

ESTUDIO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS HOJAS DE LA PLANTA  
*Moringa oleífera* A ESCALA LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE  
CONCENTRADOS DE PROTEÍNA Y DE CLOROFILA

YARY ADRIANA PÉREZ RINCÓN  
TATIANA SILVA ARDILA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2015

ESTUDIO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS HOJAS DE LA PLANTA  
*Moringa oleífera* A ESCALA LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE  
CONCENTRADOS DE PROTEÍNA Y DE CLOROFILA

YARY ADRIANA PÉREZ RINCÓN  
TATIANA SILVA ARDILA

Trabajo de grado para optar al título de  
Ingeniero Químico

Director:  
CARLOS JESÚS MUVDI NOVA  
Ingeniero Químico, Ph.D

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2015

## *Dedicatoria*

*A Dios quien agradezco por guiarme en cada paso hasta llegar hacer realidad esta meta,  
por darme la fortaleza para superar cada obstáculo y seguir adelante.*

*A mi madre quien desde la distancia siempre me ha acompañado,  
a mi padre por sus enseñanzas, ellos son mi ejemplo a seguir.*

*A mi hermana por ser esa persona en quien siempre puedo confiar y mi mejor amiga,  
y a mi hermano por su apoyo incondicional.*

*A todos mis compañeros Gloria, Dietmar, Silvia, Federico, Juliana*

*A Tatiana por su amistad, por ser el complemento perfecto  
en tantos días de estudio parciales, exposiciones, trabajos y demás.*

*A Diana Cañas quien siempre me ofreció una verdadera amistad y quien me hizo ver  
tantos aspectos la vida desde otra perspectiva, ella junto a Dani Acuña se encargaron  
convertir la etapa final de mi carrera en un recuerdo inolvidable.*

*De nuevo a Dios gracias por poner en mi camino  
a personas tan maravillosas, las llevo en mi corazón.*

**Yary Pérez**

## *Dedicatoria*

*A Dios, por todas las bendiciones recibidas, por darme fuerzas en los momentos difíciles y permitirme alcanzar este logro.*

*A mis padres, por darme la vida, por el tiempo y dedicación en mi formación en buenos valores y principios. Gracias por el apoyo y confianza.*

*A mis hermanas, por el amor y compañía, sobre todo Laura quien se convirtió durante mi carrera en mi segunda mamá. Gracias por nunca dejarme sola.*

*A mi esposo, por su tiempo y apoyo en la realización de este proyecto, se convirtió casi en un integrante más; gracias por su amor y compañía sobre todo en los malos momentos.*

*A su familia, por el cariño, acogimiento y preocupación en esta última etapa.*

*Muy especialmente a mi compañera de proyecto, ella además de ser mi gran amiga de toda la carrera y una amiga muy especial para mí, fue mi sustento en este proceso. Sin ella esto no sería posible. Gracias por estar conmigo en las alegrías y tristezas.*

*Al CICTA y todos mis compañeros que trabajaron allí, se convirtieron en mis amigos. Gracias por toda la ayuda, guiarnos y aconsejarnos y por el tiempo compartido.*

*A mis amigos por el cariño, la preocupación y acompañamiento.*

*Finalmente, y en mayor medida a mi hija, quien ha sido mi motivación e inspiración cada día. Por llegar a mi vida y llenarla de alegría. Ella es una autora más de este proyecto.*

*Tatiana Silva*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Calos Muvdi por su dedicación en la realización de este proyecto.

A Lady, Arley y Luis Carlos por su colaboración en el laboratorio Cicta

A los ingenieros Pablo Gonzales y Alirio Gonzales

A la empresa PI-DELTA Construcciones S.A.S

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>1. METODOLOGÍA</b>	22
1.1 <b>FASE 1:</b> CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Moringa oleífera</i>	22
1.2 <b>FASE 2:</b> ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POR EXTRUSIÓN	23
1.3 <b>FASE 3:</b> ESTUDIO DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS	24
1.4 <b>FASE 4:</b> ESTUDIO DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE CLOROFILA POR EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO	244
1.5. <b>FASE 5:</b> PLANTEAMIENTO DE UN ESQUEMA DE TRANSFORMACIÓN	255
1.6. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS	25
<b>2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	26
2.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS HOJAS DE <i>Moringa oleífera</i>	26
2.2 EXTRUSIÓN DE LAS HOJAS DE <i>MORINGA OLEÍFERA</i> .	26
2.3 RECUPERACIÓN PROTEÍNAS POR COAGULACIÓN TÉRMICA Y PRECIPITACIÓN ÁCIDA.	30
2.4 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE CLOROFILA UTILIZANDO COMO SOLVENTE ETANOL.	34

2.5. PROPUESTA PRELIMINAR PARA LA IMPLEMENTACIÓN FUTURA DE UNA PLANTA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y CLOROFILA A PARTIR DE LAS HOJAS DE LA PLANTA <i>Moringa oleífera</i> .	37
2.5.1. Descripción del proceso.	37
2.5.2. Capacidad	41
2.5.3. Selección de los equipos	42
<b>3. CONCLUSIONES</b>	44
<b>4. TRABAJOS FUTUROS</b>	45
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	46
<b>ANEXOS</b>	55

## LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Comparación de las concentraciones experimental y las teóricas para las hojas de *Moringa oleífera*. .....26

Tabla 2. Contenido de proteína (%) en base seca (BS) de los productos obtenidos en la extrusión: extracto líquido y material fibroso para hojas de 60 y 45 días de rebrote.....29

Tabla 3. Contenido de proteína en el precipitado seco obtenido en el proceso de coagulación térmica con precipitación ácida, a diferentes temperaturas y pH. .31

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Planta de <i>Moringa oleífera</i> . a) Arbusto, b) Hojas, c) Flor. ....	16
Figura 2. Cuadro metodológico utilizado en el presente trabajo. ....	22
Figura 3. Rendimiento del proceso de extrusión para las distintas muestra de hojas de <i>Moringa oleífera</i> .....	27
Figura 4. a) Concentración de clorofila [mg/kg] b) Rendimiento [%], obtenida a partir del material extruido (producto de la extrusión) mediante la técnica de separación S-L a diferentes condiciones de pH, %EtOH, y temperatura.....	34
Figura 5. Diagrama de bloques de la propuesta preliminar del proceso.....	38

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> BALANCE DE MASA DEL PROCESO PROPUESTO.....	56
<b>Anexo B.</b> PLANO DE DISTRIBUCIÓN.....	58
<b>Anexo C.</b> EQUIPOS .....	59

## RESUMEN

**TITULO:** ESTUDIO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LAS HOJAS DE LA PLANTA *Moringa oleífera* A ESCALA LABORATORIO PARA LA OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE PROTEÍNA Y DE CLOROFILA.\*

**AUTORAS:** YARY ADRIANA PÉREZ RINCÓN  
TATIANA SILVA ARDILA\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Concentrado proteico, escaldado, extrusión, coagulación térmica, precipitación ácida, clorofila.

### DESCRIPCION:

La extracción de proteínas a partir de las hojas de plantas vegetales ha tomado gran importancia, debido a que pueden sustituir a las fuentes convencionales de proteína animal, las cuales son de mayor costo y menor disponibilidad. Como parte de la solución a estos inconvenientes, se estudió por primera vez la extracción de proteína presente en las hojas de *Moringa oleífera*. Las hojas caracterizadas presentaron un contenido de proteína de 26% en BS. Se obtuvo un extracto líquido mediante la extrusión de las hojas analizando la influencia de: la edad, tamaño y escaldado como pretratamiento. Las proteínas fueron separadas del líquido por coagulación térmica y precipitación ácida en dos niveles de temperatura (65, 85°C) y pH (4; 5,6). Además, se realizó una extracción S-L de clorofila al material fibroso obtenido en la extrusión, evaluando el efecto de la temperatura (20,40°C), del pH (6,7,8) y de la concentración del solvente etanol (80,90,100% v/v). Como resultados se obtuvo, un concentrado de proteína 38,5±0,6% en BS y 8±0,95% de humedad a partir de las mejores condiciones de separación (85°C y pH 4,0), y un extracto líquido de clorofila de concentración 421 mg de clorofila /L utilizando las mejores condiciones de operación (40°C, pH 7, y 100% v/v de etanol). Con base en estos resultados se propuso un esquema preliminar para el procesamiento de las hojas de *Moringa oleífera* a pequeña escala con tecnologías disponibles en el mercado colombiano.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química. Director: Carlos

Jesús Muvdi Nova

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY FOR THE PROCESSING PLANT LEAVES *Moringa oleifera* SCALE LABORATORY FOR OBTAINING PROTEIN CONCENTRATE AND CHLOROPHYLL\*

**AUTHORS:** YARY ADRIANA PÉREZ RINCÓN  
TATIANA SILVA ARDILA\*\*

**KEY WORDS:** Protein concentrate, scalded, extrusion, thermal coagulation, acid precipitation, chlorophyll.

### DESCRIPTION:

The extraction of proteins from the leaves of vegetable plants has taken great importance, due to the fact that they can substitute the conventional sources of animal protein, which are more expensive and have less availability. As part of the solution to these disadvantages, there was studied by the first time the extraction of proteins contained in the leaves of *Moringa oleifera*. Characterized leaves had a protein content of 26% in BS. Liquid extract was obtained by extrusion process of the leaves analyzing the influence of: the age, size and scalded like pretratamiento. The proteins were separated from the liquid by thermal coagulation and acid precipitation in two levels of temperature (65, 85°C) and pH (4; 5,6). Further, was realized an S-L extraction of chlorophyll to the fibrous material obtained in the extrusion, evaluating the effect of the temperature (20,40°C), of the pH (6,7,8) and of the concentration of the solvent ethanol (80,90,100 % v/v). As results it was obtained, a concentrate of protein  $38,5\pm 0,6$  % in BS and  $8\pm 0,95$  % of humidity from the best conditions of separation (85°C and pH 4,0), and a liquid extract of chlorophyll of concentration 421 mg of chlorophyll/L using the best conditions of operation (40°C, pH 7, and 100 % v/v of ethanol). Based in these results one proposed a preliminary scheme for the processing of the leaves of *Moringa oleifera* on a small scale with available technologies on the Colombian market.

---

\* Work Degree

\*\* Faculty of physicochemical engineering. School of Chemical Engineering. Research Center for Food Science and Technology. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova, Msc., PhD.

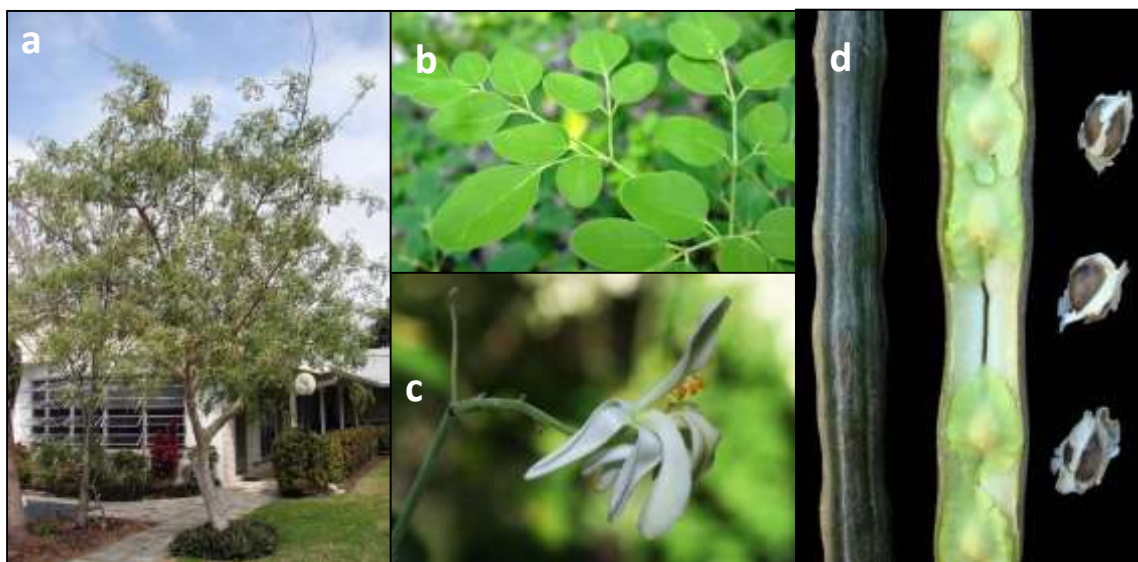
## INTRODUCCIÓN

En la actualidad ha surgido un constante interés en el uso de las hojas vegetales, no solo con fines medicinales como se han utilizado a lo largo de los años, sino también, en la formulación de nuevos productos como los de tipo alimenticio, debido a su fácil obtención por ser un recurso renovable (Gómez, 2011). Además, uno de los principales atributos de las hojas vegetales es su elevado contenido nutricional: antioxidantes, vitaminas, pigmentos y proteínas (Gonzales, 2010) (Meléndez *et al.*, 2007). Las proteínas son nutrientes indispensables para la vida, pues provienen de fuentes animales o vegetales y aportan los aminoácidos esenciales para el correcto funcionamiento del cuerpo (Reeds, 2000). Se destaca que las proteínas vegetales que se encuentran principalmente en las legumbres, frutos secos, soja y en algunas hortalizas, no contienen colesterol ni grasas saturadas asociadas perjudiciales para la salud. Las proteínas presentes en las hojas de algunos árboles se pueden extraer, y de esta forma generar una alternativa al consumo y obtención de proteínas provenientes de fuentes animales (Ávila, 1978). Como ejemplo a mencionar, están las hojas del arbusto *Moringa oleífera*, el cual ha sido objeto de estudios recientes (Singh *et al.*, 2013) (Pontual *et al.*, 2012) destacándose su alto valor nutricional (Falasca y Bernabé, 2008).

