 ml	2.05 ml
Monómero Acrilam- Bis-Acrilam. 30%- 0.8%	3.3 ml	1.65 ml
Buffer de separación	2.5 ml	1.25 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
	<hr/>	<hr/>
	10 ml	5.0 ml
PSA 10%*	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

**Gel de STACKING**

Agua redestilada	2.4 ml
Monómero Acrilam- Bis-Acrilam. 30%- 0.8%	0.6 ml
Buffer de stacking	1.0 ml
SDS 10%	0.04 ml
	<hr/>
	4.04 ml
PSA 10%*	25 µl
TEMED	10 µl



### **ACRILAMIDA AL 30%**

Para 100 ml de acrilamida, se debe emplear las siguientes cantidades:

1. 29,2 gramos de acrilamida.
2. 0,8 gramos de bisacrilamida.
3. 100 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q.

### **TRIS-HCl 1,5 M a pH 8,8**

Para 50 ml de Tris-HCl se debe emplear:

1. 9,7 gramos de trizma base.
2. Llevar a 40 ml con H<sub>2</sub>O milli-Q, y ajustar pH.
3. Agregar los mililitros faltantes hasta completar los 50 ml.

### **APS al 10%**

1. 0,891 gramos de APS.
2. 891  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milli-Q.
3. Colocar en 10 tubos (100  $\mu$ l por tubo).
4. Guardar a -20 °C.

### **TRIS-HCl 1 M a pH 6,8**

Para 50 ml usar las siguientes cantidades:

1. 3 gramos de trizma base.
2. Llevar a 40 ml con H<sub>2</sub>O milli-Q.

3. Ajustar pH.
4. Completar con H<sub>2</sub>O milli-Q hasta llegar a 50 ml.

### **BUFFER CORRIDA 5X**

Para preparar 1 litro de buffer se debe emplear las siguientes soluciones:

1. 15,1 gramos de trizma base.
2. 72 gramos de glicina.

### **MARCADORES DE PESO MOLECULAR**

#### **1. Stock Sample Buffer (store a room temperature):**

- 4,8 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q.
- 1,2 ml de Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8.
- 1 ml de glicerol.
- 2 ml de SDS al 10% p/v.
- 0,5 ml de azul de bromofenol al 0,1% p/v.

#### **2. SDS Reducing Simple Buffer (preparar inmediatamente antes de ser usado):**

- 2,5 µl de β-mercaptoetanol.
- 475 µl de Stock sample buffer.