

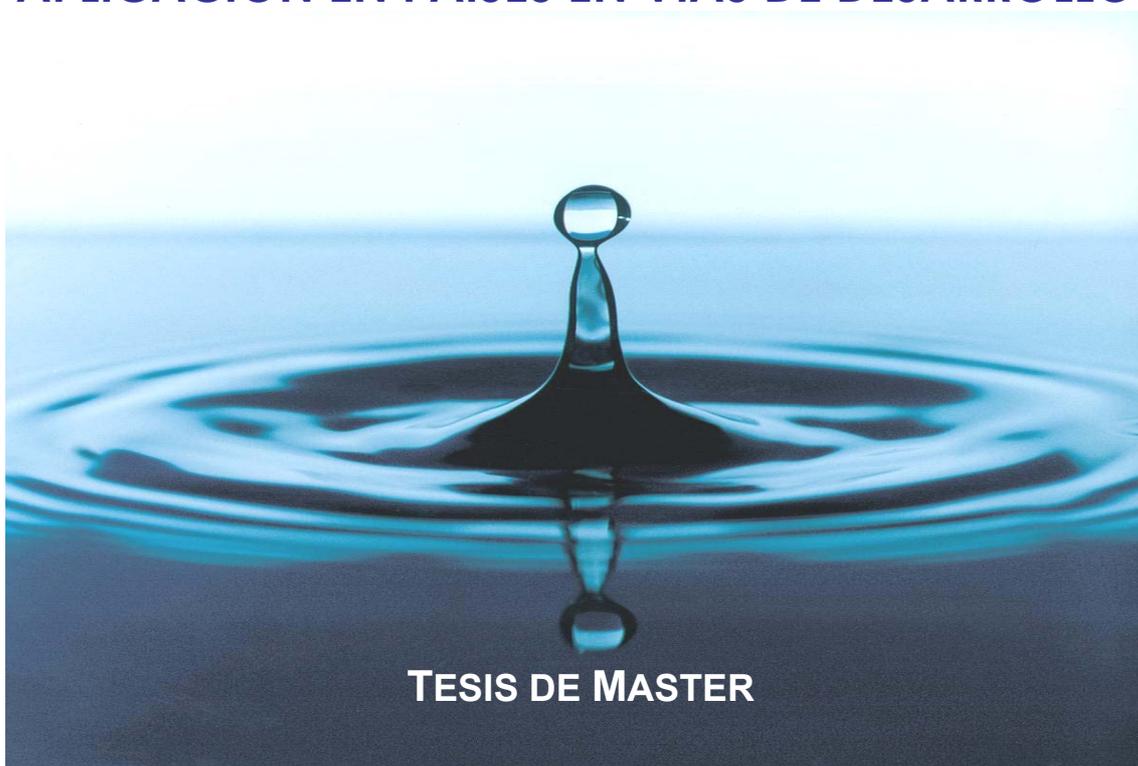


UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



isiry | Instituto de Seguridad Industrial,
Radiofísica y Medioambiental

METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN IN SITU DE COAGULANTES NATURALES PARA LA CLARIFICACIÓN DE AGUA SUPERFICIAL. APLICACIÓN EN PAISES EN VIAS DE DESARROLLO



TESIS DE MASTER

Master en Seguridad Industrial y Medioambiente

Autora: **BEATRIZ GARCÍA FAYOS**

Director: **Dr. JOSE MIGUEL ARNAL ARNAL**

VALENCIA, 13 de Diciembre de 2007

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director del trabajo de investigación José Miguel Arnal Arnal, el apoyo y dedicación recibidos, así como los consejos que han permitido llevar a buen puerto este trabajo. Gracias, Miguel por creer desde el principio y por haberme enseñado a que cada día, la mirada de los niños me sirva de inspiración y motivación, ahora se que otro mundo es posible y que queda mucho por hacer.

A mis padres y a mi hermana Inma, por ser sufridores y admiradores del camino elegido, por su apoyo en todo momento, y por ayudarme a ser cada día mejor persona. El orgullo de los hijos son sus padres, gracias.

A Marcos, mi cariñoso sufridor, por estar conmigo siempre y por haber apoyado mis decisiones desde el momento que elegí este camino, siempre estas a mi lado, gracias.

A mi familia y amigos, especialmente a Cristina, Ade, Laura, María y Arancha, por estar siempre a mi lado incluso en la distancia, por su apoyo, comprensión y su ánimo en los momentos más difíciles.

A Laura Moreno y a Luis Crespo por la ayuda incondicional que mostráis siempre, por la ilusión, por las largas horas de montaje en Náquera y en el laboratorio, por los buenos ratos, nada habría salido adelante sin vuestra ayuda.

A toda la gente del Ayuntamiento de Náquera, especialmente al alcalde Ricardo Arnal, a Paco Arnal, a Manolo Arnal y a Damián Ibáñez por haberme tratado siempre como una más, por creer en AQUAPOT desde el principio, y por ser testigos y en ocasiones sufridores de su evolución y sus logros, gracias por vuestro apoyo y excelente trabajo.

A toda la gente de Ecuador y Mozambique, especialmente al padre Cléver y al padre Vicente Berenguer, por todo el apoyo y cariño recibidos, por haberme hecho sentir como en casa durante toda la estancia, por vuestra dedicación y por haberme permitido descubrir valores que ya creía olvidados, especialmente en Pucará y en Ressano García, admiro vuestro difícil trabajo.

A toda la gente del Instituto ISIRYM y del Departamento de Ingeniería Química y Nuclear de la UPV, por el apoyo e interés mostrado durante la realización del presente trabajo.

A la Dra. Gunnel Dalhammar, Dra. Gunna K. Rajarao y Kebreah Ghebremichael por haberme iniciado en el mundo científico, por sembrar en mi la semilla del interés en la ciencia y en la investigación, por vuestros consejos y sugerencias, Tack så mycket!

Valencia, 13 de Diciembre de 2007

Det är en tillgång att kunna
glädjas åt det lilla

La felicidad no es siempre hacer lo que se quiere,
sino querer lo que se hace

Anónimo

INDICE

PRÓLOGO	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El agua en el mundo.....	3
1.2 La situación del agua potable en los países en vías de desarrollo.....	3
1.3 Técnicas de potabilización convencional.....	5
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Coagulantes naturales.....	11
3. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN	17
3.1 Objetivo.....	17
3.2 Justificación del trabajo.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Fundamento de las técnicas utilizadas.....	19
4.1.1 Cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel.....	19
4.1.2 Determinación del contenido proteico por medida de la absorbancia.....	19
4.1.3 Método Bradford.....	20
4.1.4 Cromatografía de intercambio iónico.....	20
4.1.5 Electroforesis nativa y desnaturalizante.....	22
4.2 Metodología experimental.....	23
4.2.1 Obtención del coagulante crudo primario.....	24
4.2.2 Test de actividad coagulante primaria.....	26
4.2.3 Determinación de los parámetros de operación de los extractos crudos.....	28
4.2.4 Protocolo de purificación del compuesto activo.....	28
4.2.4.1 Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel....	28

4.2.4.2 Determinación del contenido de proteína del extracto crudo (Método Bradford).....	29
4.2.4.3 Concentración.....	29
4.2.4.4 Purificación por cromatografía de intercambio iónico (CIE).....	30
4.2.5 Identificación y caracterización de la proteína activa.....	31
4.2.5.1 Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.....	31
4.2.5.2 Protocolo de gel nativo.....	35
4.2.6 Evaluación de las propiedades antimicrobianas del extracto.....	37
4.2.6.1 Test de crecimiento.....	38
4.2.6.2 Test de agrupación celular (“Clumping test”).....	40
4.3 Metodología de la aplicación real.....	41
4.3.1 Protocolo para la obtención del compuesto activo.....	41
4.3.2 Estudio de las propiedades coagulantes.....	43
4.3.3 Estudio de las propiedades antimicrobianas.....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Estudio comparativo inicial.....	47
5.1.1 Test de actividad coagulante primaria para extractos crudos acuosos y salinos.....	47
5.1.2 Test de actividad para los extractos crudos acuosos y salinos diluidos.....	49
5.1.3 Test de actividad de diferentes variedades de <i>Zea mays</i>	52
5.1.4 Análisis de la evolución de la sedimentación.....	54
5.1.5 Análisis de la influencia de la temperatura en los compuestos activos.....	55
5.1.6 Estudio del método de conservación de los extractos crudos.....	56
5.1.7 Conclusiones del estudio comparativo inicial.....	58
5.2 Purificación del compuesto activo.....	59

5.2.1 Resultados del acondicionamiento del ECS mediante cromatografía de filtración en gel.....	59
5.2.2 Purificación del coagulante activo por cromatografía de intercambio iónico.....	62
5.2.3 Caracterización e identificación del compuesto activo: Electroforesis en geles SDS-PAGE y Protocolo Nativo Ácido.....	66
5.2.3.1 SDS-PAGE.....	66
5.2.3.2 Protocolo Nativo Ácido.....	68
5.2.4 Conclusiones de la purificación del compuesto activo.....	71
5.3 Test Antimicrobiano.....	71
5.3.1 Test de crecimiento.....	71
5.3.2 Test de formación de flóculos celulares (“clumping”).....	80
5.3.3 Conclusiones del test antimicrobiano.....	83
5.4 Resultados de la aplicación real.....	83
5.4.1 Test de actividad coagulante.....	83
5.4.2 Test antimicrobiano.....	85
5.4.3 Conclusiones de la aplicación real.....	86
6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	87
6.1 Alubia roja.....	87
6.2 Maíz dulce.....	88
6.3 Maíz rojo.....	89
7. CONCLUSIONES.....	91
8. LINEAS FUTURAS DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.....	93
9. REFERENCIAS.....	95
ANEJOS	
ANEJO I. Notación.....	I

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Niños consumiendo agua sin tratamiento previo.....	5
Figura 1.2. Secuencia de un tratamiento convencional de potabilización de agua.....	6
Figura 2.1. Árbol <i>Moringa Oleifera</i> . Semilla de <i>Moringa Oleifera</i>	13
Figura 2.2. Comparación entre muestras de agua cruda y tratada con <i>M. Oleifera</i>	14
Figura 4.1. Fundamento de la cromatografía de intercambio iónico.....	21
Figura 4.2. Efecto desnaturalizante del DSS sobre la estructura de la proteína.....	22
Figura 4.3. Esquema de la metodología de identificación y purificación del extracto crudo	23
Figura 4.4. Proceso de obtención del extracto crudo.....	26
Figura 4.5 Equipo Äktä de purificación. Detalle de la columna CM Sepharose™.....	30
Figura 4.6 Equipo de electroforesis y polimerización de los geles de apilamiento y resolutivo.....	33
Figura 4.7. Inoculación en placas Petri y preparación de cultivos líquidos....	39
Figura 4.8. Placa ELISA inoculada de 96 celdas.....	40
Figura 4.9 Proceso de obtención del extracto crudo en aplicación real.....	43
Figura 4.10 Test de actividad cualitativo en la aplicación real.....	45
Figura 4.11 Esquema de inoculación de las muestras en placa Petri.....	46
Figura 5.1 SDS-PAGE revelado en tinción de plata para el EAP Alubia roja..	67
Figura 5.2 SDS-PAGE revelado en azul de Coomasie para el ETP de maíz dulce.....	67
Figura 5.3 SDS-PAGE revelado en azul de Coomasie para ETP de maíz rojo.....	80
Figura 5.4 Test de agrupamiento celular para <i>Bacillus turigensis</i> cepa 5.....	80
Figura 5.5 Test de agrupamiento celular para <i>Bacillus turigensis</i> cepa 7.....	81
Figura 5.6 Test de agrupamiento celular para <i>Bacillus turigensis</i> cepa 75.....	81

Figura 5.7 Test de agrupamiento celular para <i>Escherichia coli</i> cepa D-21.....	81
Figura 5.8 Test de agrupamiento celular para <i>Escherichia coli</i> cepa D-31.....	82
Figura 5.9 Test de agrupamiento celular para <i>Escherichia coli</i> cepa K-12.....	82
Figura 5.10 Test de agrupamiento celular para <i>Pseudomonas</i>	82
Figura 5.11 Test de actividad cualitativo para maíz blanco y agua turbia sintética.....	83
Figura 5.12 Test de actividad cualitativo para el maíz dulce (150 μ L) y agua de quebrada.....	84
Figura 5.13 Test de actividad para el maíz dulce (300 μ L) y agua de quebrada.....	84
Figura 5.14 Resultados del test microbiológico para 150 μ L y 300 μ L de extracto de maíz blanco.....	85
Figura 5.15 Resultados del test microbiológico para 150 μ L y 300 μ L de extracto de maíz dulce.....	85
Figura 5.16 Resultados del test microbiológico para 150 μ L y 300 μ L de extracto de maíz blanco.....	86

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1. Test de actividad para los extractos acuoso y salino procedentes de semillas de frutas exóticas y de cultivo.....	47
Gráfico 5.2. Test de actividad para los extractos acuoso y salino procedentes de semillas leguminosas.....	48
Gráfico 5.3. Test de actividad para el extracto salino diluido procedente de semillas de frutas exóticas y de cultivo.....	49
Gráfico 5.4. Test de actividad para el extracto salino diluido procedente de semillas leguminosas.....	50
Gráfico 5.5 Test de actividad para el extracto acuoso diluido procedente de distintas semillas.....	52
Gráfico 5.6 Resultados del test de actividad para distintas variedades de la especie <i>Zea mays</i>	53
Gráfico 5.7 Test de actividad para maíz procedente de distintas fuentes.....	53
Gráfico 5.8. Evolución de absorbancia a 500 nm durante la sedimentación en el test de actividad.....	54
Gráfico 5.9 Resultados del test de actividad para el estudio de la influencia de la temperatura en el componente activo.....	55
Gráfico 5.10 Test de actividad para alubia roja. Determinación del método de conservación.....	57
Gráfico 5.11 Test de actividad para maíz dulce y maíz rojo. Determinación del método de conservación.....	57
Gráfico 5.12 Test de actividad para ECS de alubia roja tras cromatografía de filtración en gel.....	60
Gráfico 5.13. Test de actividad para ECS de maíz dulce y maíz rojo tras cromatografía de filtración en gel.....	60
Gráfico 5.14 Resultados del test de actividad para los extractos con Acetato de Amonio de maíz dulce y maíz rojo.....	62
Gráfico 5.15 Cromatografía de Intercambio iónico para el ECA de la alubia roja.....	62
Gráfico 5.16 Test de actividad para el extracto acuoso de Alubia roja tras CIE.....	63
Gráfico 5.17 Test de actividad para ECAP tras CFG de la Alubia roja.....	64
Gráfico 5.18 Cromatografía de Intercambio iónico para el ECT de maíz dulce.....	64
Gráfico 5.19 Test de actividad para el extracto de acetato de amonio de Maíz dulce tras CIE.....	65
Gráfico 5.20 Cromatografía de Intercambio iónico para el extracto en Acetato de Amonio del Maíz rojo.....	66
Gráfico 5.21 Test de actividad para el extracto de Acetato de Amonio de Maíz rojo tras el Intercambio Iónico.....	66
Gráfico 5.22 Test de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Alubia roja.....	69
Gráfico 5.23 Test de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Maíz dulce.....	69
Gráfico 5.24 Test de de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Maíz rojo.....	70
Gráfico 5.25 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa K-12, para alubia roja.....	72