La *Moringa oleífera* de la familia monogenérica *Moringaceae* (Govardhan *et al.*, 2013) es un arbusto caducifolio pequeño que mide desde 2,5 a 10 m de altura, nativo de la India e introducida al Caribe por los franceses (Alfaro y Martínez, 2008). Actualmente se cultiva ampliamente en países como México, Guatemala, (Martínez *et al.*, 2011), Cuba, Venezuela (Pérez *et al.*, 2010), Argentina y Puerto Rico (Falasca y Bernabé, 2008). En Colombia se pueden encontrar cultivos en los departamentos del Valle del Cauca, Atlántico, Meta, Bolívar y Santander (Martínez *et al.*, 2011). Este arbusto es muy versátil a las condiciones climáticas y de suelo, por lo que constituye una opción para la alimentación, sobre todo en países tropicales (Pérez *et al.*, 2010). Se reproduce mediante semilla o de

manera asexual (estacas), aún en suelos pobres (Nelson y Rau 2012). Además, aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo y lo protege de factores externos como la erosión, la desecación y las altas temperaturas (Peréz *et al.*, 2010). Está constituido por un tronco generalmente espeso e irregular, una corteza blanquecina, corona pequeña y densa (Figura 1.a), hojas de aproximadamente 2 cm de largo de color verde claro (figura 1.b) y numerosas flores fragantes de color crema agrupadas por sépalos (Figura 1.c) (Alfaro y Martínez, 2008).

**Figura 1. Planta de *Moringa oleífera*.**



**a) Arbusto [Fuente: Página web [moringaoleiferaparapatios.blogspot.com](http://moringaoleiferaparapatios.blogspot.com), consultado el 6/01/15] b) Hojas [Fuente: Página web [moringamexico.com](http://moringamexico.com), consultado el 7/01/15] c) Flor [Fuente: Página web [www.alibaba.com](http://www.alibaba.com), consultado el 8/01/15]**

El fruto está conformado por vainas, las cuales contienen a las semillas (Figura 1.d). Éste se produce una o dos veces al año, especialmente entre los meses de septiembre y noviembre (Alfaro y Martínez, 2008). Los meses de florecimiento pueden variar dependiendo de la ubicación geográfica del cultivo.

Este arbusto se ha utilizado en diferentes estudios, entre los que se encuentra la extracción de antioxidantes y fenoles (Govardhan *et al.*, 2013), de aceites (Ayerza, 2011) y la evaluación de la capacidad antimicrobiana a partir de las semillas (Govardhan *et al.*, 2013). Igualmente, se ha estudiado la actividad caseinolítica y coagulante de las flores de esta planta (Pontual *et al.*, 2012), pero sobre todo, su potencial como fuente nutricional para contribuir en la solución de problemas de seguridad alimentaria (Martínez *et al.*, 2011). La mayoría de las partes del arbusto de *Moringa* contiene proteína en distintas cantidades, entre las que se destacan las semillas con un 31,65% en base seca (BS) (Rashid *et al.*, 2011) y las hojas un 28,7% en BS (Borges *et al.*, 2013). Es por esto, que se consumen las vainas cocidas, las semillas tostadas como nueces, las raíces como condimento por su sabor picante y las hojas como verdura y ensalada (Falasca y Bernabé, 2008).

Con el fin de aprovechar los nutrientes presentes en las hojas de *Moringa*, se ha realizado la extracción de estos mediante diversas técnicas. Su importancia radica en que las hojas contienen más vitamina A y C que las zanahorias, más calcio que la leche, más hierro que las espinacas y más potasio que los plátanos (Fahey, 2005). Las hojas se encuentran en mayor proporción y durante todo el año en la *Moringa* a diferencia de sus semillas. Además, teniendo en cuenta que las hojas en su composición presentan un 28,7% en BS de proteína se garantiza una fuente constante de las mismas (Borges *et al.*, 2014). Sin embargo, hay poca información en la extracción de proteína a partir de las hojas de *Moringa* y no existe, hasta ahora, ningún método establecido para aplicaciones industriales. Ahora bien, resaltando las bondades que se le atribuyen a esta planta, en especial en el campo de la nutrición, su estudio se hace muy interesante.

Estudios relacionados con la extracción de proteínas en vegetales indican, que el mayor desafío se encuentra en liberar estos compuestos de la pared celular,

la cual es difícil de fragmentar debido a su composición química (mezcla compleja de polisacáridos, celulosa, hemicelulosa y pectina) (Yong y Lay, 2011), (Pauchet *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, se ha establecido un protocolo universal para la extracción de proteínas en vegetales, el cual consiste en la homogenización de los tejidos por molienda física. Para esto, las hojas cosechadas se maceran haciendo uso de molinos o trituradores (Wallace *et al.*, 1998), (Maldonado *et al.*, 2008), (Tangka 2003), (Aletor *et al.*, 2002). Además, se puede emplear agua a altas temperaturas para desintegrar el tejido vegetal (Shen *et al.*, 2007). Después de esto, la pulpa obtenida se pasa a una prensa, de la cual se obtiene un jugo concentrado rico en proteínas (Tangka 2003). Algunos autores argumentan que el grado de maceración afecta a la cantidad de proteína que se obtiene durante el prensado (Byers, 1961), (Davys y Pirie 1960). Sin embargo, otros estudios muestran que el proceso de macerado no es importante en comparación con el prensado, donde se necesita que la presión sea mínimo 5 kPa, para que todas las sustancias mecánicamente extraíbles sean expulsadas de la célula independientemente de la maceración (Tangka, 1995).

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una planta de aspecto y composición muy similar a la *Moringa*. En la industria se utiliza como materia prima, en la producción de alimento para el ganado debido a su alto contenido de proteínas (Firdaous *et al.*, 2009). Recientemente, se desarrolló un método de fraccionamiento de hojas de esta planta para la extracción de proteínas, el cual se fundamenta en la extrusión de doble tornillo (Zeitoun *et al.*, 2010). En este método, el rendimiento obtenido es de más del 50% (Colas *et al.*, 2013) y es muy promisorio para valorizar este tipo de plantas en aplicaciones dirigidas al consumo humano (Lamsal *et al.*, 2007). Una vez extraído el zumo de la hoja con las técnicas ya mencionadas, la siguiente etapa corresponde a la separación de las proteínas del zumo concentrado. Estas se extraen con solventes como el fenol saturado (pre-extracción), tampón tris-sacarosa (retro-extracción) y mezcla de solventes como ácido tricloroacético (TCA)-acetona y TCA-acetona-fenol (Sheoran *et al.*, 2008); seguido por la precipitación de las mismas con acetato de amonio (Yong y Lay, 2011). Sin embargo, el uso de estos solventes presentan el inconveniente de no

ser permitidos en la industria alimenticia debido a que son perjudiciales para la salud.

Por otro lado, las soluciones alcalinas también han sido muy utilizadas como un método eficaz en la extracción de proteínas de fuentes vegetales. Se cree que la alta concentración alcalina ayuda a romper los enlaces de hidrógeno y grupos sulfato (Shen *et al.*, 2007) que conlleva al aumento de la solubilidad de las proteínas en el agua (Guo *et al.*, 2005). El estudio realizado por Shen *et al.* (2007), en el que analizaron las hojas de té, se obtuvo un rendimiento en la extracción de hasta el 56,4% al hacer uso del método alcalino. Igualmente, Shen *et al.* (2007) analizaron un método enzimático (utilizando *Alcalase* y *Protamex*) con el que se obtuvo una tasa de extracción del 47,8%.

Los anteriores métodos para aislar la proteína de los concentrados proteicos a partir de hojas vegetales, han sido utilizados esencialmente en experimentos a escala laboratorio. Solo se tiene registro de un método a escala industrial utilizado en Francia para la recuperación de proteínas a partir de extractos foliares de la alfalfa. Este método consiste en la separación por coagulación térmica del material cloroplasmático y citoplasmático a temperaturas entre 65°C (Kennedy, 1993) y 85 °C (Zanin, 1998).

Simultáneo a la obtención del líquido concentrado del cual se ha venido hablando para la extracción de proteínas, se obtiene una gran cantidad de material fibroso rico en pigmentos, con gran potencial a ser valorizado. Los pigmentos son compuestos orgánicos o inorgánicos que le confieren el color a los tejidos de la planta; estos absorben energía con una longitud de onda entre 350 y 750 nm de la luz visible (Boo *et al.*, 2012). Los colores en los alimentos influyen en el rechazo o aceptación por parte del consumidor (Gonzales, 2010). Es por esto, que la demanda de pigmentos se ha incrementado, siendo de preferencia los de

origen natural, ya que éstos son renovables y biodegradables, mientras que los de origen sintéticos son mutagénicos, carcinógenos, alérgicos y tóxicos para el medio ambiente (Boosong *et al.*, 2012).

Uno de los pigmentos vegetales de mayor comercialización, gracias a sus numerosas funciones, es la clorofila. Además de ser el pigmento más abundante en las plantas terrestres (Schoefs, 2004), se utiliza como un agente colorante verde (E140) en alimentos y medicinas. Entre sus beneficios se destaca, la prevención y protección de enfermedades humanas como el cáncer y otras enfermedades degenerativas debido a su significativa actividad antioxidante (Gonzales, 2010) (Melendez, *et al.*, 2007), y anti-mutagénica (Delgado *et al.*, 2014). Se ha encontrado en estudios recientes que la clorofila natural es capaz de inhibir la absorción de carcinógenos y el desarrollo de tumores en roedores y peces (McQuistan, *et al.*, 2011).

Los pigmentos se obtienen principalmente de las plantas, mediante métodos de extracción sólido-líquido, con disolventes orgánicos como etanol, metanol y acetona debido a su carácter hidrofóbico (Schoefs, 2004). Teniendo en cuenta su aplicación en la industria alimenticia, el etanol como disolvente presenta grado alimenticio y conlleva a buenos resultados en la extracción de clorofila. Así lo demuestra un estudio realizado por Hojnik *et al.* (2007) en el aislamiento de la clorofila en la planta de ortiga, utilizando diferentes porcentajes de concentración de etanol-agua (100, 90 y 80%) y variando además pH y temperatura en los valores de 6 a 13 y de 20 a 40°C, respectivamente.

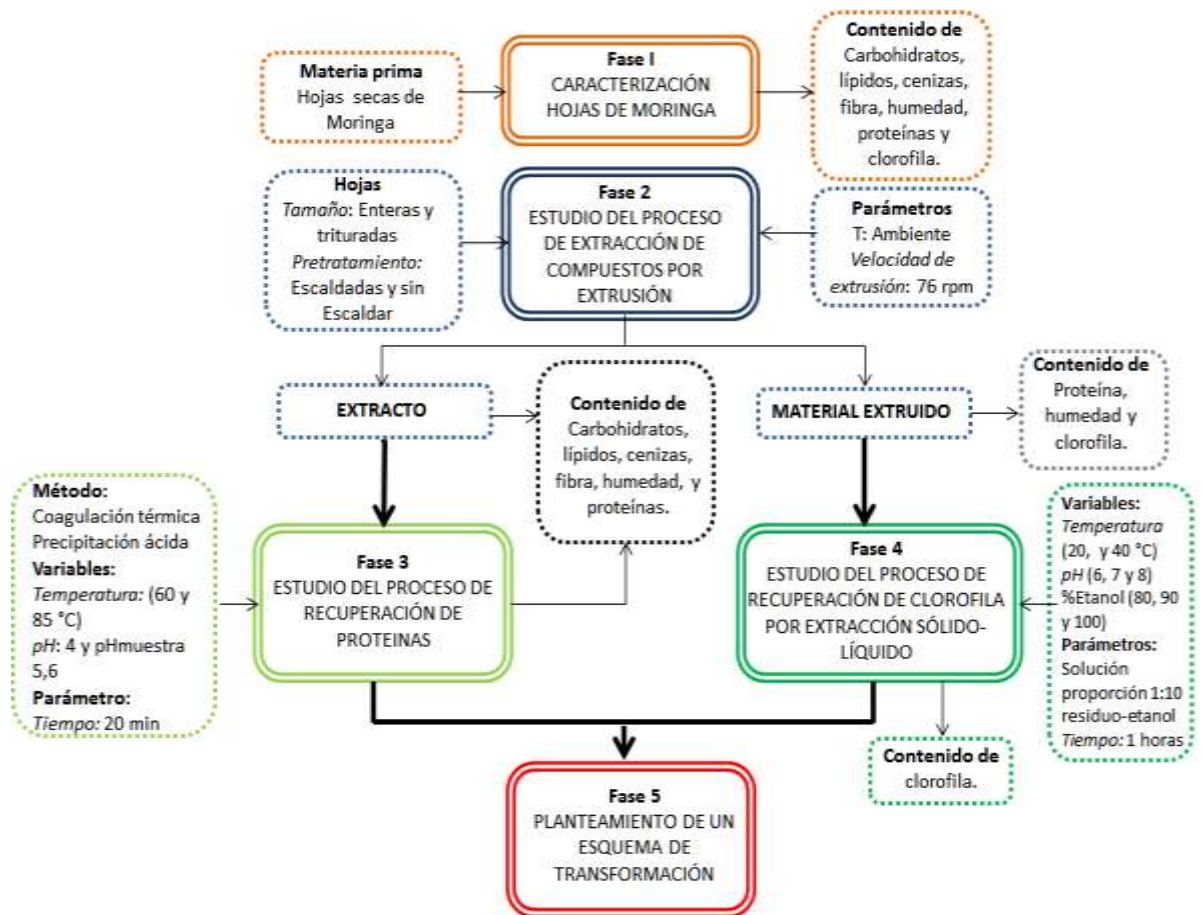
Si bien no se ha planteado un método en específico para la extracción de proteínas de las hojas en la planta *Moringa oleífera*, haciendo una revisión bibliográfica se puede encontrar que el tema ha sido ampliamente estudiado en las hojas de diferentes plantas como las hoja de yuca ( *Manihot esculanta* ), Siam malezas ( *Chromolaena odorata* ), hoja amarga ( *Vernonia amygdalina* ), gliricidia ( *Gliricidia maculata* ), árbol espinoso ( *Hura crepetans* ) (Tangka, 1995), tete Verde ( *Amaranthus hybridus* ), calabazas estriadas ( *Telfaria occidentalis* ) (Aletor

*et al*, 2002) y Alfalfa ( *Medicago sativa*) ( Lamsal *et al.*, 2007 ). Con lo cual, se evidencia que existe el fundamento teórico para proponer una metodología dirigida hacia la transformación de hojas de *Moringa*, que permita la extracción de proteínas y clorofila. Este proyecto se realizó en colaboración con la empresa PI-DELTA Construcciones S.A.S y es de tipo exploratorio con la cual se pretende obtener información preliminar valiosa para futuros proyectos.

# 1. METODOLOGÍA

En la Figura 2 se presenta el esquema metodológico utilizado en la presente investigación. Cuatro de las cinco fases son de tipo experimental, y la última es una propuesta teórica teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio.

Figura 2. Cuadro metodológico utilizado en el presente trabajo.



## 1.1. FASE 1: CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE *Moringa oleífera*

La composición de las hojas de *Moringa* varía dependiendo del terreno utilizado, las condiciones climáticas y del tiempo de corte de las hojas (Falasca y Bernabé,

2008). Por esto, se realizó la caracterización en contenido de proteínas y pigmentos presentes, además de la cantidad de humedad, fibra, cenizas, lípidos, y carbohidratos. Estos valores permiten tener una referencia de la calidad de la materia prima. En esta fase se caracterizaron hojas de *Moringa oleífera* secadas a 60°C durante 24 h (CICTA-UIS) y trituradas para obtener un polvo seco. Las hojas de *Moringa* fueron suministradas por la finca propiedad de la empresa PI-DELTA construcciones S.A.S ubicada en el municipio de Sabana de Torres, Santander.

## **1.2 FASE 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POR EXTRUSIÓN**

En esta fase, se realizó la extracción de proteínas por extrusión determinando la influencia de la edad (45 y 60 días) y tamaño de las hojas de *Moringa* en la extracción de dichos compuestos. Esto debido a que la reducción de tamaño puede aumentar significativamente el rendimiento en la extracción de compuestos a partir de material vegetal (Stamatopoulos *et al.*, 2012). Para esto, las hojas se analizaron en dos formas: enteras y trituradas. La trituración se realizó utilizando un picador MFP200 BLACK&DECKER 120 W. Adicionalmente, se analizó el efecto del escaldado de las hojas (como pretratamiento) sobre el proceso. Este pretratamiento se realizó con vapor saturado a 100°C, durante 2 min (Kaiser *et al.*, 2013).

Para este estudio se utilizó un diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> con duplicado. La extracción se evaluó en términos de rendimiento (líquido obtenido respecto a la cantidad inicial de hojas). Tanto el extracto como el material extruido se caracterizaron en contenido de proteínas y humedad; y al material extruido además en contenido de clorofila.

### **1.3. FASE 3: ESTUDIO DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS**

En esta etapa se analizó los efectos de las variables temperatura y pH en la separación de proteínas (por coagulación térmica combinado con precipitación ácida) presente en el líquido extraído en el proceso de extrusión. Se utilizó un diseño experimental factorial  $2^2$  con duplicado. Se evaluaron las temperaturas de 60°C (Aletor *et al.*, 2002) y 85 °C a pH de 4 (Urribarrí, 2004) y pH del extracto obtenido de la extrusión (5,6). Se acidificó con solución de ácido cítrico 2 N ya que es permitido en la industria alimentaria (Vázquez y Canon, 2007). El extracto coagulado se centrifugó a 5500 rpm durante 15 min y se secó en horno a 60 °C durante 24 h (CICTA-UIS), para su posterior cuantificación en proteína, fibra, ceniza, lípidos, humedad y carbohidratos.

Previo al proceso de recuperación de proteínas por coagulación térmica y precipitación ácida, se realizó una clarificación al extracto líquido producto de la extrusión con el fin de eliminar material particulado. Para esto, el extracto se filtró al vacío y posteriormente se centrifugó a 5500 rpm durante 15 min (determinado con pruebas preliminares).

### **1.4. FASE 4: ESTUDIO DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE CLOROFILA POR EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO**

La finalidad de esta etapa fue estudiar el proceso de obtención de clorofila a diferentes valores de pH y temperatura (diseño experimental factorial multinivel). Se utilizó el subproducto obtenido en el proceso de extrusión de las hojas de *Moringa oleífera* (material extruido). Los resultados permiten determinar el potencial de esta etapa para la recuperación de la clorofila a partir del material extruido. Para ello, se varió la temperatura, el pH y la concentración de etanol como disolvente en valores de 20°C y 40°C; 6,7 y 8; y 100, 90 y 80% v/v respectivamente y con duplicado. La extracción se realizó durante 1 h y se utilizó una mezcla de 10 ml de etanol/gr de material vegetal extruido (Hojnik, *et al.*, 2007). Una vez realizada la extracción, la mezcla se filtró con el fin de separar el

material extruido decolorado. El líquido filtrado, el cual contiene clorofila, se concentró por rotoevaporación a 40°C durante 1h, y así aumentar el contenido de clorofila y además recuperar una fracción del etanol alimentado.

### **1.5. FASE 5: PLANTEAMIENTO DE UN ESQUEMA DE TRANSFORMACIÓN**

En esta fase se analizaron los resultados obtenidos en las fases anteriores con el fin de establecer las mejores condiciones que permitan definir la estructura de un posible esquema de transformación, el cual se presentará como propuesta preliminar para la implementación futura de una planta de extracción de proteínas y clorofila a partir de las hojas de la planta *Moringa oleífera*.

### **1.6. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS**

En las instalaciones del CICTA-UIS se realizaron los análisis de humedad (A.O.A.C 925,10), ceniza (A.O.A.C 923,03), fibra cruda (A.O.A.C 930,20), lípidos (A.O.A.C 920,80), 925,10 proteína (A.O.A.C 920,87), y clorofila por lectura espectrofotométrica en el visible utilizando las ecuaciones de Lichtenthaler (Zhongfu *et al.*, 2009)

## 2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 2.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LAS HOJAS DE *Moringa Oleífera*.

En la Tabla 1 se muestra el análisis bromatológico realizado para las hojas de *Moringa oleífera*, comparado con los datos reportados en la literatura. Se observa que los resultados experimentales son similares a los teóricos y además que las hojas analizadas tienen un alto porcentaje de proteína (26,0% en BS), lo que indica que son una buena fuente para su extracción. Este porcentaje de proteína es similar al de otras fuentes vegetales como: maní (27% BS), marañón y ajonjolí (20% BS) (FAO, 2002).

Tabla 1. Contenido experimental y teórico para las hojas de *Moringa oleífera*.

Parámetro	Contenido experimental [%]*	Contenido teórico [%]*	Referencia bibliográfica
Humedad	71,0±0,1	79,72	Alfaro y Martínez (2008)
Proteína	26,0±0,7*	28,65*	Borges et al. (2014)
Lípidos	7,3±0,2*	7,09*	Borges et al. (2014)
Ceniza	10,0±0,1*	10,9*	Borges et al. (2014)
Fibra	7,3±0,1*	7,48*	Alfaro y Martínez (2008)
Carbohidratos	56,2±0,4*	44,4*	Borges et al. (2014)

\* % en base seca (BS)

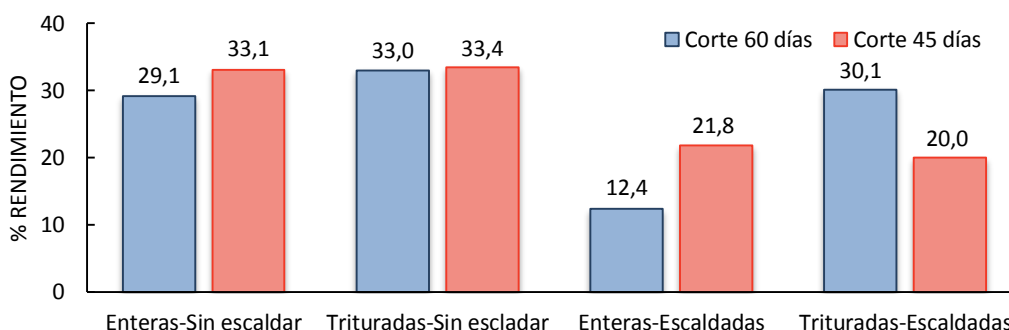
### 2.2. Extrusión de las hojas de *Moringa oleífera*.