Gráfico 5.26 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa K-12, para maíz dulce.....	73
Gráfico 5.27 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa D-21, para alubia roja.....	73
Gráfico 5.28 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa D-21, para maíz dulce.....	74
Gráfico 5.29 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa D-31, para alubia roja.....	74
Gráfico 5.30 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa D-31, para maíz dulce.....	75
Gráfico 5.31 Test microbiológico para <i>Pseudomonas</i> , para alubia roja.....	75
Gráfico 5.32 Test microbiológico para <i>Pseudomonas</i> , para maíz dulce.....	76
Gráfico 5.33 Test microbiológico para <i>Staphylococcus</i> , para alubia roja.....	76
Gráfico 5.34 Test microbiológico para <i>Staphylococcus</i> , para maíz dulce.....	77
Gráfico 5.35 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa K-12.....	77
Gráfico 5.36 Test microbiológico para la <i>Escherichia coli</i> cepa D-31.....	78
Gráfico 5.37 Test microbiológico para <i>Pseudomonas</i>	79
Gráfico 5.38 Test microbiológico para <i>Bacillus turigensis</i> cepa 5.....	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Indicadores de desarrollo, en relación al agua, saneamiento y salud.....	4
Tabla 1.2. Tratamientos convencionales de potabilización.....	6
Tabla 1.3. Resumen comparativo de diferentes técnicas de potabilización.....	9
Tabla 2.1. Usos de la <i>Moringa oleifera</i>	13
Tabla 4.1. Relación de semillas seleccionadas.....	25
Tabla 4.2 Análisis físico-químico del agua de red.....	27
Tabla 4.3 Características columna PD-10 Desalting.....	29
Tabla 4.4 Composición de las disoluciones amortiguadoras para SDS-PAGE.....	32
Tabla 4.5. Composición de los geles para SDS-PAGE.....	32
Tabla 4.6. Composición del marcador LMW para electroforesis.....	33
Tabla 4.7. Composición del tampón transportador para SDS-PAGE.....	34
Tabla 4.8. Composición de las disoluciones para Protocolo Nativo Ácido.....	35
Tabla 4.9. Composición de los geles para Protocolo Nativo Ácido.....	36
Tabla 4.10. Composición del medio líquido de cultivo.....	37
Tabla 4.11. Composición del medio sólido de cultivo.....	38
Tabla 4.12. Análisis físico-químico del agua purificada.....	44
Tabla 4.13 Análisis físico-químico del agua superficial.....	44

PRÓLOGO

“El mundo no puede "permitirse el lujo" de esperar a que se lleven a cabo obras importantes de infraestructura para proveer agua potable a quienes la necesitan. Sería insensato e inaceptable no tener en cuenta las prioridades inmediatas de los más necesitados; hay que adoptar medidas simples y poco costosas para poner el agua salubre a disposición de millones de personas en los países en vías de desarrollo”. Gro Harlem Brundtlan. Directora general de la OMS, 2001.

"Casi la quinta parte de la población infantil del mundo, 400 millones de niños y niñas, carecen del mínimo de agua potable que necesitan para vivir. Los niños que se ven obligados a beber agua insalubre y a vivir en condiciones sanitarias inadecuadas no pueden progresar", afirmó Carol Bellamy, Directora ejecutiva del UNICEF 2005.

“Es necesario promover la participación de la mujer en todas las actividades de desarrollo relacionadas con el agua. En muchas culturas, incluidas las sociedades indígenas, las mujeres son las guardianas del agua. Son las mujeres quienes a menudo pasan largas y arduas horas buscando y cargando agua. Es necesario que la mujer participe de una forma más significativa en la adopción de decisiones sobre cómo usar y gestionar el agua, de forma que sus países puedan hacer pleno uso de sus conocimientos, habilidades y aportes.” Día Mundial del Agua. Secretario General de las Naciones Unidas. 22 de Marzo 2006.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El agua en el mundo

El agua es esencial para la vida y es necesaria para el desarrollo económico, sanitario y social de las poblaciones así como para el mantenimiento del equilibrio medioambiental de los ecosistemas.

En la actualidad, la falta de agua dulce en nuestro planeta es una problemática real causada principalmente por la escasez de lluvias, sobreexplotación de los acuíferos y la contaminación del medio natural.

El avance tecnológico del último siglo ha ocasionado la intensificación de la actividad industrial, agrícola y turística en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados, permitiendo un incremento de la actividad económica y del nivel de desarrollo y calidad de vida de la población aunque también ha causado un grave impacto sobre el medio natural, especialmente sobre el agua. Conscientes del uso intensivo que se da a los recursos y de los efectos que éste puede tener a corto y largo plazo sobre el entorno, los países con mayores recursos han desarrollado estrategias y políticas medioambientales orientadas a la protección del medioambiente, a la gestión sostenible y al uso racional del agua.

Las políticas y legislaciones medioambientales cada vez más estrictas, junto con motivos de carácter estratégico y económico han llevado a muchas corporaciones multinacionales a desplazar sus instalaciones hasta países donde los salarios son más bajos y las disposiciones en materia medioambiental son más permisivas. Esta circunstancia ha provocado la reducción de las reservas hídricas locales y el aumento de la contaminación de los acuíferos, en zonas donde no se dispone de recursos ni tecnología para hacerle frente.

En definitiva, la deslocalización industrial de los últimos años no ha hecho sino agravar problemas endémicos de los países en vías de desarrollo tales como la pobreza, la sequía o el hambre, y que han provocado que el acceso al agua de calidad se convierta en muchas ocasiones en un reto, especialmente para la población que posee menores recursos.

1.2 La situación del agua potable en los países en vías de desarrollo

El acceso al agua potable es un derecho fundamental para el ser humano e indispensable para cubrir sus necesidades básicas.

A pesar de ello, en la actualidad 1.500 millones de personas viven sin acceso al agua potable, la mayoría de las cuales viven en países en desarrollo y casi un 50 por ciento de la población total de los países en vías de desarrollo, padece en un momento dado algún problema de salud debido a la falta de agua y saneamiento (PNUD, 2006). Esta situación obliga a la población a consumir agua directamente de ríos y vertientes, sin ningún tipo de tratamiento previo, lo que representa un grave riesgo para su salud, y lleva asociado la aparición de gran parte de las enfermedades transmitidas por el agua tales como hepatitis A, giardiasis, disentería, cólera o fiebre tifoidea (Naciones Unidas, 2003).

La tabla 1.1 muestra los principales indicadores de desarrollo relacionados con el agua, la salud y el saneamiento de 7 países seleccionados a nivel mundial en el que quedan patentes las diferencias entre los países desarrollados y en vías de desarrollo. En ella se observa la influencia que sobre la salud infantil y la esperanza de vida al nacer posee el acceso al agua potable y el saneamiento mejorado. Mientras que en países como España o Noruega el 100% de las necesidades en relación al acceso al agua potable y al saneamiento están cubiertas en Mozambique o Nigeria, menos del 45% de la población posee acceso a fuentes de agua segura o saneamiento mejorado, disminuyéndose considerablemente en consecuencia su esperanza de vida y salud.

Tabla 1.1 Indicadores de desarrollo, en relación al agua, saneamiento y salud.
Fuente: Informe de desarrollo humano, PNUD 2006

Puesto	País	IDH*	Esperanza de vida al nacer (años)	Tasa de mortalidad de niños menores de 5 años (por cada 1000 nacidos vivos)	Población con acceso a saneamiento mejorado (%)	Población con acceso a fuentes de agua mejoradas (%)
1	Noruega	0.965	79.6	4	100	100
8	Estados Unidos	0.948	77.5	8	100	100
19	España	0.938	79.7	5	100	100
83	Ecuador	0.765	74.5	26	89	94
126	India	0.611	63.6	85	33	86
168	Mozambique	0.390	41.6	152	32	43
177	Nigeria	0.311	44.6	259	13	46

* IDH: Índice de Desarrollo Humano

Cada año mueren 1,8 millones de niños y niñas debido a enfermedades diarreicas y a parásitos intestinales originados por la falta de acceso al agua potable y por el deficiente saneamiento (PNUD, 2006). En la actualidad, el 30 % de la mortalidad infantil tiene su origen en las enfermedades hídricas y, del total de defunciones vinculadas con la diarrea, el 90 % ocurren en niños menores de 5 años de edad (UNICEF, 2005).

La solución a la problemática de la falta de acceso al agua potable para países en vías de desarrollo, debe encaminarse al desarrollo de técnicas innovadoras, eficaces, sostenibles, económicas, fiables y fáciles de manejar, que sean socialmente aceptadas por la comunidad, y que permitan dotar de agua de calidad a la población mejorando así su situación sanitaria y condiciones de vida (Mintz et al., 2001).

Conscientes de esta problemática, la comunidad internacional lleva reflejando en los últimos años, la importancia del derecho al acceso al agua potable e instando a la búsqueda de soluciones en diferentes declaraciones nacionales e internacionales tales como el Programa 21 (Naciones Unidas, 1992), la Cumbre Mundial para el Desarrollo Sostenible de Johannesburgo de 2002, el Informe del Estado Mundial de la Infancia (UNICEF, 2005) o en los Objetivos de Desarrollo para el Milenio (Naciones Unidas, 2000). Precisamente en este último, se recoge como objetivo para el año 2025 la reducción a la mitad el porcentaje de personas que no posee acceso al agua potable. Más recientemente, la declaración del Decenio Internacional para la acción “El agua fuente de vida” (2005-2015), destaca no solo la importancia del acceso al agua potable como elemento indispensable para la salud y el bienestar humanos sino también su

relación con el desarrollo sostenible, en particular para la integridad del medio ambiente y la erradicación de la pobreza y el hambre (Naciones Unidas, 2005).

Asimismo, los países desarrollados han desarrollado en el contexto de las políticas de cooperación al desarrollo, planes estratégicos de intervención y cooperación en los que el acceso al agua potable y al saneamiento básico son considerados una prioridad sectorial.



Figura 1.1 Niños consumiendo agua sin tratamiento previo.
Fuente: Water Aid web y Agencia de Prensa Reuters

Concretamente en España, el Plan Director de la Cooperación Española 2005-2008 (Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación Española, 2005), dedica un espacio propio al tema del agua y saneamiento, proporcionándole un enfoque multisectorial. Una de las líneas de actuación que la Cooperación Española prioriza es la de reducir el número de personas sin acceso al agua potable y al saneamiento básico. Las intervenciones en materia hídrica no sólo están basadas en la dotación de infraestructuras y equipos necesarios, sino en actuaciones que permitan un manejo integral del agua y saneamiento en su vertiente ambiental, en la seguridad alimentaria, nutrición y salud, garantizando así el aumento de las capacidades individuales y colectivas para la conservación y gestión sostenible de los recursos.

En la Comunidad Valenciana, el Plan Director de la Cooperación Valenciana 2004-2007 (Generalitat Valenciana, 2004), y más concretamente en el Plan Anual de Cooperación al Desarrollo de la Generalitat Valenciana de 2007, establece como prioridad sectorial la cobertura de las necesidades sociales básicas, resaltando especialmente el acceso al agua potable, el control y tratamiento del agua y el saneamiento ambiental.

1.3 Técnicas de potabilización convencional

El agua destinada a la bebida y a la preparación de alimentos debe estar exenta de microorganismos capaces de provocar enfermedades, y de sustancias minerales y orgánicas que puedan ocasionar efectos fisiológicos perjudiciales. El agua denominada "potable", debe ser aceptable desde el punto de vista estético, es decir, debe estar exenta de turbidez, color y sabor perceptibles, así como de sabores desagradables y debe tener una temperatura razonable.

Así pues, potabilizar el agua, consiste en aplicar una serie de tratamientos y acondicionamientos que eliminen los sólidos, la turbidez y todos los agentes patógenos presentes en ella capaces de producir enfermedades.

El tipo de tratamiento a aplicar depende, entre otros, de las características y origen del agua a tratar así como de los medios y recursos disponibles.

Los tratamientos convencionales existentes vienen resumidos en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Tratamientos convencionales de potabilización
Fuente: Elaboración propia

PROCESO	OBJETIVO
PRETRATAMIENTO	
Cribado	Eliminación de desechos grandes que pueden obstruir o dañar los equipos de la planta
Pretratamiento químico	Eliminación ocasional de algas y otros elementos acuáticos que causan sabor, olor y color
Presedimentación	Eliminación de grava, arena, limo y otros materiales sedimentables
Aforo	Medida del caudal de agua cruda a tratar
TRATAMIENTO PRINCIPAL	
Aireación	Eliminación de olores y gases disueltos, adición de oxígeno para mejorar el sabor
Coagulación/Floculación	Conversión de sólidos no sedimentables en sólidos sedimentables
Sedimentación	Eliminación de sólidos sedimentables
Ablandamiento	Eliminación de la dureza
Filtración	Eliminación de sólidos finos, flóculos en suspensión y de la mayoría de los microorganismos
Adsorción	Eliminación de sustancias orgánicas y color
Estabilización	Prevención de incrustaciones y corrosión
Fluoración	Prevención de la caries dental
Desinfección	Eliminación de microorganismos patógenos

En la figura 1.2 se muestra las etapas del proceso de potabilización convencional.