En la Figura 3 se presenta el rendimiento de extracción para dos muestras de hojas de *Moringa* con tiempos de corte diferentes (45 y 60 días), con y sin tratamiento térmico (escaldado con vapor de agua); con y sin reducción de tamaño de las mismas (trituration). El rendimiento de extracción se calculó como la cantidad de líquido obtenido respecto a la masa de hojas alimentadas (ver ecuación 1).

$$\%Rend = \frac{g \text{ Extracto líquido}}{g \text{ Hojas frescas}} \quad \text{ecuación 1.}$$

Se observa que el rendimiento adquiere valores entre 12,4 y 33,4%, favoreciéndose en un 2% cuando el tamaño es reducido, en comparación con las hojas enteras. Aunque la gráfica presenta una tendencia aparentemente definida, en la cual los resultados se incrementan al usarse hojas sin escaldar, mediante el análisis estadístico realizado con el software Statgraphics Centurion XVI.I® (versión de prueba), se identificó que tanto el escaldado como el tamaño de las hojas, no tienen influencia significativa sobre el rendimiento de proceso ( $p$ -valores $>0,05$ ). Esto se puede deber a que los resultados de rendimiento son muy cercanos entre sí y oscilan en un  $30\pm 4\%$  para más del 63% de los resultados. Además, el rendimiento se favorece con la trituración según la Figura 3 en un 88% del total de las combinaciones de las variables, sin tener en cuenta el proceso de escaldado en las hojas. A pesar de esto, en las hojas de 45 días trituradas-escaldadas, esta tendencia no se cumple.

**Figura 3. Rendimiento del proceso de extrusión para las distintas muestra de hojas de *Moringa oleífera*.**



El mayor rendimiento del proceso fue de 33,4%, ligeramente superior al obtenido en la extracción de jugo de hojas de trigo y perejil (rendimientos 23 y 28%, respectivamente) (Newman *et al.*, 2006). Por otro lado, este valor es significativamente menor al obtenido por Colas *et al.* (2013) en su estudio para la recuperación de proteínas de la alfalfa, quienes reportan un 50%. Se puede atribuir que los bajos rendimientos alcanzados son resultado del equipo utilizado en el presente trabajo (extractor de jugos vegetales Lexen GP62 provisto de un

tornillo sin fin tipo extrusora). Éste al ser un equipo de uso doméstico no proporciona altas eficiencias en la extracción.

Teniendo en cuenta el estudio de Colas *et al.* (2013) mencionado anteriormente en el que se usó la extrusión de doble tornillo, se encuentra interesante para futuros trabajos de investigación, profundizar sobre el diseño y escalado de la extrusora. Lo anterior, con el objetivo de aumentar el rendimiento de extracción de líquido y así reducir el contenido de humedad presente en el material extruido ( $68,52 \pm 0,93\%$ ). Como complemento a la información del proceso de extrusión, del balance de masa se obtuvo que un 33,4% p/p corresponde al extracto líquido, un 59,6% al material extruido y un 7% a pérdidas.

La segunda variable evaluada en el proceso, fue el contenido de proteína presente en los extractos líquidos y el material fibroso extruido. A continuación, en la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de igual forma que en el rendimiento teniendo en cuenta el escaldado, triturado y edad de las hojas. Se observa que el contenido de proteína no presenta un cambio significativo para la combinación de variables (tamaño y pretratamiento térmico) en los productos de la extrusión, para la misma edad de las hojas. Por otro lado, se destaca que el mayor cambio en el contenido proteico es proporcionado por la edad de las hojas. Como soporte a lo anterior, se realizó el análisis estadístico realizado con el software Statgraphics Centurion XVI.I® (versión de prueba) el cual indica que la única variable que influye en el contenido de proteína es la edad, con un p-valor=0,0493 frente a 0,6026 y 0,9088 para el pretratamiento térmico y tamaño, respectivamente.

En la Tabla 2 se muestra que para las hojas de 45 días la composición en proteína es muy similar en los productos de la extrusión a diferencia de las hojas de 60 días en las cuales el contenido de proteico es mayor en el material fibroso (diferencia de 9% aprox). El contenido de proteína promedio en BS en el extracto líquido y material extruido fue de  $17,09 \pm 0,43\%$  y  $26,22 \pm 0,66\%$  respectivamente, usándose hojas de 60 días. Valores inferiores a los obtenidos para las hojas de

*Moringa* de 45 días con un porcentaje proteico de  $28,80\pm 0,72$  y  $31,40\pm 0,80\%$  en BS para el extracto y el material fibroso, respectivamente. Esta diferencia en la composición indica que el tiempo de corte de las hojas genera un aumento del 11% aprox. en la concentración de proteína para las hojas de 45 días frente a las de 60 días

**Tabla 2. Contenido de proteína (%) en base seca (BS) de los productos obtenidos en la extrusión: extracto líquido y material fibroso para hojas de 60 y 45 días de rebrote.**

Tipo de hojas	60 Días		45 Días	
	Extracto liq.	Material fib.	Extracto liq.	Material fib.
Enteras - Sin escaldar	$17,50\pm 0,44$	$25,17\pm 0,63$	$27,92\pm 0,70$	$29,95\pm 0,75$
Trituradas - Sin escaldar	$17,55\pm 0,44$	$26,32\pm 0,66$	$30,07\pm 0,75$	$30,61\pm 0,77$
Enteras – Escaldadas	$16,66\pm 0,43$	$26,29\pm 0,66$	$29,39\pm 0,73$	$32,82\pm 0,82$
Trituradas –Escaldadas	$16,68\pm 0,43$	$27,11\pm 0,68$	$27,79\pm 0,69$	$32,17\pm 0,80$

Haciéndose una comparación con las hojas de alfalfa (no se encuentran estudios relacionados con la edad de las hojas de *Moringa*), se encontró, que esta diferencia en el contenido de proteína, se debe al tiempo de crecimiento y maduración antes del corte de las hojas. El contenido de proteína se favorece cuando el corte se realiza en hojas jóvenes (Romero *et al.*, 1995). Por lo anteriormente mencionado, tanto en el análisis de resultados del rendimiento como en el contenido de proteína, se tiene que las mejores condiciones en los límites de las variables estudiadas para el proceso de extrusión son: hojas de 45 días de rebrote, trituradas y sin escaldar. Estas condiciones son la base para la elaboración de las siguientes fases de la metodología del proyecto y contribuyen al desarrollo del planteamiento del proceso a nivel industrial. La trituración es seleccionada debido a que facilitaría el proceso de extrusión, ya que reduce el tamaño, tanto de las hojas como de las fibras largas (ramas que contienen las hojas) que podrían bloquear el tornillo de la extrusora, sin que por esto se vean afectados los rendimientos. Además, su implementación en el proceso, conduce a un mayor aprovechamiento de las hojas y reduce el tiempo de selección de las

mismas (Zanin, 1998), mejorando así su manipulación (Greiner Packaging, 1997).

Se ha encontrado que el contenido total de proteínas en las hojas vegetales está constituido por proteínas de tipo soluble e insoluble. Las solubles se encuentran en menor cantidad frente a las insolubles, las cuales están ligadas a la pared celular del tejido vegetal (Chiesa y Gnansounou, 2011). Razón que explica el mayor contenido de proteína después de la extrusión en el material fibroso. Teniendo en cuenta que el presente proyecto tiene como propósito la obtención de resultados preliminares, se espera que en próximos proyectos, la temática de estudio esté dirigida en torno a la extracción de proteínas del material fibroso extruido.

### **2.3. RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS POR COAGULACIÓN TÉRMICA Y PRECIPITACIÓN ÁCIDA.**

La Tabla 3 muestra el porcentaje de proteína en BS presente en los precipitados obtenidos mediante el proceso de coagulación térmica con precipitación ácida. Se varió la temperatura y el pH, con el fin de extraer las proteínas solubles en el líquido obtenido de la extrusión. Los valores de proteína se encuentran en un rango de 32,9%- 38,5% en BS. El contenido en proteína respecto a la temperatura es ligeramente superior a 85°C que a 60°C. Este efecto de la temperatura se explica en una disminución de la solubilidad de las proteínas, ocasionada por la interacción del interior hidrofóbico de la proteína con el medio acuoso formando agregados (coágulos) (Bailey, 1967).

**Tabla 3. Contenido de proteína en el precipitado seco obtenido en el proceso de coagulación térmica con precipitación ácida, a diferentes temperaturas y pH.**

T [°C]	pH	PROTEÍNA [%] en BS
60	4,0	36,7 ± 0,6
	5,6*	32,9 ± 0,3
85	4,0	38,5 ± 0,6
	5,6*	35,0 ± 0,4

\*pH del extracto

Los resultados a 60 °C se favorecen en un 11,5% cuando el pH pasa de 5,6 a 4,0; en comparación a la temperatura de 85°C en la cual la extracción se incrementa en un 10% para el mismo cambio de pH. El mayor contenido de proteína se obtuvo a pH de 4,0 para las temperaturas de estudio. Al realizar la extracción a este pH, la coagulación de proteínas se incrementa debido a su proximidad con el punto isoeléctrico (PI). El PI es el valor de pH en el cual la solubilidad de las proteínas presente en extractos vegetales disminuye drásticamente, formando precipitados en forma de coágulos (Cortéz y Gallardo, 2005). Se ha encontrado que en algunas hojas como las de la variedad *tai* de la yuca (*Manihot esculenta Crantz*), al igual que la *Moringa*, presentan su PI a pH de 4,0; y las hojas de *jatropha* (*jatropha curcas L.*) tienen un PI ligeramente superior (pH 4,5). A estos valores de pH se reporta una concentración de proteína extraída para la yuca de un 31,2% en BS y para las hojas de *jatropha* de un 32,1% en BS (Serpa *et al.*, 2014).

El análisis de resultados presentado indica que la combinación de variables temperatura y pH tienen un efecto positivo en la extracción de proteínas. Al aumentar la temperatura se mejora el efecto del pH y se incrementa la liberación de las proteínas de las células vegetales que las contiene (Serpa, *et al.*, 2014). Por lo tanto, las condiciones a las cuales se presenta el mayor contenido de proteína en los precipitados extraídos de las hojas de *Moringa oleífera* son pH 4 y temperatura de 85°C. La temperatura de 85°C es cercana a la usada en los

procesos a nivel industrial para la obtención de concentrados proteicos a partir de las hojas de alfalfa, la cual es de 80°C (Contreras *et al.*, 2006).

A las mejores condiciones, se obtuvo un rendimiento de extracción de 13,6% (ver ecuación 2). Este valor es superior al estudio realizado por Corzo *et al.* (2000), quienes extrajeron proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens* con un rendimiento del 11,4%. Además, a estas mismas condiciones, el rendimiento de extracción global fue de 1% (ver ecuación 3). Este valor es cercano al reportador por Molina (2005) quien trabajó con hojas de maíz, obteniendo un rendimiento del 1,34%.

$$\%Rend \text{ Extracción} = \frac{g \text{ proteína en el precipitado}}{g \text{ proteína en extracto clarificado}} \quad \text{ecuación 2.}$$

$$\%Rend \text{ Extracción global} = \frac{g \text{ proteína en el precipitado}}{g \text{ proteína en las hojas}} \quad \text{ecuación 3.}$$

La mayor cantidad de proteína para los precipitados secos fue de  $38,5 \pm 0,6\%$  en BS. Es decir, 2,5 veces la contenida en el extracto clarificado (15% proteína en BS) y 1,48 veces mayor al de las hojas de *Moringa* (26% proteína en BS). Al precipitado seco se le realizó una prueba preliminar de deslipidado (según A.O.A.C 920,80), con el fin de retirar la grasa presente y de esta forma se logró aumentar la cantidad de proteína a un 42,5% en BS. Con este porcentaje en proteína, al precipitado seco se le puede denominar *concentrado proteico foliar* según el Codex Alimentarius (2004).

El contenido proteico del precipitado es cercano al de la harina de pescado, que contiene entre 40 - 50% en BS; y a la harina de soja que presenta entre 40 - 45% de proteínas en BS (Munive, 2009) (FAO). Sin embargo, la harina de pescado tiene la desventaja de poder presentar contaminación con *Salmonella* (FAO, 2002) y la harina de soja no contiene dos de los aminoácidos esenciales que la *Moringa* posee, metionina y cisteína (Cittadini *et al.*, 2012). Es importante

destacar que las hojas de *Moringa* contiene todos los aminoácidos esenciales, destacando en mayor cantidad la leucina (Sanchinelli, 2004).

Un estudio realizado por Furlan *et al.* (2013), para la obtención de concentrados proteicos por ultrafiltración, obtuvo concentrados de plasma y leche de bovino, y de leche de soja, con contenido de proteína de  $27,8 \pm 0,4\%$ ,  $34,8 \pm 0,3\%$  y  $28,8 \pm 0,2\%$  en BS, respectivamente; cantidades por debajo del concentrado proteico de hojas de *Moringa oleífera* obtenido en la presente investigación. Así mismo sucede con el estudio realizado por Carranco *et al.* (2002) en el que se realizó la extracción de proteína foliar de diferentes plantas acuáticas como por ejemplo: *Lemna gibba* (30,28% BS), *Azolla mexicana* (31,26% BS), *Polygonum mexicanum* (32,62% BS) e *Hydrocotyle ranunculoides* (37,10% BS). Sin embargo, para *Typha dominguensis* se obtuvo un 43,60%, cantidad cercana a la obtenida para la *Moringa*.

La significancia de las variables utilizadas en el proceso fue corroborada mediante el análisis estadístico ANOVA usando el software Statgraphics Centurion XVI.I® (versión de prueba) dando como resultado que la variable que tiene mayor efecto es el pH con un valor de  $p= 0,002$ , seguido de la temperatura con un  $p= 0,0014$ .

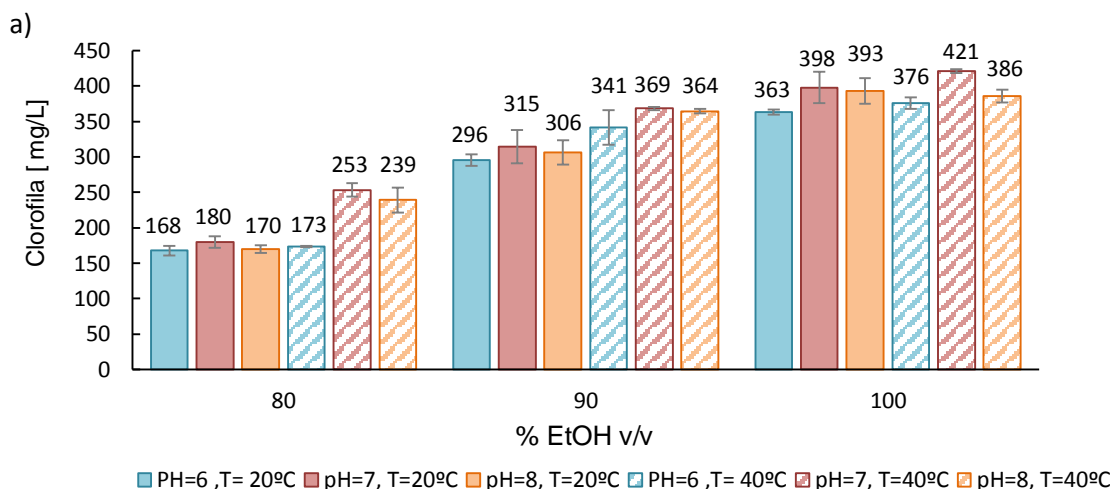
Por lo tanto, este precipitado proteico foliar podría ser usado como aditivo en la elaboración de alimentos, siendo una alternativa de fortificación, ya que generalmente se realiza con proteínas de origen animal (Mejía *et al.*, 2013) (Sanchinelli, 2004). Adicionalmente, este precipitado contiene 4,25% de ceniza, 9,80% de grasas, 1,43% de fibra, y un 47,45% de carbohidratos (en BS) (CICTA), lo cual le confiere un excelente valor nutricional, además ayuda a mitigar carencias dietarias, minimizando volumen y peso en un insumo alimenticio (Quintana y Alvarado, 2013).

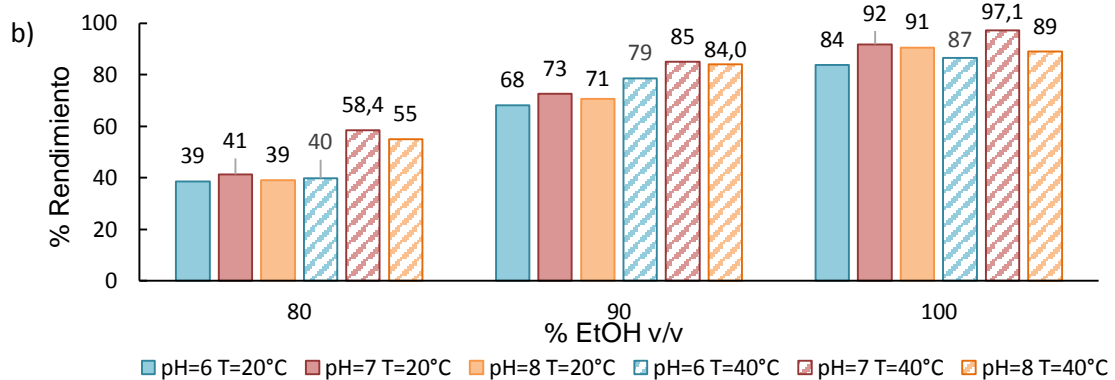
## 2.4 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE CLOROFILA UTILIZANDO COMO SOLVENTE ETANOL.

La concentración y rendimiento de clorofila obtenida a partir del material extruido mediante extracción S-L variándose pH, concentración de etanol y temperatura, se presentan en la Figura 4. En ésta se puede observar que el contenido de clorofila obtenida en el extracto a partir del material extruido (3469 mg clorofila/kg material extruido) adquiere valores entre 168 y 421 mg/L (Figura 4.a) y los rendimientos calculados (ver ecuación 4) se encuentran en un rango de 40 y 97% (Figura 4.b). Es importante mencionar que las hojas (materia prima) contienen 4232 mg de clorofila/kg de hojas, lo cual indica una pérdida de ésta de 18% aprox. durante el proceso de extrusión.

**Figura 4. a) Concentración de clorofila en los extractos obtenidos [mg/L b) Rendimiento [%], a partir del material extruido (producto de la extrusión) mediante la técnica de separación S-L a diferentes condiciones de pH, %EtOH, y temperatura.**

$$\%Rend = \frac{[ ]final\ en\ el\ extracto\ mg/kg}{[ ]inicial\ del\ residuo\ mg/kg} * 100 \quad \text{ecuación 4.}$$





Se observa que al pasar de la temperatura de 20 a 40°C la extracción de clorofila aumenta (Figura 4.a). La diferencia en los rendimientos de extracción asociados a este aumento en la temperatura (Figura 4.b) adquieren valores entre 1,3 y 17% (bajo las mismas condiciones de pH y concentración de etanol). Hojnik *et al.* (2007) también estudiaron el efecto de la temperatura sobre la extracción de clorofila a partir de hojas de ortiga (maceradas). En este estudio se analizó un rango comprendido entre 0-80°C y se encontró que la mejor temperatura de extracción fue también de 40°C. Se concluyó además, que a temperaturas por encima de este valor se da lugar a la degradación de la clorofila originando la formación de feofitinas y por debajo de esta temperatura la solubilidad de la clorofila disminuye.

Respecto al pH, los niveles más altos de clorofila se alcanzaron a pH neutro para las concentraciones de etanol y temperaturas estudiadas. En este valor de pH, al pasar de una concentración de 80 a 100% v/v de etanol a 40°C, se indujo un aumento en la clorofila de 154 mg/L de solución (63,8% de aumento). Esto se traduce en rendimientos de extracción de 58,4; 85,0 y 97,1% para las concentraciones de 80, 90 y 100%, respectivamente (Figura 4.b). Hojnik *et al.* (2007) reportaron que al mantener el pH neutro, la enzima clorofilasa (que cataliza la reacción de degradación de la clorofila) se inactiva. Por lo tanto, este valor de pH prolonga el tiempo de conservación del pigmento y evita la formación de compuestos que conlleven a una disminución en su concentración (Taiz y

Zeiger, 2006). Además, se ha encontrado que dicha enzima se activa a pH ácidos y condiciones de estrés (Navarro *et al.*, 1979), razón que explica los bajos niveles de clorofila obtenidos a pH de 6 en comparación con el pH de 7 y 8.

Finalmente, al aumentar la concentración de etanol en el solvente para 40°C, se incrementa la extracción de clorofila en promedio un 82% (Figura 4.a). Esto es debido, a que la clorofila en su estructura química está constituida por dos grandes moléculas: cabeza de porfirina y fitol. El fitol es un alcohol con una cadena de 20 carbonos muy soluble en compuestos como el etanol (Mancilla *et al.*, 2012). En los resultados obtenidos se observa que al usar etanol puro se obtiene los mayores valores de clorofila y rendimiento en la extracción. Sin embargo, en un estudio realizado con hojas de ortiga se obtuvo que al usarse etanol al 90% se logra la mayor concentración. Esto es debido a que a pesar de ser hojas vegetales, se trata de plantas diferentes lo cual explica la diferencia en los resultados.

Con base en lo anterior, se puede decir que las mejores condiciones de extracción del proceso, en el rango de valores utilizado en cada una de las variables estudiadas, son: pH= 7, T= 40°C y etanol puro. A estas condiciones se obtiene el valor más alto de rendimiento (97%), superior al encontrado por Hojnik *et al.* (2007) en el cual se obtuvo un 85%. Sin embargo, para la construcción del proceso mostrado en la siguiente sección, se hará uso de etanol al 90% ya que esto contribuye con la reducción en los costos.

La influencia de las variables analizadas fue corroborada mediante análisis estadístico, obteniendo p-valores= 0 para temperatura y concentración, y de 0,0023 para el pH.

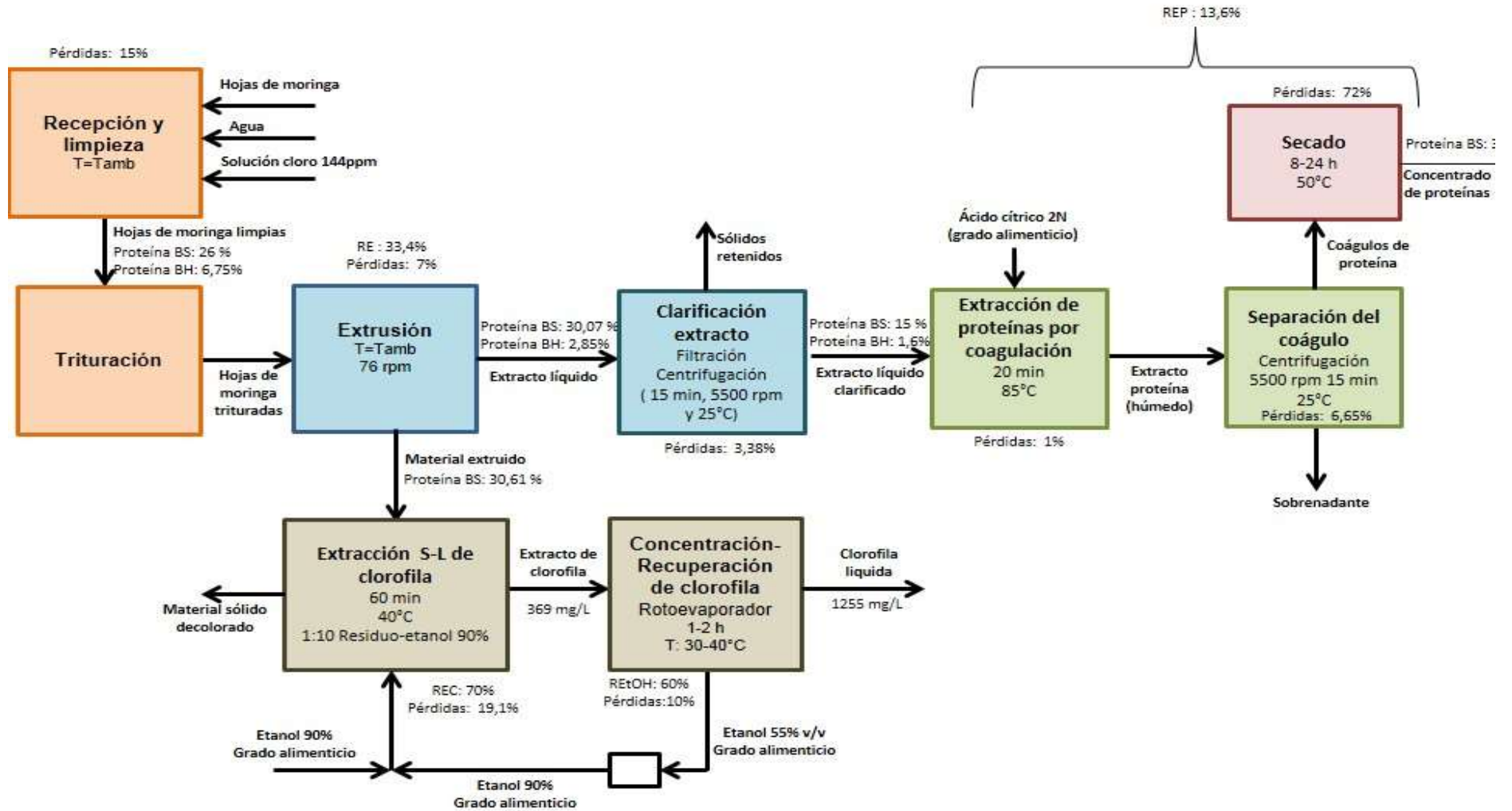
## **2.5. PROPUESTA PRELIMINAR PARA LA IMPLEMENTACIÓN FUTURA DE UNA PLANTA DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y CLOROFILA A PARTIR DE LAS HOJAS DE LA PLANTA *Moringa oleífera*.**

La descripción del proceso que se muestra a continuación (ver Figura 5), se presenta como una propuesta inicial, que hace parte del estudio preliminar para el diseño de una planta procesadora de hojas de *Moringa oleífera* en asocio con la empresa PI-DELTA Construcciones S.A.S. Las condiciones de operación fueron el resultado del análisis previamente realizado en este trabajo. La propuesta se encuentra delimitada a un proceso a pequeña escala (nivel microempresa) y su alcance solo considera el costo de los equipos. Así mismo, tiene como objetivo proporcionar información básica valiosa para futuros proyectos de investigación de mayor inversión enfocados en esta temática, en donde se incluya un análisis técnico y financiero detallado.