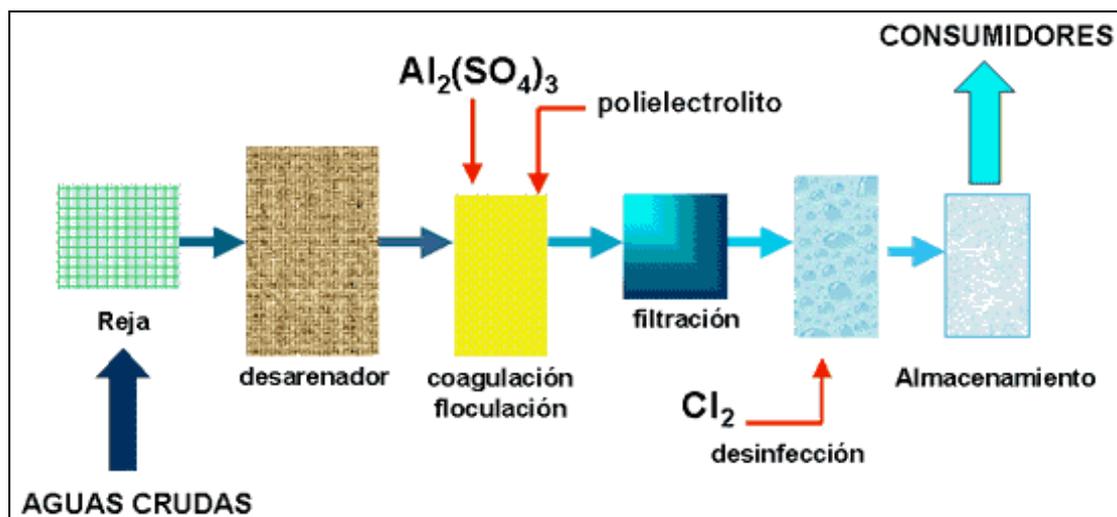


Figura 1.2. Etapas del tratamiento convencional de potabilización de agua.
Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, en muchos países en vías de desarrollo, la falta de sistemas de tratamiento, de suministro y distribución centralizados, los medios económicos

limitados y la escasez de agua, dificultan la aplicación de una tecnología convencional específica. En otros casos, la necesidad de productos químicos y otros medios materiales que no se pueden obtener con facilidad a nivel local a un coste razonable, impiden su aplicación. Esta circunstancia, obliga a las poblaciones a abastecerse directamente de aguas superficiales procedentes de ríos y vertientes, sin ningún tipo de tratamiento.

En los países en vías de desarrollo, se emplean distintas tecnologías de tratamiento y almacenamiento domiciliario de agua que son accesibles, simples y económicas. Dichas técnicas se caracterizan por su bajo coste y su eficacia variable.

Entre los sistemas disponibles, los más utilizados a pequeña escala, principalmente en el ámbito doméstico son:

- **Ebullición:** Es el método más antiguo y universal para la desinfección del agua a escala domiciliaria, capaz de la eliminación de los elementos patógenos que se transmiten mediante el agua.

No obstante, hervir el agua requiere el uso de leña u otros combustibles y que el agua sea consumida inmediatamente después de ser hervida, ya que de lo contrario es susceptible de una contaminación posterior.

- **Cloración:** Dentro de los métodos químicos, es el más usado. Es muy efectivo para eliminar microorganismos patógenos y oxidar la materia orgánica presente en el agua, y mantiene una concentración residual de cloro en el agua que previene un nuevo crecimiento microbiano y la contaminación del agua con posterioridad a su tratamiento.

Sin embargo, requiere de una dosificación específica, para lo cual no siempre se cuenta con el técnico cualificado. De aplicarse una dosis excesiva, el sabor y olor del agua se ven afectados y se introducen riesgos para la salud.

Además, su aplicación sin un tratamiento previo de filtración o sedimentación, puede interferir en el proceso de desinfección y provocar la aparición de trihalometanos, altamente perjudiciales para la salud humana.

- **Filtración** del agua con medios porosos: se utiliza para eliminar la turbiedad, los quistes y los protozoos, pero no es eficaz para suprimir las bacterias o los virus. Es un método económico que abarca un amplio espectro de opciones, desde los filtros de materiales cerámicos porosos a los textiles, los de piedras o los de arena.
- **Coagulantes naturales:** la coagulación-floculación con productos naturales y posterior sedimentación es un tratamiento muy extendido en zonas en las que la escasez de agua viene acompañada de falta de electricidad y de medios técnicos. La técnica, consiste en el empleo de semillas de cultivos o plantas endémicas, para purificar el agua empleando las propiedades coagulantes e incluso antibióticas de algunas semillas. La principal ventaja del método es el ahorro de coagulante químico y el principal inconveniente es que el agua tratada con este método no puede ser almacenada más de 24 horas, ya que se inicia un proceso de descomposición del agua como consecuencia de la adición de sustancias orgánicas a ésta.

Otras técnicas más recientes que pueden ser empleadas dada su aceptable eficacia y bajo coste son:

- **Luz ultravioleta:** es un método que no presenta riesgos de manipulación, el agua tratada no se altera en olor ni sabor y la desinfección es rápida, aunque requiere de energía eléctrica para las lámparas. La radiación ultravioleta es efectiva contra ciertos microorganismos y no genera subproductos en su utilización, ni al agua ni al medio, pero no es efectiva para la eliminación de virus y no proporciona una desinfección duradera.
- **SODIS:** es una tecnología sencilla que utiliza la radiación solar para inactivar y destruir los microorganismos patógenos presentes en el agua. El tratamiento consiste básicamente en llenar botellas de plástico transparente (preferiblemente PET) con agua y exponerlas al sol durante aproximadamente cinco horas. El procedimiento, reduce el riesgo de recontaminación puesto que el agua es tratada y almacenada en el mismo recipiente cerrado hasta su uso (McGuigan et al., 1998).

Es una tecnología de bajo coste, sostenible y que no requiere de la adición de sustancias químicas. Sin embargo, no mejora la calidad química del agua, precisa el uso de botellas plásticas adecuadas que no siempre están disponibles para la población, requiere de condiciones climáticas favorables, tales como irradiación solar y temperaturas preferiblemente no inferiores a 20° C, debe ser aplicado a agua cruda de baja turbiedad (preferiblemente con menos de 30 UNT), ofrece una capacidad limitada de producción, y en consecuencia, es usada sólo para agua de consumo humano (entre 1 y 3 litros por persona por día).

- **RAOS (Remoción de Arsénico por Oxidación Solar):** Es un método simple que utiliza la irradiación del agua con luz solar en PET (u otro tipo de material transparente a la radiación ultravioleta) para reducir los niveles de arsénico en el agua potable. El método RAOS se basa en la oxidación fotoquímica del Arsénico (III) en presencia de citrato (que se adiciona en forma de zumo de limón) seguida por precipitación o filtración del Arsénico (V) adsorbida en óxidos de hierro. Las botellas plásticas son expuestas al sol por algunas horas y, al llegar la noche, se colocan en posición vertical, para que el agua purificada se decante de las partículas de hidróxido de hierro precipitado. También es posible filtrar el agua a través de paños textiles. Este método, precisa la utilización de botellas de plástico, no mejora la calidad microbiológica del agua y solo es útil si el agua a tratar posee hierro.
- **Tecnología de membranas:** Es una tecnología muy eficaz para el tratamiento de agua cruda que se caracteriza por su modularidad, sencillez, adaptabilidad al contaminante y facilidad de manejo. Permite obtener agua de elevada calidad y se orienta al suministro comunitario. Se caracteriza por realizar la separación de las especies presentes en el agua cruda mediante la aplicación de un gradiente de presión que permite el paso de la corriente de agua limpia a través de la membrana, que posee un tamaño de poro determinado e impide el paso al contaminante. Sus principales inconvenientes son que las membranas deben ser repuestas cada 3 ó 5 años, precisa adición de productos químicos para la limpieza y el mantenimiento del sistema y requiere capacitación para su operación.

La tabla 1.3 muestra un resumen comparativo de algunas técnicas de potabilización y la valoración de su eficacia en la eliminación de ciertos contaminantes:

Tabla 1.3. Resumen comparativo de diferentes técnicas de potabilización.

Fuente: Modificado de Hamann et al., 1990

Contaminante	Tratamiento de potabilización				
	Coagulación, sedimentación, filtración	Ablandamiento con cal	OI	Ultrafiltración	Oxidación química, desinfección
Coliformes totales	B-E	B-E	E	E	E
<i>Giardia Lambia</i>	B	B	E	E	B
Virus	B-E	B-E	E	E	E
Legionella	B-E	B-E	E	E	E
Turbiedad	E	B	E	E	M
Componentes orgánicos volátiles (VOCs)	M	M-R	R-B	M	M-B
Componentes orgánicos sintéticos (SOCs)	M-B	M-R	R-E	M	M-B
Pesticidas	M-B	M-R	R-E	M	M-B
THMs	M	M	R-B	M	M
Precusores de THM	R-B	R-B	B-E	M-R	M
Color	R-B	R-B	B-E	R	R-E
Hierro	R-E	E	B-E	B	B-E
Manganeso	R-E	E	B-E	B	R-E
Sabor y olor	M-R	M-R	----	----	R-E
M = Bajo (0-20% rend); R= Regular (20-60% rend); B= Bueno (60-90% rend); E= Excelente (90-100% rend)					

2. ANTECEDENTES

2.1 Coagulantes naturales

El tratamiento de potabilización convencional, comprende básicamente la clarificación del agua tras la captación mediante las etapas de coagulación-floculación, sedimentación, filtración y desinfección. Sin embargo, en zonas de escasos recursos y de tecnología limitada, la utilización de tecnologías convencionales de potabilización no es viable ni adecuada, debido entre otros motivos a su elevado coste de inversión y gestión, y al mantenimiento que requieren. Este tipo de instalaciones se caracterizan por un importante desarrollo de infraestructura, personal cualificado para su explotación y adición de productos químicos necesarios para su funcionamiento. Precisamente esta última característica representa un factor limitante en la aplicación de la tecnología de potabilización convencional, ya que los reactivos químicos pueden alcanzar un valor económico considerable si no son producidos a nivel local, ya que deben ser importados y pagados en moneda extranjera, lo que incrementa considerablemente su coste (Schultz et al., 1983).

Como alternativa, los países en vías de desarrollo, han adaptado una serie de tecnologías tradicionales para eliminar la turbidez del agua en el ámbito doméstico. De ellas la más estudiada es la utilización de extractos naturales de plantas para la clarificación del agua cruda (Jahn, 1979; Jahn, 1981; Dorea, 2006).

Los coagulantes naturales son sustancias solubles en agua, procedentes de materiales de origen vegetal o animal (Kawuamura, 1991; Lee et al., 1995; Ganjidoust et al., 1997; Broekaert et al., 1997), que actúan de modo similar a los coagulantes sintéticos, aglomerando las partículas en suspensión que contiene el agua cruda, facilitando su sedimentación y reduciendo la turbidez inicial de ésta. Algunos de estos coagulantes poseen además propiedades antimicrobianas, por lo que reducen o eliminan el contenido de microorganismos patógenos susceptibles de producir enfermedades.

Su origen natural, garantiza la inocuidad para el ser humano, y la biodegradabilidad de los lodos producidos permite además su utilización en la agricultura. Su aplicación, no solo puede ir dirigida a países en vías de desarrollo, sino también a potabilización convencional y al tratamiento de aguas residuales. En la actualidad, el uso de coagulantes de origen sintético para la potabilización, tales como el Sulfato de Aluminio o el Cloruro Férrico (Van Benchosten et al., 1990, Boisvert et al., 1997; Najm et al., 1998), también es cuestionada debido entre otros motivos a :

- los problemas medioambientales que conlleva (Christopher et al., 1995; Kaggwa., 2001), fundamentalmente de generación de lodos tóxicos que no pueden ser utilizados en la agricultura.
- la relación con la enfermedad de Alzheimer (Crapper et al., 1973; Alfrey et al., 1976; Schecher et al., 1988; Crapper et al., 1980; Davidson et al., 1982; Gardner et al., 1991; Jekel, 1991)
- empeoramiento de enfermedades neurodegenerativas (Miller, 1984; Martyn et al., 1989)
- relación con el cáncer (Dearfield et al., 1964; Mccollister et al., 1964; Mallevalle et al., 1984).

Recientes informes relacionan la presencia de aluminio residual en el agua potable con diferentes enfermedades y existe un interés global por investigar coagulantes sustitutos de los actuales, que sean más seguros para el ser humano.

En 1988, Jahn publicó una lista de coagulantes naturales de origen vegetal que tradicionalmente se habían utilizado en África subsahariana, la India y América del Sur. Entre ellos, se encontraban las semillas de almendra, albaricoque, melocotón, *Cactus Opuntia*, legumbres, guisantes, lentejas, nueces, habas, guar y *Moringa Oleifera*. Algunos de ellos han sido estudiados con mayor profundidad, proporcionando resultados positivos en relación a su actividad coagulante. A continuación, se muestran las especies de coagulantes naturales más estudiadas en la actualidad.

- *Strychnos potatorum* (Tripathi et al., 1976; Adinolfi, 1994; Chaudhuri, 2005)
- *Moringa Oleifera* (Folkard et al., 1986 ; Olsen, 1987; Sutherland et al., 1994; Muyibi et al., 1995a; Muyibi et al., 1996; Ndabigengesere et al., 1998; Okuda et al., 1999, Dorea, 2006)
- Okra (Al-Samawi et al., 1996)
- Mandioca (Leiva et al., 1997)
- Arroz (Leiva et al., 1998)
- Almidón (Hamidi et al., 1998; Hamidi et al., 2000)
- *Cactus Latifaria* y *Prosopis juliflora* (Diaz et al., 1999)
- Taninos de Valonia (Özacar et al., 2000, 2002, 2003)
- Tamarindo (Mishra et al., 2006)
- *Samanea saman* (González et al, 2006)
- Algas marinas (Kawuamura, 1991)
- Alubia blanca (Liew et al., 2004)
- Cactus (Zhang et al., 2006)
- Tuna *Opuntia Cochinelifera* (Almendárez de Quezada, 2004)
- Maíz dulce (Raghuwanshi et al., 2002)

Dentro de los coagulantes naturales de origen animal, el más estudiado es el quitosán. Este coagulante es un derivado del quitina que se encuentra en el caparazón de moluscos, el exoesqueleto de artrópodos y la pared celular de hongos, setas y levaduras. Es un buen coagulante capaz de eliminar hasta el 99 % de la turbidez del agua cruda si se combina con filtración en lecho de arena y reduce también el contenido en metales pesados, fósforo y grasas del agua (Kawuamura, 1991).

De todos los coagulantes naturales, el coagulante primario de origen vegetal más conocido y estudiado en la actualidad es la semilla de *Moringa Oleifera*.

Moringa Oleifera (Figura 2.1) fue en su origen un árbol ornamental del Sudán, plantado durante la ocupación británica. *Moringaceae* es el nombre de la familia de plantas que engloba a más de 14 especies conocidas, endémicas de los países africanos, Madagascar, Arabia y la India. La mitad de ellas son relativamente comunes en la actualidad y son esporádicamente cultivadas, aunque sólo la *Moringa Oleifera*, es cultivada en toda el área tropical.