**2.5.1. Descripción del proceso.** Corte de las hojas: Los arbustos de *Moringa* se cortan con un tiempo de maduración de 45 días (tiempo de rebrote de las hojas con mayor contenido de proteína) a 1,5 m de altura respecto al suelo, recuperándose las ramas que contienen las hojas.

Recepción y limpieza: El forraje recolectado se pesa en una báscula. Es importante tomar el peso y no su volumen, debido a que esta medida está relacionada con el rendimiento del proceso (Kennedy, 1993). Posteriormente, se realiza el lavado de la materia prima, el cual consiste en un lavado inicial por aspersión manual de agua (25°C), para eliminar restos de tierra y piedras; a continuación, se desinfectan por inmersión (5 min) en una solución de cloro (150ppm) para eliminar microorganismos patógenos (Cuellar y González, 2014) y finalmente, con el propósito de retirar el cloro, éstas se lavan nuevamente con agua.

Figura 5. Diagrama de bloques de la propuesta preliminar del proceso



Trituración: La trituración consiste en la disminución del tamaño de las fibras largas que constituyen el forraje de *Moringa* y con esto facilitar su ingreso a la extrusora. Es así, como se evita que se enreden en el tronillo sin fin del equipo (Kennedy, 1993) (Greiner Packaging, 1997) y permite un mayor aprovechamiento de la materia prima.

Extrusión: En esta etapa se obtiene el extracto líquido por medio de la extrusión de las hojas trituradas. En este proceso, mediante presión sobre las hojas se obtiene, en la parte inferior de la extrusora, un extracto líquido y por la boquilla un material extruido fibroso. Este equipo debe estar provisto de un sistema de enfriamiento que evite el aumento de temperatura del material procesado. Estos productos son la materia prima para la obtención de proteínas y clorofila de las siguientes etapas del proceso.

Clarificación del extracto líquido: El líquido extraído en el proceso de extrusión, se hace pasar por un sistema de filtrado con malla de tela, en el cual se retiran los sólidos que hayan podido pasar de la extrusión. Posteriormente, éste es centrifugado para separar partículas finas en suspensión (15 min, 5500 rpm y 25°C). La eliminación de estas impurezas facilita la extracción de proteínas en la siguiente fase.

Extracción de proteínas por coagulación: El líquido clarificado es mezclado con una solución de ácido cítrico 13% p/v (2N) en una proporción 1:16, con el fin de disminuir el pH del extracto a 4. Seguidamente, el líquido es calentado (85 °C, 20 min) originando que la solubilidad de las proteínas disminuya y se forme un precipitado en forma de coágulos.

Separación del coágulo: Los coágulos se separan de la solución mediante centrifugación (15 min, 3500 rpm y 25°C), obteniendo, una pasta densa formada

por la unión de los coágulos de proteína y por otro lado, un líquido o sobrenadante que por su alto contenido de nutrientes, podría ser destinado a la fertilización del suelo del cultivo de *Moringa oleífera* (líquido neutralizado previamente).

Secado: La pasta rica en proteínas tiene un alto contenido de humedad, la cual se elimina por medio de un proceso de secado en horno deshidratador de bandejas (50°C, 12 h), distribuyendo los precipitados en capas de 1 cm de profundidad. Se obtiene finalmente un producto concentrado en proteína con un porcentaje de 38,5% en BS y humedad del 8%. Este sólido es molido, empacado al vacío en bolsas plásticas de polietileno termoencogible y posteriormente almacenado en un lugar cubierto a temperatura ambiente.

Extracción sólido-líquido de clorofila: A partir del material fibroso proveniente del proceso de extrusión, se realiza la extracción de clorofila utilizando una mezcla 1:10 material extruido-etanol 90% v/v (grado alimenticio) bajo agitación constante y suministro de calor (40°C, 1 h Nota: el tiempo es contabilizado una vez se llegue a la temperatura deseada). La agitación mejora la transferencia de masa por convección de la clorofila proveniente del material extruido hacia el solvente (etanol) (Treybal, 1988). Por otra parte, el aumento de la temperatura favorece la extracción de clorofila; sin embargo, se aconseja que no supere los 60°C porque se empieza a degradar (formación de feofitinas) (Maiocchi y Avanza 2004).

Separación del material sólido decolorado: Al final de la extracción de clorofila, se tiene una mezcla material sólido decolorado-extracto de clorofila, la cual es separada por filtro rotatorio. Después de la separación, se obtiene un extracto líquido rico en clorofila de color verde intenso. El material sólido decolorado será utilizado para la preparación de bloques multinutricionales para cabras (Trabajo de pregrado realizado en paralelo, Prada y Vargas, 2015)

Concentración-recuperación de clorofila: Con el fin de disminuir el volumen de almacenamiento y recuperar el etanol, que será realimentado al proceso, se concentra la clorofila. Este subproceso consiste en el calentamiento del extracto bajo condiciones de vacío (160 mbar, a 30-40°C, durante 1h) y así recuperar un 60% aprox. de etanol que ingresó al proceso (pruebas preliminares). El producto final es un concentrado de clorofila con 1255 mg/L, el cual es empacado en tubos ámbar para evitar su decoloración y posteriormente almacenado en un lugar con ventilación y protegidos de la luz.

**2.5.2. Capacidad.** La capacidad de la planta procesadora se determinó teniendo en cuenta la producción de las hojas de *Moringa oleífera* de la finca propiedad de la empresa PI-DELTA Construcciones S.A.S, en Sabana de torres, Santander. La finca cuenta con 3 Ha cultivadas de *Moringa*. Actualmente, cada hectárea posee 12 000 arbustos. Se tomó el total del cultivo como base de suministro de materia prima al proceso. Sin embargo, la empresa tiene como meta de crecimiento aumentar la densidad de plantación en un 33% aprox, lo cual representaría 16 000 plantas/Ha. Teniendo en cuenta lo anterior, los equipos (ver Anexo 3) tendrán la capacidad de procesar tanto la producción actual de *Moringa* como su proyección.

Se propone que el modo de operación del proceso sea tipo *batch* y se trabaje durante 6 días a la semana con un turno diario de 8h. Las 3 Ha de terreno se dividirán en 6 lotes para asegurar la poda de un lote por semana; una vez transcurridas 6 semanas, los primeros arbustos podados ya estarán listos para su nuevo corte, asegurando un periodo de maduración de los brotes de 45 días. Esto representa la poda de 1 000 plantas/día.

Es muy importante tener en cuenta que cada planta produce un promedio de 590 g de forraje, lo cual indica un total de 590 kg hojas/día a procesar. De esta cantidad de materia prima se obtiene 1 kg/día de concentrado de proteína y cerca de 160 kg/día de concentrado de clorofila. Es importante mencionar que los rendimientos utilizados para cada una de las etapas fueron los obtenidos

experimentalmente a escala de laboratorio. El balance de masa se encuentra en el Anexo 1.

**2.5.3. Selección de los equipos.** Las dimensiones de los equipos tienen en cuenta la capacidad de la planta procesadora (590 kg hojas/día de forraje de *Moringa oleífera*). Sin embargo, su tamaño fue escogido con el propósito de permitir duplicar su procesamiento (a 1180kg hojas/día). Esto permitirá a la empresa aumentar su producción con los mismos equipos (utilizándolos durante más tiempo en el día y aumentando el personal requerido). La distribución de la planta se estableció teniendo en cuenta el decreto 3075 de 1997 de las buenas prácticas de manufactura para industrias que elaboran productos alimenticios. En el cual se establece que la distribución de la planta debe incluir una transformación de las materias primas, de tal forma que estas no se devuelvan durante el proceso para evitar la contaminación cruzada. Además se realizó la cotización del precio de los equipos, con el fin de tener un estimativo de la inversión requerida por este concepto. Los precios y especificaciones de los equipos se encuentran en la Anexo 3. Con las cotizaciones se pudo identificar, que existe la tecnología para llevar a cabo cada una de las etapas del proyecto. Por otra parte, las capacidades seleccionadas para cada uno de los equipos indican, que estos al ser usados con mayor frecuencia pueden procesar más del 100% de la capacidad planteada. Es por esto, que se recomienda a la empresa PI-DELTA Construcciones S.A.S, aumentar el terreno cultivado con el fin de reducir los costos de elaboración de los productos al producirse más, sin invertir en equipos.

Con base en la propuesta del proceso se identificó que el costo total de los equipos fue de \$122.260.000. Este valor se encuentra dentro de lo establecido para ser denominado microempresa según el valor en activos totales (500 SMMLV) (Ministerio de Industria y Comercio, 2013) y su inversión es cercana a la de una microempresa productora de quesos en la cual se estima una inversión en equipos de \$116.478.000 (Parra, 2004). Se puede decir que este proyecto

podría tener financiación por parte de la red de “inversionistas ángel” integrada por empresas como: Fundación Bavaria, iNNpalsa, el Banco Interamericano de Desarrollo y la unidad del gobierno que apoya la innovación y el emprendimiento. Esta alianza permite una financiación desde 200 a 1000 millones de pesos (CM&, 2014).

Sin embargo, la inversión que se requiere es elevada teniendo en cuenta que solo se consideraron los equipos. Es por esto, que es necesario seguir estudiando las tecnologías propuestas y de esta manera disminuirían los costos fijos y se haría viable la implementación de la planta productora de concentrados de proteína y de clorofila a partir de las hojas de *Moringa oleífera*.

### 3. CONCLUSIONES

- Se evaluó por primera vez el proceso de extrusión como método para la extracción de proteínas a partir de las hojas de *Moringa oleífera*. Se encontró que el rendimiento de esta operación fue de 33,4%, con el cual se obtuvo un líquido de  $90\pm 0,73\%$  de humedad y  $28,80\pm 0,72\%$  de proteína en BS; contenido dependiente de la edad de las hojas.
- Se estudió el método de recuperación de proteínas por medio de coagulación térmica en combinación con precipitación ácida y se logró extraer proteína de las hojas de *Moringa* con una concentración de  $38,5\pm 0,6\%$  en BS a  $85^{\circ}\text{C}$  y pH de 4,0. Se incrementó en 2,5 veces el contenido proteico del extracto clarificado y 1,45 veces el de las hojas de *Moringa oleífera*.
- Se realizó una extracción Sólido-Líquido de clorofila a partir del residuo extruido como medio de valorización de este subproducto. Se encontró que las mejores condiciones de operación para la extracción fueron  $85^{\circ}\text{C}$ , pH 7 y concentración de etanol 100% obteniéndose un concentrado de clorofila de 421 mg/L. El rendimiento de extracción de este proceso fue de 97%. La anterior información es importante debido a que no existe reporte a la fecha de estudios relacionados para la extracción de clorofila de hojas de *Moringa oleífera*.
- Se determinaron los costos de los posibles equipos requeridos para la producción de concentrados de proteína y clorofila a partir de las hojas de *Moringa* a pequeña escala (590 kg/día), con una inversión en equipos de \$122 260 000. Esta primera aproximación para el diseño del proceso muestra la existencia de equipos que ya se encuentran en el mercado colombiano y que podrían ser financiados por diferentes entidades nacionales que apoyan el emprendimiento.