Figura 2.1. Izqda. Árbol *Moringa Oleifera*. Dcha. Semilla de *Moringa Oleifera*.
Fuente: Elaboración propia

Esta especie posee un gran interés, debido a los múltiples usos que posee: las vainas, hojas y semillas son un alimento vegetal con un poder nutricional elevado, el aceite extraído de las semillas, se emplea para cocinar, fabricar jabón y cosméticos, como combustible para calefacción e iluminación, la pulpa de la madera se emplea para fabricación de papel, la madera es ligera, así que no puede utilizarse para construir estructuras sólidas, aunque si tiene uso como leña para cocinar, las hojas son un buen fertilizante y las semillas en polvo se emplean para curar o aliviar infecciones bacterianas de la piel. La tabla 2.1 muestra los principales usos de la *Moringa oleifera* y su procedencia.

Tabla 2.1. Usos de la *Moringa oleifera*
Fuente: Folkard et al., 1995

Usos	Procedencia
LEGUMBRE	Las vainas verdes, las hojas, flores y las semillas asadas son comestibles y altamente nutritivas
ACEITE	Las semillas contienen un 40% de aceite muy rico en tocoferoles. Se usa para cocinar, para fabricar jabones, cosméticos y como combustible de lámparas.
COAGULANTE PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA	Tradicionalmente usado para la clarificación de agua cruda a nivel doméstico en Sudán e Indonesia. Usado con éxito para depurar grandes cantidades de agua en Malawi.
OTROS USOS	Todas las partes de la planta se usan en una gran variedad de medicinas tradicionales, por sus propiedades antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antihipertensivas y antitumorales La semilla molida se usa como ungüento para tratar infecciones bacteriales comunes de la piel. Después de extraer el aceite las hojas y las semillas se pueden usar como forraje para ganado y fertilizante del suelo. Se siembra para formar barreras vegetales y como rompevientos. Como leña después de haber podado el tallo principal para reforzar los tallos laterales. En agroforestería: para intercalar con otros cultivos Como abono, al tratarse de árboles leguminosos que añaden nitrógeno al suelo. La pulpa de la madera para fabricación de papel. Como árbol ornamental.

El uso más conocido de la semilla de *Moringa Oleifera* es el tratamiento del agua, debido a sus propiedades coagulantes (Sutherland et al., 1989), antibióticas (Eilert et al., 1983; Olsen, 1987) y antifúngicas (Chuang et al., 2007).

El método tradicional de clarificación del agua cruda (Lund, 1980; Jahn, 1984) mediante el uso de semillas de *Moringa oleifera*, consiste en añadir a una vasija que contiene el agua cruda a tratar, una bolsa de tela cerrada con las semillas finamente trituradas de la planta. Tras unas horas, la materia en suspensión presente en el agua cruda sedimenta y el sobrenadante clarificado se trasvasa a otra vasija para ser consumido directamente (Figura 2.2).



Figura 2.2. Comparación entre muestras de agua cruda y tratada con *Moringa Oleifera*.

Fuente: <http://www.le.ac.uk/engineering/staff/Sutherland/moringa/pictures/pilot/pilot.htm>

Entre las principales ventajas que presenta el uso de esta semilla destacan su bajo coste, la biodegradabilidad del lodo producido así como la estabilidad del pH del agua tratada con dicha sustancia. Por su parte, los extractos salinos y acuosos crudos de *Moringa* han mostrado una gran eficacia como coagulante primario natural, alcanzando una reducción de la turbiedad elevada (entre 92-99 %), (Jahn, 1988; Muyibi et al., 1995b) y una producción de lodo residual menor que el producido por el sulfato de aluminio (Ndabigengesere et al., 1996).

El principal inconveniente que presenta la *Moringa oleifera* y el resto de coagulantes naturales, es que cuando se adicionan al agua en forma de semillas pulverizadas, incrementan la carga orgánica de ésta de manera significativa añadiendo hasta un 90% de sustancias orgánicas que no actúan como agentes floculantes (Jahn, 1988; Ndabigengesere et al., 1995; Okuda et al., 2001a). Este hecho, impide almacenar el agua tratada por un tiempo superior a 24 horas (Jahn, 1988).

Las investigaciones entorno a la *Moringa*, se centran en la caracterización del compuesto activo bien sea proteína (Gassenschmidt et al., 1995; Ndabigengesere et al., 1995; Nkhata, 2001) o polielectrolito (Okuda et al., 2001b), en la purificación del compuesto activo por métodos sencillos (Ghebremichael et al., 2005) o en el estudio de sistemas alternativos que permitan la utilización de los extractos coagulantes para la clarificación de agua, tales como su combinación con filtración en lecho de arena (Lilliehöök, 2005).

Asimismo, se estudia la efectividad de los coagulantes naturales en comparación con el sulfato de aluminio y su aplicación a escala piloto en sistemas de coagulación-floculación-filtración (Raghuwanshi, 2002), en sistemas comunitarios de potabilización en comunidades rurales (Jahn, 1986; Folkard et al., 1990) y en filtración directa (Al-

Khalili et al., 1997) con lechos filtrantes duales compuestos por *Strychnos potatorum* y *Moringa Oleifera* (Pollard et al., 1995, Mandloi et al., 2004; Chaudhuri et al., 2005) o de arroz (Barnes et al., 1983). También se ha estudiado la expresión de la proteína coagulante recombinante de *Moringa oleifera* (Broin et al., 2002; Optima 2000, 2003 a, 2003b) a través de microorganismos, tales como la *Escherichia coli*, para su producción en continuo.

Además de su aplicación en clarificación y potabilización de aguas crudas, se ha estudiado la aplicación de coagulantes naturales en el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria textil (Vasudevan et al., 2002), de industrias de extracción de aceite de oliva (Meysami et al., 2005), en aguas con elevado contenido de metales pesados como el cadmio (Sharma et al., 2006) o en deshidratación de lodos (Özacar et al., 2000) obteniéndose resultados alentadores.

3. OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Objetivo

El objetivo principal del presente trabajo de investigación es estudiar la utilización de coagulantes naturales extraídos de semillas autóctonas como un método de potabilización de agua para países en vías de desarrollo.

Para alcanzar el objetivo principal, la investigación desarrollada contemplará los siguientes objetivos específicos:

- selección de semillas capaces de reducir la turbidez de aguas crudas y de eliminar o reducir el contenido de microorganismos patógenos presentes en el agua.
- análisis mediante ensayo comparativo de la actividad coagulante primaria de las semillas estudiadas.
- identificación y caracterización del compuesto primario activo extraído de las semillas, que posee capacidad coagulante.
- implementación de la purificación de la sustancia activa y caracterización de sus propiedades antimicrobianas.
- aplicación real de los coagulantes naturales con el fin de desarrollar un protocolo de aplicación sencillo y factible en un contexto con recursos limitados.

3.2 Justificación del trabajo

La falta de agua potable es un problema que en la actualidad afecta a más de 1500 millones de personas en todo el mundo, principalmente a aquellas que viven en países en vías de desarrollo.

La solución para mejorar la situación sanitaria y condiciones de vida de la población afectada, pasa por orientar la investigación presente y futura al desarrollo de técnicas innovadoras, eficaces, sostenibles, económicas, fiables y fáciles de manejar, que sean socialmente aceptadas por la comunidad, y que permitan dotar de agua de calidad a la población (Mintz et al., 2001).

El presente trabajo de investigación propone la utilización de coagulantes naturales extraídos de semillas como una alternativa orientada a mejorar de la calidad del agua destinada a consumo humano en zonas de escasos recursos, con población reducida y dispersa, sin acceso a tecnología ni a electricidad.

En los estudios científicos, se nombran diversas especies de origen vegetal que pueden ser aplicadas en la clarificación del agua cruda, aunque la más eficaz y estudiada es la semilla *Moringa oleifera*.

El estudio de nuevas semillas que posean una actividad coagulante igual o superior a la de la *Moringa oleifera* y que se cultiven en las zonas donde se pretenda aplicar este método, resulta sin duda interesante para abrir nuevos campos en el estudio de la potabilización para países en vías de desarrollo, especialmente en zonas en las que dicha especie tropical no se pueda obtener.

El desarrollo de un protocolo sencillo de obtención del principio activo, permitirá a los habitantes de las comunidades la producción del mismo *in situ* y su aplicación para la obtención de agua pura.

El estudio de diferentes técnicas de purificación, permitirá solucionar la problemática asociada a la degradación del agua tratada con coagulantes naturales, posibilitando el almacenamiento del agua con el extracto purificado, por un tiempo superior a 24 horas.

Asimismo, la investigación de las propiedades antimicrobianas del extracto purificado, evaluará la posibilidad de utilizarlos como desinfectantes en el agua destinada a consumo humano.

Finalmente, el presente trabajo abordará la aplicación real de los extractos en aguas superficiales naturales, permitiendo afrontar las dificultades de la aplicación del protocolo desarrollado fuera del ámbito del laboratorio. Dicha experiencia piloto, representa una novedad que ayudará a revisar y adaptar el protocolo de aplicación del coagulante para los estudios posteriores y el desarrollo de un prototipo para el tratamiento en continuo.

El trabajo de investigación desarrollado constituye una línea de acción complementaria a los estudios realizados en el ámbito del proyecto Internacional AQUAPOT. Dicho proyecto desarrollado en los últimos 10 años en el instituto ISIRYM de la Universidad Politécnica de Valencia, estudia tecnologías de potabilización sencillas, eficaces y de bajo coste que puedan ser aplicadas en países en vías de desarrollo. En los últimos años, el proyecto ha centrado su actividad en el estudio de sistemas de potabilización basados en la tecnología de membranas que permiten dotar de agua potable a regiones rurales de la sierra andina ecuatoriana.

Los principales resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación han sido presentados para su participación en el "I Congreso Internacional de Cooperación al Desarrollo: Cooperación y grupos vulnerables" celebrado en Valencia (España) en Noviembre de 2005, en el IV Congreso "Universidad y Cooperación al Desarrollo" celebrado en Madrid (España) en Abril de 2006, en el congreso "Euromembrane" celebrado en Giardini-Naxos (Italia) en Septiembre de 2006 y en el "Internacional Conference on Water Mangement and Technology Applications in Developing Countries- Water Malaysia 2007" celebrado en Mayo de este año en Kuala Lumpur (Malaysia).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Fundamento de las técnicas utilizadas

Las técnicas utilizadas en el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación son:

- Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel
- Determinación del contenido proteico por medida de la absorbancia.
- Método Bradford
- Cromatografía de intercambio iónico
- Electroforesis nativa y desnaturalizante

4.1.1 Cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, es un tipo de cromatografía sólido-líquido que basa la separación (fraccionamiento) de biomoléculas en las diferencias de tamaño. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel, que se introduce en una columna como soporte cromatográfico. El gel está constituido por partículas esféricas que tienen poros de un determinado tamaño. Las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna. Las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina “volumen vacío” de la columna, se dicen que son excluidos del gel. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular.

Las principales aplicaciones de esta técnica son la separación de sustancias de distintos pesos moleculares, la purificación de proteínas, el desalado y la determinación de pesos moleculares de proteínas.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la citada cromatografía con el fin de eliminar el NaCl presente en la solución salina del extracto crudo utilizaron columnas, se conoce con el nombre de desalado. Esta aplicación basa su separación en el distinto tamaño que poseen las biomoléculas y las partículas de cloruro sódico, de forma que permiten la eliminación de la sal y la recuperación del extracto crudo.

Las columnas utilizadas a nivel experimental fueron columnas PD-10 (Amersham Biosciences) compuestas por una matriz de Sephadex G-25, con un límite de detección de moléculas con un peso molecular de 5000 Da.

4.1.2 Determinación del contenido proteico por medida de la absorbancia

Esta técnica se basa en la capacidad de algunos grupos funcionales que componen las cadenas aminoapépticas de absorber la luz ultravioleta, permitiendo medir su concentración por espectrofotometría (Stoscheck, 1990).

La medida de la absorbancia a 280 nm (A_{280}) para una mezcla de proteínas, permite obtener de forma aproximada su concentración, sobre todo cuando se comparan mezclas de composición similar. Frecuentemente, se utiliza el valor de A_{280} para expresar la concentración de proteínas. De hecho, valores de la absorbancia del orden

de entre 0.5 y 2.0 a 280 nm, son habituales en soluciones de proteínas de concentración 1 mg/mL.

Las principales ventajas de este método son la relativa sensibilidad (detecta entre 50-100 µg de proteína), la simplicidad y la rapidez de ejecución. Dado que la solución de proteínas no se somete a ninguna reacción química durante el ensayo, ésta puede ser recuperada si fuera necesario. La técnica es particularmente útil para seguir la concentración de proteínas durante la elución de una cromatografía.

4.1.3 Método Bradford

El método Bradford (Bradford, 1976) se emplea para determinar el contenido proteico de una muestra. Es muy rápido, útil, precisa una pequeña cantidad de muestra y posee una sensibilidad en el rango de 0.5-10 mg/L de proteína.

El ensayo se basa en el estudio de la absorbancia que posee una disolución ácida de Azul de Coomassie R-250, a una longitud de onda de 595 nm, cuando se produce la unión de este reactivo coloreado con los residuos aminoácidos básicos de la proteína. Tanto las interacciones hidrofóbicas como las iónicas estabilizan la forma aniónica de la tintura provocando un cambio de color visible.

La determinación del contenido proteico de una muestra desconocida requiere un ensayo en el que se lleva a cabo la preparación de muestras con cantidad conocida de proteína (curva de calibrado con la proteína patrón) y se compara su absorbancia con la de la muestra a determinar.

4.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es la técnica cromatográfica más utilizada en purificación de proteínas (Karlsson et al., 1989; Roe, 1989). Se caracteriza por su facilidad de uso, amplia aplicación, escalabilidad, elevado poder de resolución, gran capacidad y bajo coste.

La purificación de proteínas mediante intercambio iónico basa su principio de separación en la carga eléctrica de la molécula objeto de estudio (Shpigun et al., 1988). En el presente trabajo, la proteína coagulante es separada del resto de proteínas basándose en la diferencia de su carga. Durante la purificación tiene lugar la adsorción reversible de las proteínas a los grupos funcionales inmovilizados de la matriz. Las interacciones entre la proteína y los grupos funcionales de la matriz dependen entre otros factores de la distribución de la carga en la superficie de la proteína, de la fuerza iónica y pH de la disolución y de la presencia de otros aditivos como disolvente orgánicos.

La aplicación de la técnica requiere 3 componentes: una columna con una matriz inmóvil o estacionaria, una solución móvil compuesta por la mezcla de proteínas que se desea separar y una solución tampón que actúa como eluyente. La matriz posee iones que intercambia con la fase móvil y que están cargados positivamente (si se trata de intercambiadores aniónicos) y negativamente (si se trata de intercambiadores catiónicos). Dado que la afinidad de la columna por las proteínas de la muestra no es la misma, estas atraviesan la columna a diferentes velocidades.

En cualquier caso, la separación de la mezcla compleja de proteínas se produce ya sea cambiando la concentración de la solución amortiguadora o cambiando el pH de la fase móvil (Voet et al., 1999).

En la figura 4.1 se muestra gráficamente el mecanismo simplificado en que se basa la cromatografía de intercambio iónico para el caso particular de la purificación de proteínas del extracto crudo.

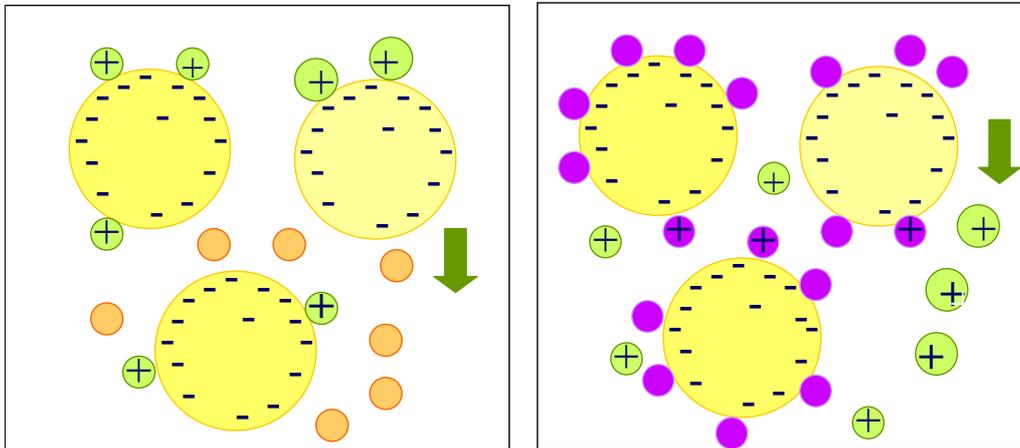


Figura 4.1 Fundamento de la cromatografía de intercambio iónico.

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la figura, la proteína cargada positivamente (verde) se une a la fase inmóvil o estacionaria cargada negativamente (amarillo), atraída por esta, cuando la fase móvil posee una fuerza iónica baja. La aplicación de un gradiente salino (morado) en la columna, desplaza la proteína adsorbida a la fase estacionaria (verde), debido a la competencia que se establece entre ambas por los centros activos de la resina.

A nivel experimental, la purificación de proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico consta de 5 etapas:

- equilibrado de la columna de intercambio iónico
- descarga de la muestra
- adsorción
- elución
- regeneración

En primer lugar, la matriz de intercambio iónico es equilibrada con la solución tamponada con el fin de lograr que tenga el pH y la carga iónica necesaria para permitir la unión del compuesto activo. A continuación, la muestra es introducida en la columna y las proteínas activas que contiene, empiezan a unirse a la matriz. Una vez están adsorbidas, la matriz es lavada con la disolución tamponada de equilibrado, para eliminar las proteínas que no han sido adsorbidas en la superficie de la matriz. Finalmente, tiene lugar la elución mediante gradiente salino, que libera las proteínas de interés.

La etapa final, es la regeneración de la matriz de intercambio iónico con el fin de eliminar las sustancias no eluidas en las condiciones experimentales anteriores, y reequilibrar la matriz acondicionándola para una nueva purificación.

4.1.5 Electroforesis nativa y desnaturizante

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, denominada comúnmente electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas, al tratarse de un método rápido que requiere cantidades mínimas de muestra (del orden de microgramos de proteína) para su análisis.

Debido a que las proteínas poseen una carga eléctrica neta cuando se encuentran en un medio con un pH diferente al de su punto isoeléctrico, la electroforesis basa su fundamento en la movilidad de estas proteínas (debido a su diferente carga) cuando son sometidas a un campo eléctrico. La velocidad de migración en el gel, es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa posea la proteína, más rápida será la migración.

Las electroforesis se clasifican en nativas o desnaturizantes, en función del estado de las proteínas de la muestra a lo largo del proceso electroforético.

En la electroforesis desnaturizante (la más común), las proteínas se someten a migración tras ser desnaturizadas (pérdida de la estructura tridimensional) por adición de agentes desnaturizantes tales como el dodecilsulfato sódico (ver figura 4.2). En esta situación, la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma.

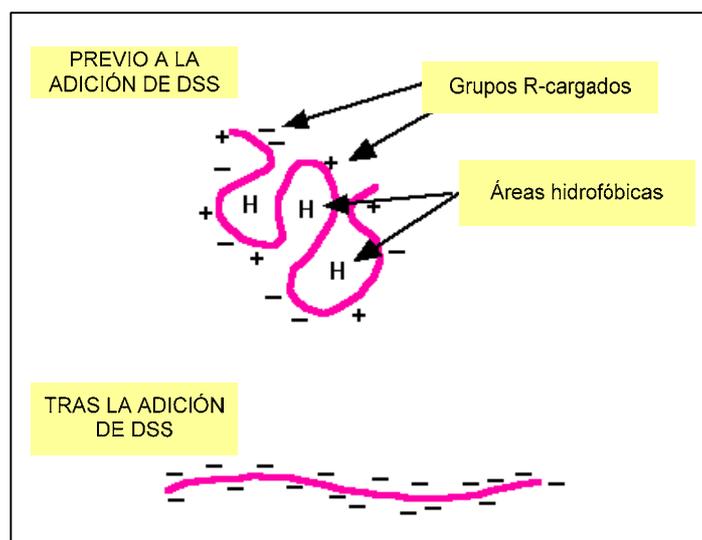


Figura 4.2 Efecto desnaturizante del DSS sobre la estructura de la proteína

Fuente: <http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2001/caphane/proteins.html#denaturation>

En la electroforesis nativa, las proteínas se someten a migración sin desnaturización. En este caso, las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma.

Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose sólo los complejos.

Las muestras sometidas a electroforesis en geles nativos, pueden actuar de dos formas distintas:

- Si la proteína migra en el gel hacia el ánodo, es porque posee una carga negativa al pH al que se encuentra el gel/tampón del sistema. Por esta razón, el protocolo PAGE nativo se realiza normalmente a un pH básico moderado, donde las proteínas con un pI (punto isoelectrico) neutro o ácido tendrán la red negativamente cargada.
- Alternativamente, el proceso se puede realizar de forma inversa, lo que significa usar un pH ácido para proporcionar una carga positiva a la mayoría de las proteínas. Este método requiere invertir el ánodo y el cátodo hasta que las proteínas cargadas positivamente migren hacia el cátodo.

4.2 Metodología experimental

La metodología seguida para la realización del estudio, se muestra de forma esquemática en el diagrama de la figura 4.3.

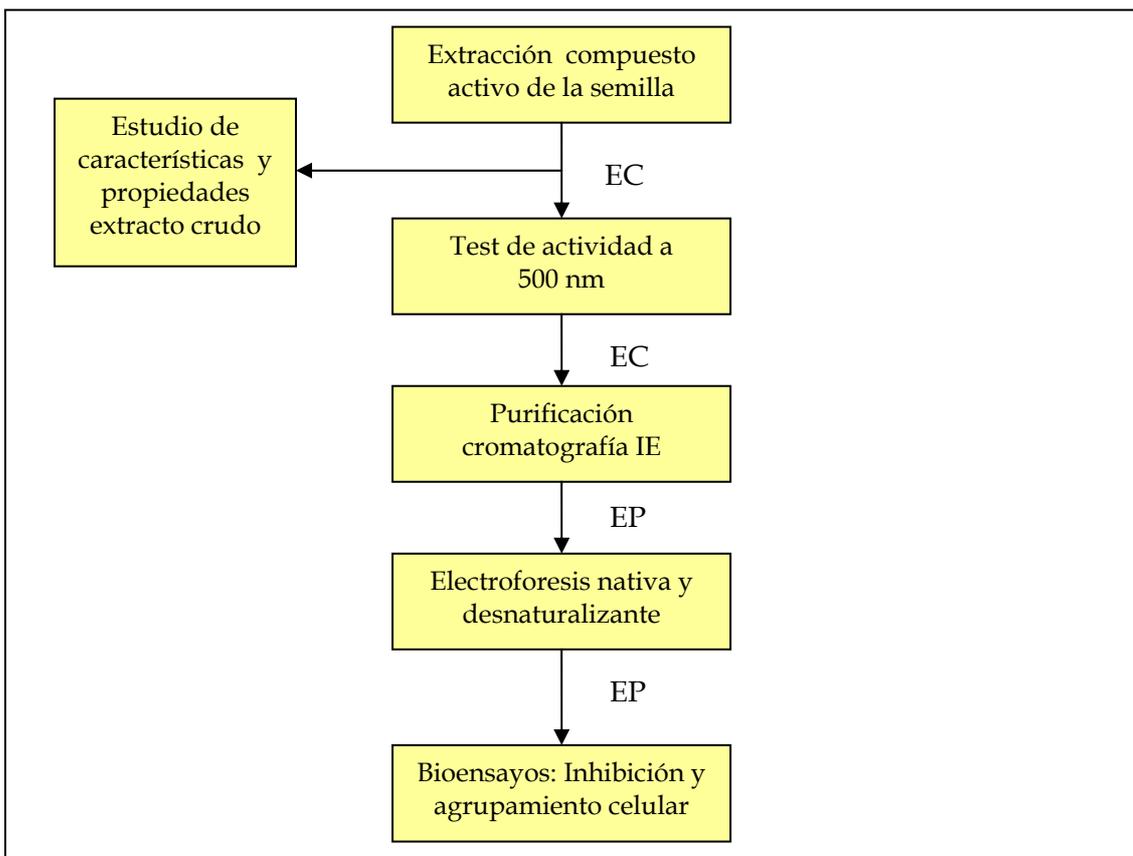


Figura 4.3. Esquema de la metodología de identificación y purificación del extracto crudo.

Fuente: Elaboración propia

4.2.1 Obtención del coagulante crudo primario

En primer lugar, se describirá el protocolo seguido para la extracción del compuesto activo de la semilla, así como los criterios utilizados para la selección de las semillas objeto de estudio, y la metodología utilizada para la preparación de la disolución de agua turbia sintética.

A) Selección de semillas

Las semillas utilizadas en el presente trabajo de investigación fueron seleccionadas teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- se han utilizado semillas que han sido estudiadas en ensayos previos y que han demostrado su actividad coagulante. También se han seleccionado semillas que podrían tener actividad coagulante por ser de familias o géneros similares a las que han sido referenciadas en la bibliografía.
- se han utilizado semillas comunes y de fácil adquisición, con especial atención a los cultivos más extendidos a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo
- se han seleccionado semillas teniendo en cuenta su composición nutritiva, principalmente aquellas que posean un elevado contenido en proteínas y/o polisacáridos. Estudios previos sobre coagulantes naturales indican que dichos compuestos están relacionados con la actividad coagulante de las semillas. Tal es el caso de la *Moringa Oleifera* cuyo compuesto activo es una proteína (Ndabigengesere et al., 1995).

Finalmente, se seleccionaron 21 semillas diferentes procedentes de frutas, legumbres o semillas oleaginosas, que se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Relación de semillas seleccionadas

Fuente: Elaboración propia

Semilla	Nombre común	Nombre botánico
A	Alubia roja	<i>Phaseolus vulgaris</i>
B	Maíz dulce	<i>Zea mays</i>
C	Maíz rojo	<i>Zea mays</i>
D	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>
E	Semillas de girasol	<i>Helianthus annuus</i>
F	Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i>
G	Fruta de la pasión morada	<i>Passiflora edulis</i>
H	Nuez	<i>Juglans regia</i>
I	Avellana	<i>Corylus avellana</i>
J	Lichi	<i>Litchi chinensis</i>
K	Longan	<i>Dimocarpus longan</i>
L	Tamarindo	<i>Tamarindus indica</i>
M	Lino	<i>Linum usitatissimum</i>
N	Duringa	---
O	Alubia blanca o chicoar salvaje	<i>Vigna unguiculata</i>
P	Habichuela	<i>Vicia faba</i>
Q	Lenteja negra	<i>Vigna mungo</i>
R	Garbanzo verde, fríjol chino o judía Mung	<i>Vigna radiata</i>
S	Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>
T	Judía de lima o judión	<i>Phaseolus vulgaris</i>
U	Maíz indio	<i>Zea mays</i>

B) Extracción del componente activo

Las etapas principales que componen el proceso de extracción del compuesto activo de las semillas se muestran de forma resumida en la figura 4.4.

El proceso de extracción del compuesto activo, se inicia con la extracción de las semillas, de las vainas o del interior de las frutas, manualmente o bien con la ayuda de un cuchillo (según el caso) moliéndolas a continuación con ayuda de un mortero. A continuación se procede a la extracción del aceite de las semillas. Para ello, se preparan suspensiones al 5 % (p/v) de semillas pulverizadas en etanol al 95 %. La fracción de sólidos resultantes se deja secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Por último, se procede a la extracción del componente activo de las semillas. Para la extracción, se preparan disoluciones al 5 % (p/v) compuestas por los sólidos secos y los siguientes disolventes: agua destilada, una disolución de NaCl 0,5 M o una disolución amortiguadora de Acetato de Amonio 10mM. Dichas disoluciones se agitan durante 1 hora y finalmente se filtran en un filtro de fibra de vidrio de 0,45 µm (Millipore). El

líquido filtrado, constituye el extracto crudo acuoso (ECA), extracto crudo salino (ECS), o el extracto crudo en tampón de Acetato de Amonio (ECT). El extracto del compuesto activo obtenido se conserva refrigerado a 4° C o bien congelado a -20° C hasta su uso posterior.