#### 4. TRABAJOS FUTUROS

- Realizar la optimización de las variables estudiadas en cada una de las etapas (temperatura, pH, y concentración de disolvente), con el objetivo de mejorar la eficiencia de cada una de las etapas estudiadas.
- Realizar el diseño y dimensionamiento de la extractora, ajustándola a las condiciones específicas de procesamiento de hojas de *Moringa oleífera*, con el fin de incrementar el rendimiento de extracción.
- Evaluar nuevas tecnologías de transformación, incluyendo dentro del análisis el consumo de energía para cada etapa del proceso, con el propósito de aumentar los rendimientos y reducir costos de producción en *batch*.
- Realizar estudios experimentales sobre los dos productos obtenidos con el fin evaluar su estabilidad y conservación en el tiempo, y posibles aplicaciones en la formulación de distintos productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos; complementado con un estudio de mercado para estas aplicaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

ALETOR, O., OSHODI, A., IPINMOROTI, K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chemistry*, 78 (1), 2001, Pag 63–68.

ALFARO, N & MARTÍNEZ, W. Uso potencial de la Moringa (*Moringa oleífera*) para la producción de alimentos nutricionalmente mejorados. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Guatemala, 2008.

ÁVILA, E. Fuentes de energía y proteínas para la alimentación de las aves. Departamento de avicultura. Instituto Nacional de Investigación Pecuaria. 1978.

AYERSA, R. Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleífera Lam.*) growing in the Arid Chaco of Argentina. *Industrial Crops and Products*, 33 (2) 2011, pag 389–394.

BAILEY, J. *Techniques in Protein Chemistry*, 2a ed. Amsterdam, Elsevier, 1967.

BOO, H., HWANG, S., BAE, C., PARQUE, S., HEO, B., GORINSTEIN, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, 40 (5), 2012, Pag 129-135

BORGES, E., CARVALHO, M., NEVES, V., APARECI. M., ARANTES, L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleífera Lam.* leaves. *Food Chemistry*, 147 (15) 2014, pag 51–54.

BYERS, M. Extraction of protein from some plants growing in Ghana. *Journal of the Science of Food and agriculture*, 22 (8), 1961. pag 20-30.

CARRANCO, M, CASTILLO, R, ESCAMILLA, A, MARTÍNEZ, M, PÉREZ, F, STEPHAN, E. Composición química, extracción de proteína foliar y perfil de

aminoácidos de siete plantas acuáticas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 36 (3), 2002, pag 247-258.

CHIESA, E & GNANSOUNOU, E. Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery – Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. Bioresource Technology 102,(2), 2011, Pag 427–436.

CITTADINI, M., ALMENAR, L., SCAGLIARINI, S., VALLONE, R., HERGUIS, M. La soja y la seguridad alimentaria. Departamento de Evaluación Técnica INALANMAT, 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. Norma general del Codex para los productos proteínicos vegetales, Codex Stan 174, 1989. 2004, 1p.

COLAS, D., DOUMENG, C., PONTALIER, PY., RIGAL, L. Twin-screw extrusion technology, an original solution for the extraction of proteins from alfalfa (*Medicago sativa*). Food and Bioproducts Processing, 91 (2) ( 2013), pag 175-182.

CONTRERAS, C., GAYARDO, Y., CRUZ, Y. Extracción de proteína de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) por diferentes métodos. Instituto Politécnico Nacional. México, 2006.

CORTÉS, A & GALLARDO, D. Obtención de Concentrados Proteicos a Partir de Alfalfa (*Medicago sativa*). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, 2005.

CORZO, L., CHEL, L., BETANCUR, D. Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. Tecnol. Ciencia E. (IMIQ) 15,(1), 2000. pag 37-41.

CUELLAR, M & GONZÁLEZ, S. Apliquemos las buenas prácticas de manufactura. Centro de Desarrollo Productivo de Alimentos. 2014.

DELGADO, R., GALLARDO, L., HORNERO, D. Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. Food Research International, 2014.

FAHEY, J. *Moringa oleífera*: Una revisión de la evidencia médica para sus nutricionales, terapéuticas y profilácticas en Propiedades. Parte 1. Escuela de Medicina Johns Hopkins, Departamento de Farmacología y Ciencias Moleculares, Lewis B. y Dorothy Cullman Cáncer quimioprotección Center, 725 N. Wolfe Street, 406 WBSB, Baltimore, Maryland, EE.UU. 21205-2185. 2005

FALASCA, S & BERNABÉ, M. Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de *Moringa oleífera* en Argentina. Revista Virtual REDESMA. marzo 2008.

FAO. Inocuidad y comercio de la harina de pescado. Octava reunión del comité de pesca. Febrero 2002.

FIRDAOUS, L., DHULSER, P., AMIOT, J., GAUDREAU, A., LECOUTURIER, D., KAPEL, R., LUTIN, F., VÉZINA, L., BAZINET. Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. Sci. 329 (1-2), 2000. pag 60-67.

FURLÁN, L., RINALDONI, A., PÉREZ, A. Campderrós. Análisis comparativo de propiedades funcionales de concentrados proteicos obtenidos por ultrafiltración. Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas (INTEQUI-CONICET). Argentina (2013)

GÓMEZ, A. Estudio etnobotánico en el término municipal de Santa Olalla del cala (Sierra de Sracena, Huelva). Tesis de grado para Máster en zootecnia y

gestión sostenible: ganadería ecológica e integrada. Universidad de Córdoba. Diciembre 2011.

GONZÁLEZ, I. Caracterización química del color de diferentes variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) colombiana. Tesis de grado (Magister Ciencia-Química), Colombia: Universidad Nacional de Colombia (2010).

GUO, R., PANG, S., WANG, K. Studies of the alkali and enzyme methods for rice protein extraction and the comparison of their functionalities. *Shing Kexue*, 26 (4), 2005. pag 173-177.

GOVARDHAN, S., PRADEEP, S., RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Functional Foods* 5 (4),2013, Pag 1883–1891.

HOJNIK, M, SKERGET, M, KNEZ, Z. Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Separation and Purification Technology*, 57 (1) ,2007, Pag 37–46.

KAISER, A., KAMMERER, D., CARLE, R. Impact of blanching on polyphenol stability and antioxidant capacity of innovative coriander (*Coriandrum sativum* L.) pastes. *Food Chemistry*, 140,(1–2). 2013, Pag 332–339.

KENNEDY, D. El concentrado de hoja verde: un manual práctico. Organización hojas para la vida. 1993.

LAMPSAN, B., KOEGEL, R., GUNASEKARAN, S. Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf protein. *LWT* 40 (2007), pag 1520-1526.

MAIOCCHI, M., AVANZA, J. Degradación de clorofila y feofitinas a diferentes temperaturas en *Ilex dumosa* e *Ilex paraguariensis*. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste. 2004.

MALDONADO, A., ECHEVARRÍA, S., JEAN, S., HERNÁNDEZ, M., JORRÍN. J. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 71 (4) (2008), pag 461–472.

MANCILLA, C., CASTREJON, C., ROSAS, T., BLANCO, E., PÉREZ, S. Extracción y separación de pigmentos vegetales. Universidad del Valle de México. 2012.

MARTÍNEZ, J., CARBALLO, A., ROCHA, L. Valoración de las propiedades nutricionales de *Moringa oleífera* en el departamento de bolívar. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle. 2011.

MCQUINSTAN, T., SIMONICH, M., PRATT, M., PEREIRA, C., HENDRICKS, J., DASHWOOD, R., WILLIAMS, D., BAILEY, G. Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2), 2012, Pag 341–352.

MEJÍA, C., MACAVILCA, E., VELÁSQUEZ, J., PALACIOS, B., GARCÍA, L. Formulation and evaluation of cookies enriched with micronutrient and animal and plant protein. *Revista Infinitum de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrió, Perú*, 3 (2), (2013).

MELENDEZ, A, VICARIO, I, HEREDIA, F. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (7), 2007, Pag 638–649.

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y COMERCIO. Reporte de Mipymes No 3. Viceministerio de Desarrollo Empresarial. Dirección de Mipymes. 2013, pag 3.

MOLINA, V. Extracción de proteína foliar de maíz a los 10, 25 y 40 días de la siembra y análisis de sus aminoácidos. Tesis de grado (Ingeniería Agroindustrial), Honduras: Universidad de Zamorano (2005).

MUNIVE, P. Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizados de soya y almidón de maíz. Tesis de grado (Ingeniería Agroindustrial), Quito: Escuela Politécnica Nacional. Julio 2009.

NAVARRO, S., GARCÍA, A., GALINDO, L. Clorofilasa en hojas de citrus. I. Extracción, medidas y factores que influyen en la actividad de la enzima. Universidad de Murcia. 1979.

NELSON, M & RAU, M. Moringa: la ciencia tras el árbol milagroso. Universidad de Zaragoza. 2012.

NEWMAN, V., FAERBER, S., ZOUMAS, C., ROCK, C. Amount of Raw Vegetables and Fruits Needed to Yield 1 C Juice. Journal of the American Dietetic Association, 102 (7), 2002, Pag 975–977.

PARRA, C. Elaboración de un plan de negocios para la creación de una microempresa productora de quesos en la ciudad de Tunja. Tesis de grado (Ingeniería Industrial), Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. 2004

PÉREZ, A., SÁNCHEZ, T., ARMENGOL, N., REYES, F. Characteristics and potential of *Moringa oleífera*, Lamark An alternative for animal feeding. Pastos y Forrajes. 33 (4), 2010.

PONTUAL, E., CARVALHO, B., BEZERRA, R., COELHO, L., NAPOLEÃO T., PAIVA, P. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleífera* flowers. Food Chemistry, 135 (3), 2012, pag 1848–1854.

PRADA, V & VARGAS, L. Estudio de la formulación de un bloque multinutricional (BM) dirigido a la alimentación de caprinos para la empresa PROMITEC SANTANDER S.A.S. Tesis de grado (Ingeniería Química), Colombia: Universidad Industrial de Santander. 2015.

QUINTAJA, J & ALVARADO, A. Condiciones para la precipitación de proteína foliar a partir de la *Moringa oleífera*. Tesis de grado (Ingeniería de Alimentos), Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. Barranquilla, 2013.

RASHID, U., ANWAR, F., ASHARF, M., SALEEN, M., YUSUP, S. Application of response surface methodology for optimizing transesterification of *Moringa oleífera* oil. Biodiesel production. Energy Conversion and Management 52, (8–9), 2011, Pag 3034–3042.

REEDS, P. Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. J.Nutr. 130: 1835S – 1840S, 2000.

ROMERO, N., COMERÓN, E., USTARROZ, E. Manejo y utilización de la Alfalfa. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 1995.

SANCHINELLI, V. Contenido de proteína y aminoácidos, y generación de descriptores sensoriales de los tallos, hojas y flores de *Moringa oleífera* Lamark (Moringaceae) cultivada en Guatemala. Tesis de grado (Nutrición), Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Marzo (2004).

SERPA, A., HINCAPIE, G., ÁLVAREZ, C. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presente en cuatro fuentes foliares: Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), Variedades verónica y tai jatropa (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*) Grupo de Investigaciones Agroindustriales, Medellín, 2014.

SHEN, L., XIOANGYANG, W., ZHONGYING, W., YUANFENG, W., CHEN, J. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry* 107 (2), 2008, Pag 929–938.

SHEORAN, I., ROSS, A., OLSON, D., SAWHNEY, V. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science*, 176, (1), 2009, Pag 99–104.

SHOEFS, E. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography*, 1054, (1–2), 2004, Pag 217–226.

SINGH, R., NEGI P., RADHA C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleífera* seed flour. *Journal of Functional Foods*, 5 (4), 2013, pag 1883–1891.

TAIZ, L & ZEIGER, E. *Fisiología vegetal*. Volúmen 1. Castelló de la plana. 2006, Pag 260.

TANGKA, J. A comparative analysis of the energy requirements for the extraction of leaf protein concentrate from five Nigerian plant species. Tesis de doctorado. Departamento de ingeniería de agricultura. Universidad de Ibadan, Nigeria, 1995.