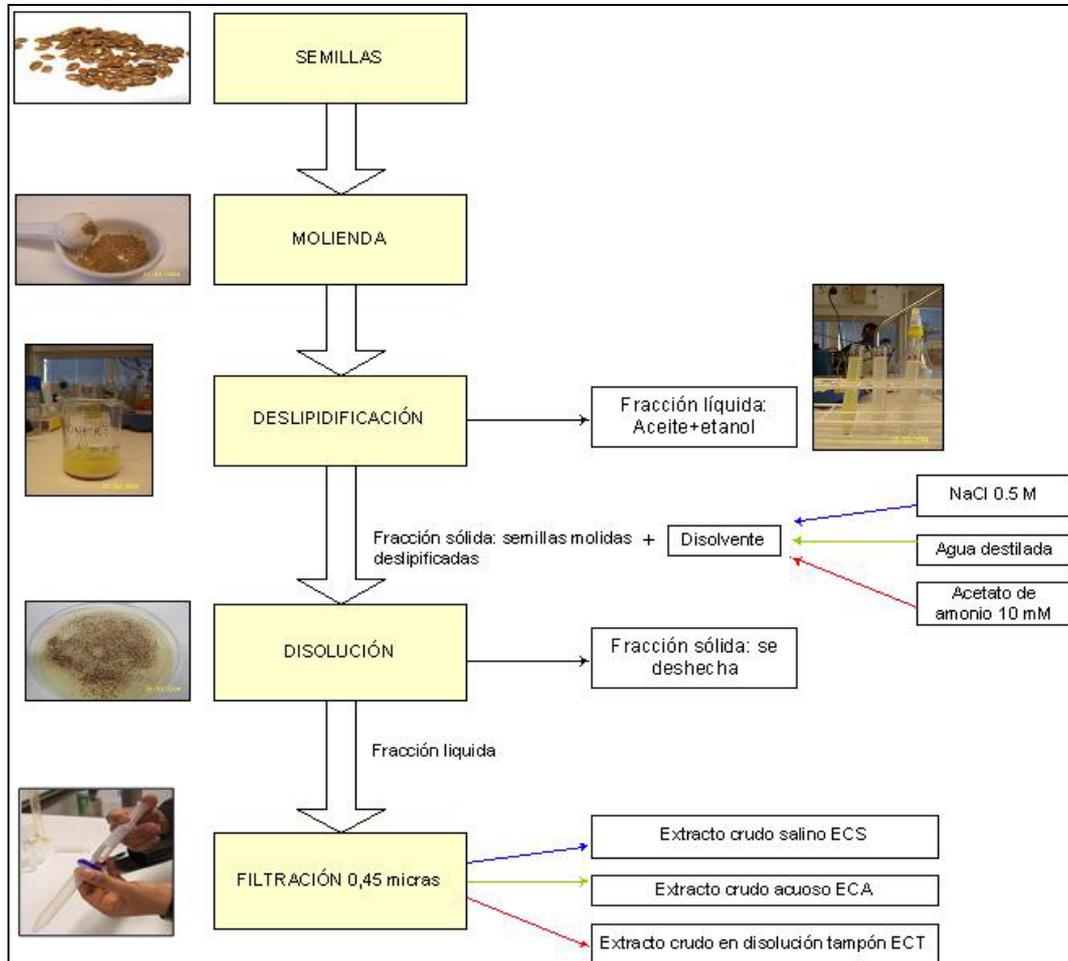


Figura 4.4. Proceso de obtención del extracto crudo
Fuente: Elaboración propia

4.2.2 Test de actividad coagulante primaria

A) Preparación del agua turbia sintética

El protocolo de preparación seguido es el siguiente:

Se prepara una disolución de agua turbia sintética, disolviendo 10 gramos de arcilla caolín (Merck KGaA, Alemania) en 1 L de agua de red. La disolución resultante se agita durante 30 minutos y se deja sedimentar durante 24 horas para permitir la hidratación completa de las partículas de arcilla. Para los ensayos, se preparan disoluciones de distinta turbiedad a partir de dicha disolución.

La tabla 4.2 muestra las principales características físico-químicas del agua de red.

Tabla 4.2 Análisis físico-químico del agua de red.
Fuente: Water quality declaration for 2003

Parámetro	Unidades	Agua de red
Temperatura	°C	7.1
pH	unidades	8.6
Conductividad eléctrica	µS/cm	262
Cl ⁻	mg/l	15
SO ₄ ²⁻	mg/L	44
Ca ²⁺	mg/L	32
Na ⁺	mg/L	12
Mg ²⁺	mg/L	4.7
K ⁺	mg/L	2.6
Coliformes totales a 35°C	UFC/100 mL	< 0.1
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	< 0.1

B) Ensayo de actividad coagulante primaria

Convencionalmente la dosis óptima de coagulante se estima mediante la realización de test de Jar, que utiliza un volumen de agua de entre 1 y 2 litros. Como consecuencia de ello, estos ensayos precisan grandes cantidades de agua problema y de dosis de coagulante, lo que no resulta operativo cuando se pretende estudiar y comparar un elevado número de muestras y de extractos crudos.

Con el fin de facilitar los estudios bioquímicos preliminares, se ha utilizado la metodología desarrollada por el Grupo de Microbiología Aplicada al Medioambiente del Departamento de Biotecnología de la Universidad Hungliga Tekniska Högskolan de Estocolmo (Suecia) basada en una particularización a escala de laboratorio del extendido test de Jar. Consiste en medir la densidad óptica a 500 nm (DO₅₀₀) de una suspensión de agua turbia sintética a la que se le añade un volumen variable del extracto coagulante a estudiar en una cubeta de plástico (10x4x45 mm, Sarsted Aktiengesellschaft & Co, Germany). De esta forma se reduce el volumen de agua turbia sintética necesaria para la realización de los análisis así como la dosis de extracto crudo requerida, permitiendo además la realización de varios ensayos simultáneamente (Ghebremichael et al., 2005).

Para los ensayos se añade una muestra de extracto crudo procedente de la semilla (10 µL) en una cubeta de plástico, aforando el volumen hasta 1 mL con la suspensión de agua turbia sintética previamente preparada con una turbiedad entre 250 y 300 UNT, homogeneizando la suspensión inmediatamente y midiendo la absorbancia inicial a 500 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Modelo Cary 50 Bio). La disolución de la cubeta se deja sedimentar durante 1 hora midiéndose de nuevo la absorbancia a 500 nm, una vez transcurrido ese tiempo. En todos los ensayos de actividad, se realiza la medida de un blanco, compuesto por 10 µL agua ultrapura Mili-Q® y la disolución de agua turbia sintética (valores de absorbancia a 500 nm entorno a 0,1351).

La reducción en el valor de la absorbancia respecto del inicial, define la actividad coagulante primaria del extracto crudo, tal y como se observa en la ecuación 4.1.

$$\text{Actividad Coagulante (\%)} = \frac{((\text{Absorbancia a } t_0) - (\text{Absorbancia a } t_{60}))}{\text{Absorbancia a } t_0} \cdot 100$$

Ecuación 4.1

4.2.3 Determinación de los parámetros de operación de los extractos crudos

A) Diluciones e influencia del factor de dilución

En los casos en que el test inicial de actividad coagulante no ha dado resultados positivos, se preparan muestras diluidas 3, 9, 27 y 81 veces del extracto crudo y se repiten los tests de actividad descritos anteriormente en el apartado 4.2.2.

B) Análisis de la resistencia térmica del compuesto activo

Las proteínas pueden desnaturalizarse durante su extracción, purificación o almacenamiento. De hecho, la temperatura extrema es uno de los factores físicos que desnaturalizan a las proteínas.

Con el fin de estudiar la resistencia térmica de los compuestos coagulantes primarios, se somete a incubación a los extractos crudos de las semillas. Dicho ensayo consiste en incubar los extractos crudos a las temperaturas de 85° C y 95° C durante 30 y 60 minutos. Al finalizar el ensayo, se realiza un test de actividad coagulante a 500 nm con los extractos crudos incubados.

La resistencia térmica de los extractos crudos se determina por comparación de los resultados del test de actividad con los obtenidos para el extracto crudo no sometido a incubación. Una mayor resistencia térmica, permite una mayor facilidad de manejo del extracto durante los ensayos a nivel de laboratorio y en la aplicación real.

4.2.4 Protocolo de purificación del compuesto activo

El protocolo de purificación del compuesto activo, consta de diferentes operaciones que tienen como fin el acondicionamiento del extracto crudo para la aplicación de la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. La metodología seguida en las etapas de acondicionamiento y de intercambio iónico se detalla a continuación.

4.2.4.1 Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

Previo a la purificación y caracterización de la proteína, es necesario realizar una desalación de los extractos crudos salinos (ECS), para evitar que la presencia del NaCl interfiera en las etapas posteriores.

Para la eliminación de sal e impurezas se utiliza la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, en columnas PD-10 (Amersham Biosciences). Tras equilibrar la columna con agua milli-Q®, se pasa 1 mL de ECS, a través de la columna, recogiendo el eluyente de salida en fracciones de 1 mL de volumen, hasta un mínimo de 20 fracciones.

La tabla 4.3 muestra las características de las columnas utilizadas.

Tabla 4.3 Características columna PD-10 Desalting
Fuente: Amersham Biosciences

Matriz	Sephadex G-25 Medium
Rango tamaño partículas	85–260 μm
Volumen lecho	8.3 ml
Altura lecho	5 cm
Limite de exclusión molecular	5000
Estabilidad química	A todas las disoluciones tampón usadas comúnmente
Rango pH trabajo	2–13
Temperatura almacenamiento	+4 a + 30°C

A continuación, se mide la absorbancia de las fracciones eluidas en espectrofotómetro UV-visible (Cary Bio 50) a 280 nm, que permite obtener una medida aproximada del contenido proteico de cada fracción. Las fracciones con absorbancia inferior a 0.1 unidades a 280 nm fueron desechadas.

4.2.4.2 Determinación del contenido proteico del extracto crudo (Método Bradford)

El cálculo del contenido proteico del extracto crudo, es fundamental como paso previo a la purificación de la proteína por cromatografía de intercambio iónico, ya que si el contenido del extracto es inferior a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ será necesario proceder a una etapa de concentración previa a la cromatografía. Uno de los principales motivos para proceder a la concentración es que durante la cromatografía de intercambio iónico el contenido en proteína del extracto crudo se diluye al separarlo en fracciones, e impide que el extracto muestre su eficacia en el test de actividad posterior.

El método Bradford consiste en elaborar un curva patrón de calibrado de una proteína comercial conocida, que relacione la absorbancia a 595 nm con la concentración de proteína y extrapolar a continuación los resultados para calcular el contenido en proteína de la muestra problema.

Para preparar la curva de calibrado, se empleó una proteína patrón comercial (Seroalbúmina bovina (BSA) en disolución de 1 mg/mL) en un rango de 2 a 10 microgramos, adicionando 200 μL de reactivo coloreado (disolución ácida de Azul de Coomassie R-250) y midiendo, transcurridos 3 minutos, la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro UV-visible (Cary Bio 50) a 595 nm.

A continuación, se determinó la concentración de proteína existente en un volumen de 2 o 5 μL de extracto crudo ECA, ECS y ECT, seleccionando sólo aquellos extractos cuya absorbancia a 595 nm fue superior 0.1 unidades.

4.2.4.3 Concentración

En los casos en los que el contenido proteico del extracto crudo es inferior a 1.5 μg , se procede a la concentración de la muestra.

Dado que se trabaja con extractos crudos que contienen proteínas, estas pueden desnaturalizarse a elevadas temperaturas y perder su capacidad coagulante, por lo que su concentración debe realizarse a bajas temperaturas, mediante la evaporación a vacío.

El equipo utilizado para la concentración de la proteína fue un Concentrador (Speed Vac Plus Sc 110 A. Savant), en los que se introdujo el extracto con capacidad coagulante durante 10 minutos.

4.2.4.4 Purificación por cromatografía de intercambio iónico (CIE)

La purificación del compuesto activo (Ghebremichael et al., 2006) se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico. La aplicación de dicha técnica tuvo lugar en un equipo de intercambio iónico Äkta Hi-Pressure explorer (Pharmacia Biotech) con columna intercambiadora catiónica CM Sepharose™ de flujo rápido (Amersham Biosciences) de 1 mL.



Figura 4.5 Equipo Äkta de purificación. Detalle de la columna CM Sepharose™

Fuente: Elaboración propia

La purificación del extracto crudo consta de las siguientes etapas:

1. Equilibrado

En primer lugar, la columna es equilibrada con una disolución tampón de Acetato de Amonio 10 mM (pH 6,7).

A continuación, se establece el flujo de paso a través de la columna (concretamente 2 mL/min) y se programa el colector automático de fracciones, para que realice la recogida de las muestras cada 5 mL inicialmente .

2. Inyección de la muestra y adsorción

La muestra a purificar se prepara diluyendo el extracto crudo (previamente concentrado y centrifugado) al 10 % en una disolución de tampón de Acetato de Amonio 10 mM (pH 6,7). Una vez preparada, se hace pasar a través de la columna, incluyendo además un volumen adicional 2 a 5 mL de tampón. Cuando el gráfico de medidas de absorbancia a 280 nm refleja la inyección de la muestra, se procede a la recogida de las fracciones líquidas a la salida de la columna de intercambio iónico cada 5 mL. Las fracciones así obtenidas constituyen la fracción libre o “unbound”.

3. Elución de las proteínas adsorbidas con un gradiente de NaCl 1M

Posteriormente, se procede a la elución de las proteínas unidas a la resina de intercambio iónico mediante la inyección de una solución de NaCl 1M. Se programa el colector de fracciones para proceder a la recogida de las fracciones líquidas cada 1 mL (constituyen la fracción unida o “bound”).

Durante la purificación, el contenido en proteína de las muestras eluidas se determina automáticamente en continuo por medida de la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones así obtenidas se someten al test de actividad seleccionando las muestras que presentaron actividad coagulante para su utilización en ensayos posteriores.

4. Limpieza (regeneración) de la columna

La última etapa de la purificación es la limpieza de la columna. En ella se eliminan las sustancias adsorbidas sobre los centros activos de la resina, que no fueron desorbidas tras la aplicación del gradiente salino.

La regeneración que se realiza a continuación, consiste en hacer circular a través de la columna de intercambio iónico 40 mL de una disolución de NaOH 1M. Si la columna va a ser utilizada en el futuro, esta se debe conservar en una disolución de etanol al 20%.

4.2.5 Identificación y caracterización de la proteína activa

Con la finalidad de evaluar la pureza y el peso molecular de las fracciones purificadas activas, se emplea la técnica de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y electroforesis en gel nativo.

4.2.5.1 Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

El protocolo seguido fue llevado a cabo teniendo en cuenta las indicaciones de Hultmark (Hultmark et al, 1983).

La electroforesis se llevó a cabo en un set de Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories, Watford, UK).

A) Preparación y composición de los geles

Las disoluciones necesarias para preparar los geles se realizan siguiendo el protocolo desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). La composición de las disoluciones tampón se muestra en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Composición de las disoluciones amortiguadoras para SDS-PAGE.

Fuente: Fling y Gregerson, 1986

Tampón para Gel Resolutivo a pH 8.85	Concentración	Concentración final	Para 100 mL
Tris(hidroximetil)aminometano (tris)	3M	0.75 M	36.33 gramos
Dodecil Sulfato Sódico (DSS)	0.4 %	0.1 %	0.40 gramos
Tampón para Gel de Apilamiento a pH 6.8	Concentración	Concentración final	Para 100 mL
Tris(hidroximetil)aminometano (tris)	0.5M	0.125 M	6.06 gramos
Dodecil Sulfato Sódico (DSS)	0.4 %	0.1 %	0.40 gramos

La composición de los geles se muestra en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Composición de los geles para SDS-PAGE.

Fuente: Fling y Gregerson, 1986

	Gel Resolutivo al 10 % (14 -200 KDa)	Gel de apilamiento al 3.5 %
Acrilamida/Bisacrilamida	2.5 mL	0.5 mL
Tampón (4*Resolutivo)	2 mL	---
Tampón (4*Apilamiento)	---	1 mL
Agua	3.5 mL	2.5 mL
Persulfato amónico (APS) al 10%	40 uL	40 uL
N, N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED)	4 uL	4 uL

Una vez preparadas las mezclas de ambos geles, se transfiere en primer lugar el gel separador al soporte de vidrio hasta llenar aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes del mismo. A continuación, se cubre la superficie superior con n-butanol y se deja polimerizar durante 30 minutos. Tras la polimerización del gel separador, se procede a transferir la mezcla del gel de apilamiento al soporte anterior, situando el peine que formará las celdas o pocillos en la parte superior y dejándolo polimerizar a continuación durante 30 minutos más.

Cuando ambos geles están polimerizados, se retira el peine y se procede a la descarga de la muestras. Finalmente se introduce el soporte con el gel en la cubeta de electroforesis que contiene el tampón de migración o transportador y se inicia la electroforesis.

En la figura 4.6 se observa el instante de la polimerización del gel de apilamiento en el set de electroforesis y el aspecto del gel tras retirar el peine separador.

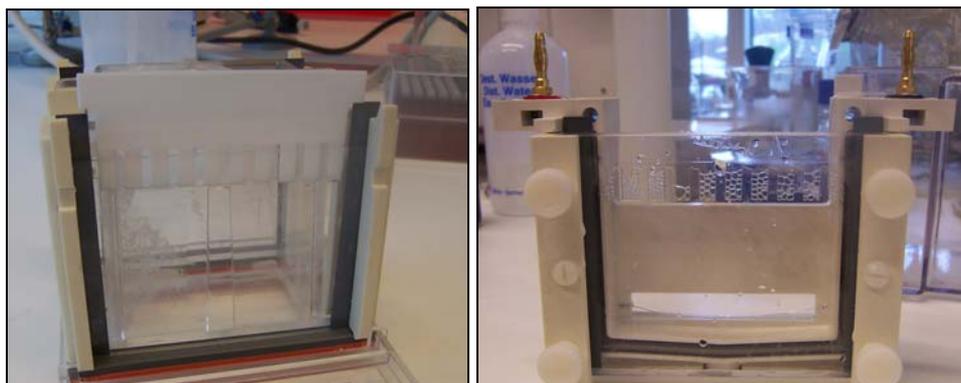


Figura 4.6 Equipo de electroforesis y polimerización de los geles de apilamiento y resolutivo
Fuente: Elaboración propia

B) Preparación de la muestra

Previamente a la preparación de la muestra es necesario estimar el contenido de proteína del extracto crudo a purificar por el método Bradford, con el fin de decidir el método de revelado que se elegirá para el gel y de no exceder el volumen de carga de cada celda.

La muestra a cargar se prepara diluyendo en primer lugar el extracto purificado en un volumen calculado del tampón 4x Fling & Gregerson (55 mM tris-HCl pH 6.8, disolución al 2 % de Dodecil Sulfato Sódico, disolución al 4 % de 2-mercaptoetanol, disolución al 0,6 % de azul de bromofenol y disolución al 7 % de glicerol) y calentando la disolución a 95° C durante 5 minutos, con el fin de desnaturalizarla. Finalmente, se centrifuga y se descarga en el gel.

Adicionalmente, se prepara también una muestra patrón con una proteína conocida (LMW Calibration Kit for SDS 14000-97000 Electrophoresis Protein Mixture, Amersham Biosciences) que actúa como marcador.

El marcador LMW muestra las bandas que se indican en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Composición del marcador LMW para electroforesis
Fuente: Amersham Biosciences

Proteínas	Peso molecular (Da)	Procedencia	Cantidad (µg)
Fosforilasa	97000	Tejido muscular conejo	67
Albúmina de suero	66000	Suero bovino	83
Ovoalbúmina	45000	Clara de huevo de gallina	147
Anhidrasa carbónica	30000	Eritrocito bovino	83
Inhibidor de tripsina	20100	Soja	80
□-Lactoalbumina	14400	Leche bovina	116

C) Condiciones de electroforesis

Antes de introducir las muestras en los geles, se rellena la cubeta con el tampón transportador (también conocido como "Running"), cuya composición se muestra en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Composición del tampón transportador para SDS-PAGE
Fuente: Fling y Gregerson, 1986

Tampón transportador	Concentración	Concentración final	Para 100 mL
Tris(hidroximetil)aminometano	0.05 M	0.05 M	6.06 gramos
Glicina	1.92 M	0.19 M	14.41gramos
Dodecil Sulfato Sódico (DSS)	1 %	0.1 %	1 gramo

La electroforesis se realiza a temperatura ambiente, siguiendo la siguiente secuencia de voltaje: primero un voltaje constante de 90 V hasta que las muestras abandonan el gel de apilamiento y luego un voltaje de 100-110 V hasta que la banda teñida alcanza la parte inferior del gel.

D) Fijación y revelado

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se retiran de las láminas de cristal y se introducen en una bandeja de plástico que contiene la disolución fijadora. Los métodos de revelado utilizados son: el revelado con Azul Brillante de Coomassie R-250 y la tinción en plata. La principal ventaja del método de revelado con tinción en plata es que es 10 veces más sensible que el método Azul Brillante de Coomassie R-250.

-Revelado con azul brillante de Coomassie R-250

La solución de tinción (solución "staining" en inglés) está compuesta por 10 % de ácido acético, 40 % de metanol y 0,1 % de Azul Brillante de Coomassie R-250. Se añaden 100 mL de dicha solución en la bandeja que contiene los geles y se deja con una leve agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se retira la solución de tinción y se guarda para su reutilización posterior. Por último, se cubre el gel con la solución de revelado ("distaining" en) y se deja en agitación durante 1-2 horas. Finalmente, los geles revelados se conservan en una solución de ácido acético al 7 %.

-Revelado con tinción de plata

Para llevar a cabo este método de revelado, el gel se introduce en un recipiente de plástico que contiene la solución fijadora compuesta por 50 % de metanol, 12 % de ácido acético y 0,1 % de formaldehído durante 2 horas.

Seguidamente, se enjuaga el gel con una solución de metanol al 50 %, remplazando la solución 3 veces, una cada 20 minutos.

El siguiente paso consiste en sensibilizar el gel mediante una disolución de tiosulfato sódico (0,4 gramos para 200 mL) durante 1 minuto, lavar con agua destilada el gel y sumergirlo durante 15 minutos en 200 mL de una disolución que contiene nitrato de plata (0,4 gramos) y formaldehído (160 µL).

Finalmente, se revela el gel con una solución de carbonato sódico (12 gramos en 200 mL), 100µL de formaldehído y 2 gotas de la solución de tiosulfato sódico empleada en la etapa anterior. El gel revelado se enjuaga con agua destilada y se almacena en una disolución de ácido acético al 7 %.

4.2.5.2 Protocolo de gel nativo

Para la aplicación de la electroforesis en gel nativo, se parte de la hipótesis que el compuesto responsable de la actividad coagulante observada en el extracto de las semillas es una proteína básica con carga positiva. Dicha hipótesis se basa en los estudios previamente realizados por otros autores para la *Moringa oleifera* en los que se demostró que la actividad coagulante se debe a una proteína de dichas características (Gassenschmidt et al., 1995; Ndabigengesere et al., 1995).

Por ello, en los ensayos realizados para geles nativos se utilizó el protocolo nativo ácido, recomendado para proteínas con punto isoeléctrico superior a 7 unidades.

En la electroforesis nativa de proteínas básicas se usan generalmente geles ácidos o de urea. Sin embargo, algunas proteínas se desnaturalizan al ser sometidas a pH muy bajos o debido a la presencia de urea, por lo que la movilidad de las proteínas bajo estas condiciones puede no estar en consonancia con su conformación y las interacciones proteína-proteína que tienen lugar de forma habitual a pH neutro se pueden ver alteradas.

Por esta razón, se eligió realizar la electroforesis del gel en condiciones nativas, a pH 6,1 y en ausencia de urea.

A) Protocolo Nativo Ácido

-Preparación de las disoluciones

Las disoluciones necesarias para preparar los geles se realizaron teniendo en cuenta las instrucciones de la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Composición de las disoluciones para Protocolo Nativo Ácido.

Fuente: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/index.html>

Nombre	Volumen (mL)	KOH 1M (mL)	AcH (mL)
Solución Almacén o "Stock" n° 1 1.5 M Acetato-KOH pH 4.3	200	48	17.2
Solución Almacén o "Stock" n° 2 0.25 M Acetato-KOH pH 6.8	200	48	2.9

También se preparó la **Solución Almacén n° 3** compuesta por 30 % de acrilamida y 0,8 % de metilen-bis-acrilamida y la **Solución Almacén n° 4** compuesta por 10 % de persulfato amónico. Ambas, se conservaron refrigeradas a 4° C.

Asimismo se prepararon otras disoluciones, que se utilizan para el acondicionamiento de la muestra y como medio para realizar la electroforesis:

- El **tampón de migración o transportador (Running) 1x** se prepara diluyendo 18.7 gramos de β – Alanina en 4.8 mL de Acido acético y aforando con agua destilada hasta 600 mL, previo equilibrado del pH a 4.3) conservándolo a temperatura ambiente.

- Disolución **tampón nativo 5x** compuesto por 1.45 mL de Glicerol al 50 %, 0.5 mL de Solución de Stock nº 2 y trazas de Verde de Metilo.

-Preparación de los geles

La composición de los geles se muestra en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Composición de los geles para Protocolo Nativo Ácido.

Fuente: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/index.html>

Composición del gel de separación o "Separating"	
Solución Stock nº 1	1.5 mL
Solución Stock nº 3	3.75 mL
Agua	4.55 mL
10 % APS	140 uL
TEMED	50 uL
Composición del gel de apilamiento o "Stacking"	
Solución de Stock nº 2	1 mL
Solución de Stock nº3	375 µL
Agua	2.4 mL
10 % APS	37.5 µL
TEMED	3.75 µL

En primer lugar, se prepara la disolución del gel de separación. Una vez preparada, se introduce en el casete de electroforesis hasta cubrir tres cuartos de la altura total del cristal y se sella con n-butanol como en el caso anterior. Después de 30 minutos, se enjuaga el gel polimerizado para eliminar el n-butanol.

A continuación, se prepara el gel de apilamiento transfiriendo la mezcla correspondiente al soporte de vidrio, e insertando el peine hasta que el gel polimerice. Una vez polimerizado, se extrae el peine y se procede a descargar las muestras previamente preparadas.

-Preparación de las muestras

La preparación de las muestras en este caso, consiste en añadir al menos 10-20 µg de proteína, y disolverla en tampón nativo 5x sin calentarla en presencia de DSS antes de introducirla en el gel.

-Condiciones de electroforesis

En este método, es necesario invertir la polaridad de los electrodos para evitar la pérdida de la muestra, por tanto el electrodo negativo está en el fondo de la cubeta y el positivo en la parte superior de la misma. Se lleva a cabo durante 3 horas a 30 mA/250V.

Una vez finalizada la electroforesis, no se realiza fijación ni revelado. Se sitúa el gel sobre una hoja de plástico milimetrada, se corta en láminas que se corresponden con cada celda del gel polimerizado y a continuación se corta horizontalmente en trozos de 0.5 cm que se conserva con 500 µL de agua destilada milli-Q. Finalmente, se realiza un test de actividad a 500 nm, tomando 50 µL de muestra en este caso.

B) SDS-PAGE no desnaturizante

Se sigue la misma metodología que para el caso del SDS-PAGE (ver apartado 4.2.5.1) con la única diferencia de que no se emplea DSS y cada muestra a introducir en el gel debe contener al menos 10 microgramos de proteína.

Una vez finalizada la electroforesis, se siguen el mismo procedimiento indicado para el protocolo nativo ácido.

4.2.6 Evaluación de las propiedades antimicrobianas del extracto

A continuación se describen los bioensayos realizados con el fin de estudiar la actividad bactericida de los coagulantes procedentes de las semillas seleccionadas para el estudio.

Antes de describir las metodologías de cada ensayo, se tendrán en cuenta consideraciones generales acerca de la técnica utilizada para la preparación de medios de cultivo y la siembra de los microorganismos.

A) Preparación de los cultivos

-Medio líquido de cultivo

La composición del medio líquido de cultivo se indica en la tabla 4.10.

Tabla 4.10 Composición del medio líquido de cultivo
Fuente: Bertani, 1951; Luria et al., 1960

Disolución	Composición
Medio de cultivo Luria Bertani LB 5x	Tryptona 10 gramos Extracto de levadura 5 gramos NaCl 10 gramos 200 mL de agua destilada.
Solución tampón fosfato 5x (pH 7.2)	28 mL de NaH ₂ PO ₄ 1 M 72 mL de Na ₂ HPO ₄ 1 M.
Agua milli Q	-----

Para su preparación, se procede como se indica a continuación. En primer lugar se prepara el medio de cultivo LB 5 x, disolviendo en un matraz 10 gramos de triptona, 5 gramos de extracto de levadura y 10 gramos de NaCl en 200 mL de agua destilada y agitando hasta conseguir una disolución homogénea. A continuación se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Seguidamente, se prepara la solución tamponada de fosfato y se esteriliza mediante autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Finalmente se prepara el medio líquido de cultivo compuesto por 60 mL de agua milli-Q esterilizada, 20 mL de disolución de tampón fosfato y 20 mL de medio de cultivo LB 5x.