TANGKA, J. Analysis of the Thermal Energy Requirements for the Extraction of Leaf Protein Concentrate from some Green Plants. *Biosystems Engineering* 86 (4), 2003, pag 473–479.

TREYBAL, R. *Operaciones de transferencia de masa*. 2da edición. (1988). Pág.23.

URRIBARRÍ C., Ferrer O, Colina, A. Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott)

Revista de la Facultad de Agronomía, Isoversión impresa ISSN 0378-7818. 2004.

VÁZQUEZ, F & CANO, M. Precipitación de Proteínas Séricas de la Leche Acidificando el Suero Natural y Artificialmente con Ácido Cítrico. Universidad de Guanajuato (Ingeniería de Alimentos). 2007.

WALLACE, P. MARFO, E., PLAHAR, W. Nutritional quality and antinutritional composition of four non-conventional leafy vegetables. Food Chemistry 61(3), 1998, pag 287–291.

YONG, S & LAY, H. Method development for analysis of proteins extracted from the leaves of *Orthosiphon aristatus*. Journal of Chromatography, 879, ( 22), 2011, Pag 2179–2183.

ZANIN, V. Un nuevo concepto nutricional para el ser humano: Extracto foliar de alfalfa. Asociación para la promoción de los extractos foliares en nutrición. Octubre, 1998.

ZEITOUN, R., PRONTALIER, P., MARECHA, P., RIGAL, L. Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: influence on extract purity and purification performance. Bioresour. Technol. 101 (23), 2010, pag 9348-9354.

ZHONGFU, N., KIM, E., CHEN, Z. Ensayos de clorofila y almidón, exchange protocol. Universidad de Texas en Austin, 2009.

# **ANEXOS**

## ANEXO A. BALANCE DE MASA DEL PROCESO PROPUESTO.

Tabla A. Balance de masa del proceso propuesto en kg/día

PROCESO	ENTRADA		SALIDA		Pérdidas		Ren [%]
	Masa total [kg]	Proteína [kg]	Masa total [kg]	Proteína [kg]	%	kg	
<b>Recepción y limpieza</b>	8390	39,8	8301,5	33,9	15	1258,5	
Hojas de <i>Moringa</i>	590	39,8	-	-			
Hojas de <i>Moringa</i> limpias	-	-	501,5	33,9			
Agua	4200	0	4200	0			
Solución cloro 144 ppm	3600	0	3600	0			
<b>Trituración</b>	501,5	33,9	499,6	33,7	0,4	1,9	
Hojas de <i>Moringa</i> limpias	501,5	33,9	-	-			
Hojas de <i>Moringa</i> trituradas	-	-	499,6	33,7			
<b>Extrusión</b>	499,6	33,7	464,6	33,4	7	35,0	33,4
Hojas de <i>Moringa</i> trituradas	499,6	33,7	-	-			
Extracto líquido	-	-	166,9	4,2	7		33,4
Residuo sólido	-	-	297,8	29,2			
<b>Clarificación del extracto</b>	166,9	4,2	161,2	2,4	3,38	5,6	
Extracto líquido	166,9	4,2	-	-			
Extracto líquido clarificado	-	-	161,2	2,4			
<b>Extracción de proteínas por coagulación</b>	171,1	2,4	169,4	2,4	1	1,7	13,6
Extracto líquido clarificado	161,2	2,4	-	-			
Ácido cítrico	9,8	0,0	-	-			
Extracto de proteínas (Húmedo)	-	-	169,4	2,4			
<b>Separación de los coágulos</b>	169,4	2,4	158,2	2,4	6,65	11,3	
Extracto de proteínas (Húmedo)	169,4	2,4	-	-			
Coágulos de proteínas	-	-	3,7	0,4			
Sobrenadante	-	-	154,5	2,0			
<b>Secado</b>	3,7	0,4	1,0	0,4	72	2,6	
Coágulos de proteínas	3,7	0,4	-	-			
Concentrado de proteínas	-	-	1,0	0,4			
<b>Extracción L-L de clorofila</b>	1637,7	29,2	1320,0	0,0	19,4	317,7	70
Residuo sólido	148,9	29,2	-	-			
Etanol 90%	1488,8	0,0	-	-			
Residuo decolorado	-	-	148,9	0,0			
Extracto de clorofila	-	-	1171,1	0,0			
<b>Concentración de clorofila</b>	1171,1	0,0	2107,9	0,0	10,0	234,2	60
Extracto de clorofila	1171,1	0,0	-	-			
Etanol 90%	-	-	893,6	0,0			60
Clorofila concentrada	-	-	160,7	0,0			

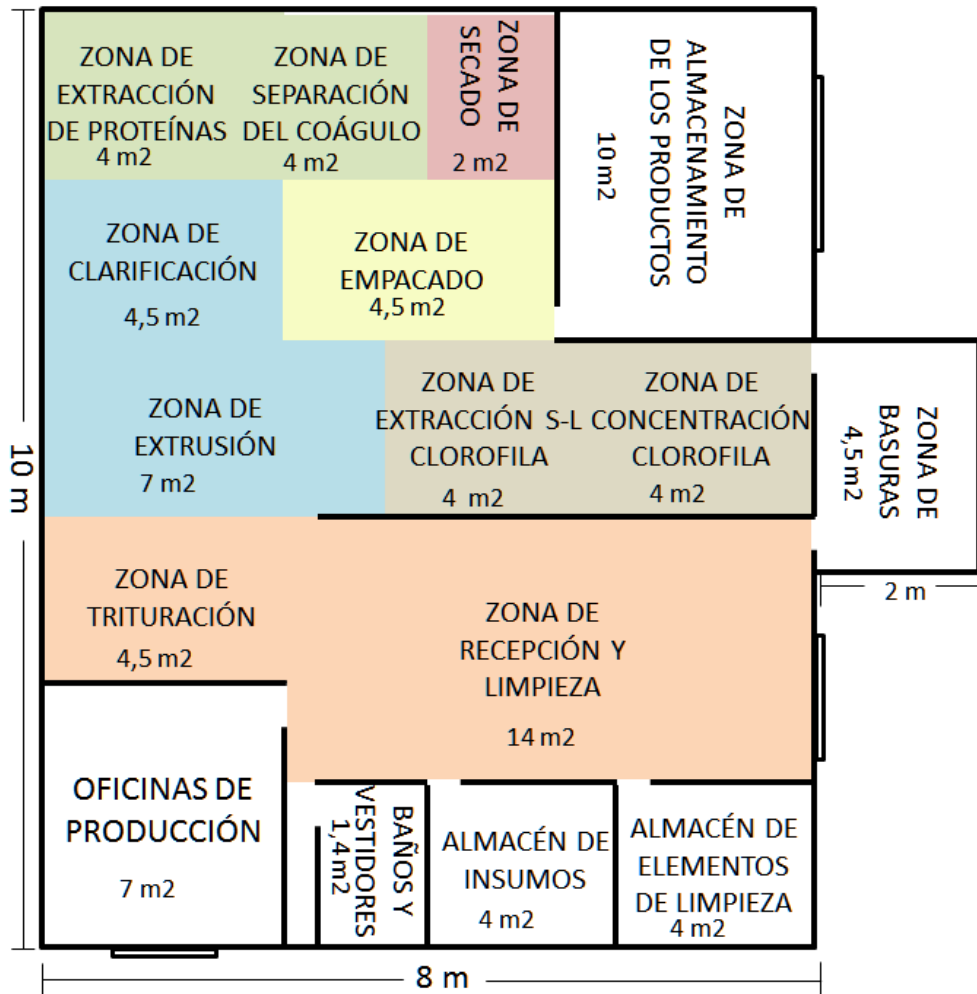
- No aplica para esta corriente, ya sea porque no hay entrada o salida

En la anterior tabla se presenta el balance de masa del proceso (Tabla A) tomando como base de procesamiento 590 kg/día de hojas de *Moringa*. El balance se realizó en cantidades por días, debido a que de esta forma se facilita la comprensión en la selección del tamaño de los equipos.

En el balance se observa que después de la extrusión, todo el extracto líquido obtenido es destinado a la recuperación de proteínas, mientras que el residuo extruido no se utiliza en su totalidad para la extracción de clorofila. De este residuo el 50% es dirigido a la extracción de clorofila, el 25% para la elaboración de bloques nutricionales destinados a la alimentación animal (Prada y Vargas, 2015) y el 25% restante como alimento directo para animales (ganado vacuno).

## ANEXO B. PLANO DE DISTRIBUCIÓN.

Figura A. Plano de distribución de la planta productora de concentrados de proteína y clorofila propuesta a partir de hojas de *Moringa*.



## ANEXO C. EQUIPOS

**Tabla B. Especificaciones y precios de los equipos.**

Proveedor	Equipo	ESPECIFICACIONES			Precio [COP]
		Descripción	Capacidad	Material y dimensiones	
Santandereana de básculas	Báscula	Electrónica digital de batería recargable, marca TEK. Cargar 8h, duración carga 3 días. Display LED con teclado numérico.	150 kg	Plataforma (30x40 cm) cubierta en acero inoxidable REF 403. Pedestal tubo cromado de 60 cm	160 000
Penagos	Triturador de forraje	Marca TRAPP, REF TRP40, provista de dos Láminas de corte tipo cuchilla (3600 rpm). Motor monofásico, selector de voltaje 110-120 V	200 kg/h	Cuchillas y soporte en acero	750 000
Diseño Mecánico y Mejoramiento Industrial (DMMI) Ltda	Extrusora	Extrusora con sistema de enfriamiento, potencia nominal de 50 hp, 76 rpm. Eje y caracoles en forma interna hexagonal.	500 kg/h	Caracoles en acero con propiedad de alta resistencia al desgaste	45 000 000
Inal	Centrífuga	Centrífuga de Bowl de doce puntas	1000 l/h	Acero inoxidable	28 000 000
Diseño Mecánico y Mejoramiento Industrial (DMMI) Ltda	Molino de bolas	Molino de 15 kg de 72 rpm, 1,8 hp y motor marca Toshiba	3 kg/h	Piezas en acero inoxidable 304	3 250 000
Fullhouse	Tanque recolector	2 unidades.	200 L	Acero inoxidable	800 000
Fullhouse	Tanque recolector	2 unidades	1000 L	Acero inoxidable	3 000 000
Fullhouse	Filtro rotatorio	Provisto de una malla 100 (0,149 mm)	8 L/s	Malla en acero inoxidable	2 500 000
Diseño Mecánico y Mejoramiento Industrial (DMMI) Ltda	Evaporador-concentrador por reducción de presión	Evaporador con Presión de vapor de 20 Mpa, y grado de vacío de 0,08 Mpa y con enfriador tipo bobina	15 m <sup>3</sup>	Acero inoxidable. Dimensiones: largo 1,2 m; profundo 0,6 m; ancho 2,2 m.	14 000 000

Citalsa	Empacadora al vacío	Empacadora eléctrica SV-310T marca Sammic de 34 kg y temporizador del vacío Barra de sellado de 314 mm	10 m3/h	Acero inoxidable Dimensiones Externas: ancho 384 mm, profundo 455 mm y alto 405 mm Internas: Ancho 330 mm, ancho 360 mm y alto 140 mm	7 000 000
Proveedor	Equipo	ESPECIFICACIONES			Precio [COP]
		Descripción	Capacidad	Material y dimensiones	
Fullhouse	Marmita 1	Marmita con agitación inicial (5 min) y sistema de calentamiento con aceite. Válvula de salida lateral I. Control automático digital de temperatura y movimiento.	76 L	Acero inoxidable REF 304	4 500 000
Fullhouse	Marmita 2	Marmita con agitación constante y sistema de calentamiento. Válvula de salida lateral. Control automático digital de temperatura y movimiento.	400 L	Acero inoxidable REF 304.	9 500 000
Fullhouse	Horno	Horno deshidratador de bandejas. Control de temperatura digital 1200 w.	10 bandejas	Acero inoxidable REF 304 calibre 30. Medidas: alto 1 m, ancho 50 cm, largo 60 cm.	3 500 000
VANagro	Elementos menores	Mangueras, Pistola de riego, Canastas, bolsas de polietileno termoencogibles, tubos ambar			300 000
<b>TOTAL</b>					<b>122 260 000</b>