-Medio sólido de cultivo

La composición del medio sólido de cultivo se indica en la tabla 4.11.

Tabla 4.11 Composición del medio sólido de cultivo
Fuente: Bertani, 1951; Luria et al., 1960

Disolución	Composición
Medio de cultivo Luria Bertani LB 5x (Bertani, 1951; Luria et al., 1960)	Tryptona 10 gramos Extracto de levadura 5 gramos NaCl 10 gramos 200 mL de agua destilada.
Nutriente	4 gramos/ 500 mL
Agar	7,5 gramos/ 500 mL

Para su preparación, se disuelven en el medio LB 5 x, el agar y el nutriente y se somete a autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

B) Siembra e incubación

La siembra de las bacterias en medio sólido se realizó en placas Petri. El medio de cultivo sólido (compuesto por medio LB y agar nutriente) es esterilizado en autoclave y una vez enfriado hasta 50-60 °C, se vierte en placas Petri de plástico esterilizadas y se deja solidificar. Finalmente, se realiza la siembra con cepas previamente cultivadas y la incubación en una estufa a 37° C durante 24 horas.

La siembra en medio líquido se lleva a cabo a partir de las cepas cultivadas en medio sólido, sometiéndose como en el caso anterior a incubación a 37° C durante 24 horas.

4.2.6.1 Test de crecimiento

El test de crecimiento tiene como fin observar la evolución del crecimiento del cultivo, de una determinada cepa, previamente tratada con extracto coagulante, a través de la densidad óptica a 620 nm. Dicho ensayo permite asimismo verificar la inhibición o ralentización del crecimiento celular, como consecuencia de la adición del extracto coagulante.

A) Materiales y equipos utilizados

Para llevar a cabo las medidas de densidad óptica se utilizó un espectrofotómetro de múltiple detección (modelo FLUOstar OPTIMA de BMG Labtechnologies) que realiza cada 400 segundos medidas de temperatura, tiempo y absorbancia para cada celda de la placa ELISA.

Las cepas de microorganismos utilizadas son: *Escherichia coli* cepas D-31 y D-21, *Escherichia coli* cepa K-12, *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus* y *Bacillus thuringiensis* Bt 5, Bt 7 y Bt 75.

El rango de concentraciones de los extractos purificados estudiadas son de 0.1-10 µg/mL para el ensayo A y 0.2-0.6 mg/mL para el ensayo B.

B) Preparación del cultivo líquido

La realización de un test de crecimiento, precisa un medio líquido inoculado. El procedimiento seguido para la inoculación se muestra en la figura 4.7. En primer lugar, se toma una pequeña cantidad de inóculo de bacterias de la placa Petri cultivada y se introduce en un tubo de ensayo, que contiene el medio líquido de cultivo.

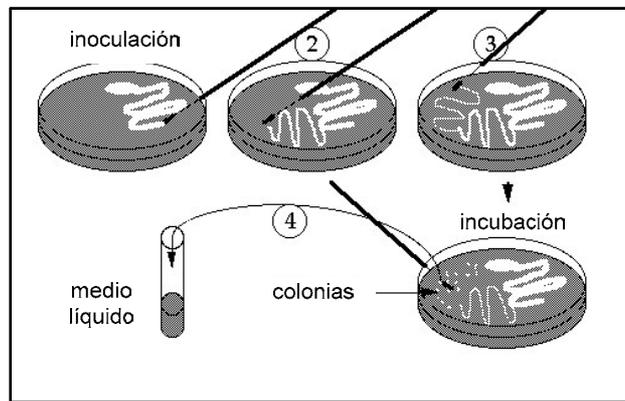


Figura 4.7. Inoculación en placas Petri y preparación de cultivos líquidos

Fuente: www.wordiq.com/definicion/Agar_plate

Los tubos de ensayo se someten a incubación en un incubador agitado a 37°C durante toda la noche (12 horas). Transcurrido ese tiempo, se mide la densidad óptica de 1 mL de cultivo líquido a 620 nm.

C) Diluciones

Para medir la evolución del crecimiento del cultivo, se precisa partir de valores de densidad óptica a 620 nm que estén en el rango de 0,09-1 unidades de absorbancia ya que, de lo contrario, al cabo de 18 horas de test, los valores están por encima del límite de detección del instrumento.

Con el fin de disponer del rango de concentración adecuado al límite de detección del incubador, se realizan las diluciones necesarias del cultivo con agua destilada y se mide la densidad óptica de la muestra diluida.

D) Inoculación en placa ELISA

Previo a la inoculación de las muestras en la placa ELISA (Greiner bio-one), se realiza una planificación de la distribución de las mismas en la placa, teniendo en cuenta las siguientes premisas:

- Cada cultivo se situará en una columna diferente, y las 2 primeras filas serán ocupadas siempre por la muestra blanco o control (medio + cultivo).
- Cada celda se rellena con 150 μ L como máximo para evitar la contaminación entre celdas.
- Las celdas de los extremos diagonales se dejan libres.

- Las columnas 1 y 12 y la fila 8, se rellenan con 150 μ L del medio de cultivo diluido 10 veces. De esta forma, se verifica que no hay contaminación microbiológica exterior de la placa inoculada.
- El llenado de las celdas se realiza siguiendo el siguiente orden: agua destilada, muestra de extracto purificado y finalmente el medio líquido inoculado.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Medio	Blanco	Medio									
Medio	K-12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	D-21	Medio
Medio	K-12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	D-21	Medio
Medio	K-12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	D-21	Medio
Medio	K-12	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	D-21	Medio
Medio	K-12	D-21	D-31	Psed	Staph	Bt-5	Bt-7	Bt-75	K-12	D-21	Medio
Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio

Figura 4.8. Placa ELISA inoculada de 96 celdas

Fuente: Elaboración propia

Una vez inoculada, la placa se incuba durante 18 horas a una temperatura de 37° C midiendo, cada 400 segundos, la absorbancia a 620 nm. Previamente a cada medida, el incubador agita los cultivos durante 5 minutos, garantizando la homogeneidad de la muestra.

E) Test realizados

Los test realizados son:

Test A

- Concentración de proteína coagulante estudiada: 0.1 μ g/mL; 0.5 μ g/mL; 1 μ g/mL; 5 μ g/mL; 10 μ g/mL.
- Bacterias estudiadas: *Escherichia coli* cepas K-12, D-21 y D-31, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Test B

- Concentración de proteína coagulante estudiada: 0.2 mg/mL y 0.6 mg/mL.
- Bacterias estudiadas: *Escherichia coli* cepas K-12 y D-31 y *Pseudomonas*.

4.2.6.2 Test de agrupación celular (“Clumping test”)

Los bioensayos con coagulantes naturales se completan finalmente con la realización de un test de floculación celular. Dicho ensayo tiene como fin observar la formación de

agrupamientos o flóculos de bacterias presentes en un medio líquido, debido a la acción del compuesto activo de la semilla coagulante.

Los experimentos realizados con *Moringa oleifera* por algunos autores han demostrado la capacidad de dicha semillas para formar agrupamientos celulares. Dichos agrupamientos, provocan la inmovilización de las bacterias que los componen su inactivación, deformaciones o el exudado del citoplasma celular (Ghebremichael et al, 2005).

-Procedimiento experimental

En primer lugar, se procede a la preparación del cultivo celular. Para ello, se centrifugan los cultivos en medio líquido de *Escherichia coli* cepas K-12, D-21 y D-31, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus turigensis* cepas 5, 7 y 75 a 10.000 rpm durante 1 minuto. A continuación, se retira el sobrenadante y al "pellet" (bacterias) remanente, se le añade medio de cultivo líquido diluido 10 veces. Seguidamente, se vuelve a centrifugar, descartando de nuevo el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en medio de cultivo líquido diluido 10 veces.

Una vez preparado el cultivo, se toman 80-90 μL de este y 10-20 μL de la muestra a ensayar (extracto purificado de las semillas seleccionadas), y se vierten en un tubo eppendorf. Por último se incuban a 37° C durante 3 horas.

La capacidad de formación de flóculos celulares que posee el extracto activo, se determina observando al microscopio (Olympus BX51 con AnalySIS) la muestra incubada, comparándola con el control o blanco (compuesto por los cultivos incubados, sin adición de extracto purificado). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Sony PC 120).

4.3 Metodología en la aplicación real

Tras el estudio de las semillas seleccionadas a nivel de laboratorio, y una vez establecidas sus propiedades y el protocolo de trabajo, se lleva a cabo la aplicación real de la técnica en la provincia de Azuay (Ecuador), donde el proyecto AQUAPOT desarrolla su actividad en los últimos tres años.

La aplicación real ha consistido principalmente, en la aplicación del protocolo de trabajo para la extracción del compuesto activo de las semillas utilizando los recursos disponibles a nivel local, así como el estudio y la verificación de las propiedades coagulantes y antimicrobianas de los extractos crudos, en aguas superficiales naturales.

4.3.1 Protocolo para la extracción del compuesto activo

En primer lugar, se describirá el protocolo seguido para la extracción del compuesto activo de las semillas, así como los criterios utilizados para la selección de estas y la metodología utilizada tanto para la preparación de la disolución de agua turbia sintética como para la recogida del agua natural a tratar.

A) Selección de semillas

Las semillas utilizadas fueron especies endémicas de la sierra andina ecuatoriana, que se caracterizan principalmente por su bajo coste y fácil adquisición. Las semillas fueron adquiridas en el mercado local de Girón, capital del cantón del mismo nombre situada en la provincia de Azuay (Ecuador).

Se seleccionaron 3 semillas, concretamente maíz amarillo (*Zea mays*), maíz blanco (*Zea mays*) y habas (*Vicia faba*), atendiendo a los alentadores resultados obtenidos previamente en los ensayos a escala de laboratorio.

B) Extracción del componente activo

Las principales etapas que componen el proceso de extracción del compuesto activo de las semillas, se representan en la figura 4.9.

La primera etapa es la trituración o molienda. En ella, las semillas se muelen con ayuda de un molinillo común en el ámbito doméstico de la zona, y se tamizan a continuación empleando un colador, con una luz de malla de 0,5 mm. Seguidamente se procede a la extracción del aceite de las semillas. Para ello, se preparan suspensiones al 5 % (p/v) de semillas pulverizadas en etanol, concretamente trago de punta de 65° previamente filtrado adquirido en una destilería de caña de azúcar de la localidad. Tras agitar la disolución durante 30 minutos, esta se deja en reposo durante 1 hora. Una vez transcurrido ese tiempo se elimina el sobrenadante utilizando una pipeta, y la fracción de sólidos resultante se deja secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Seguidamente, se procede a la extracción del componente activo de las semillas. Para ello, se preparan disoluciones al 5 % (p/v) compuestas por los sólidos secos y los siguientes disolventes: agua destilada, una disolución de NaCl 0,5 M, una disolución de NaCl 0,25 M y una disolución de NaCl 0,125 M. Dichas disoluciones se agitan durante 1 hora, y una vez transcurrido ese tiempo, se filtran en un filtro de tela.

El líquido filtrado constituye el extracto crudo acuoso (ECA) si fue obtenido a partir de la disolución con agua destilada, el extracto crudo salino (ECS1) si fue obtenido a partir de la disolución de NaCl 0,5 M, el extracto crudo salino (ECS2) si utilizó como disolvente la disolución de NaCl 0,25 M, o el extracto crudo salino (ECS3) si utilizó como disolvente la disolución de NaCl 0,125 M.

La fracción líquida obtenida se utilizará posteriormente en los ensayos de actividad coagulante y capacidad antimicrobiana.

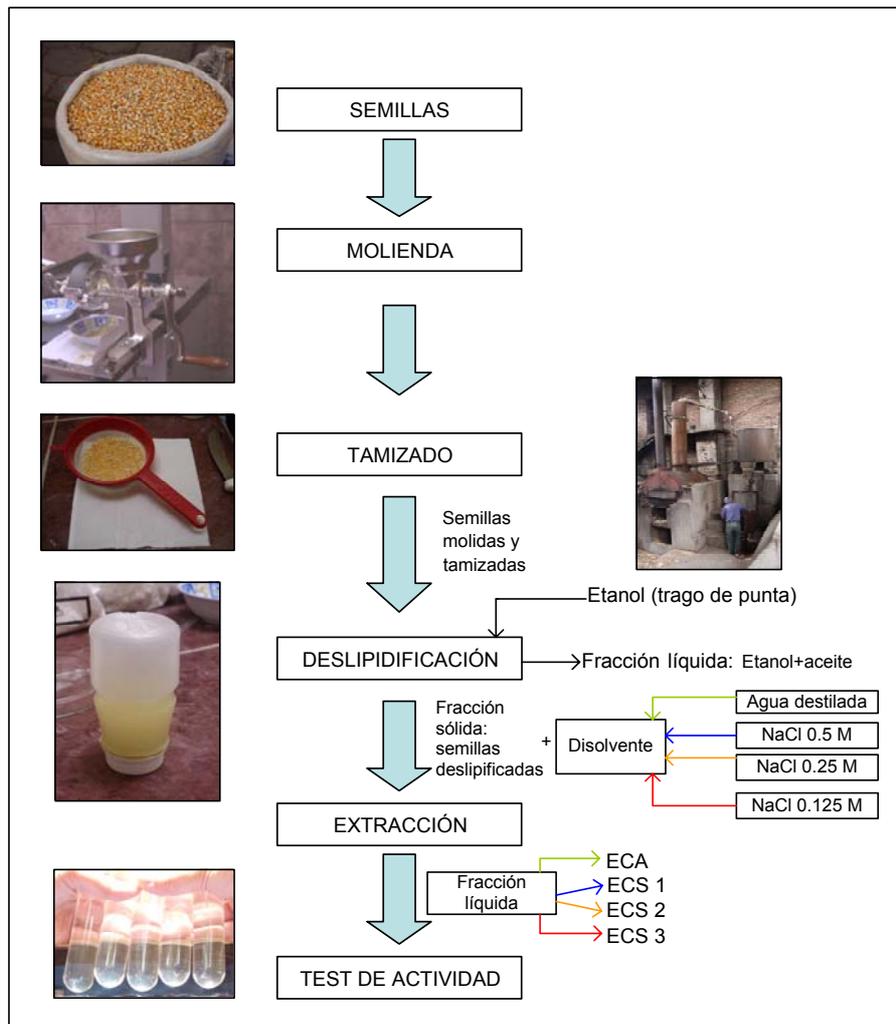


Figura 4.9. Proceso de obtención del extracto crudo en aplicación real
Fuente: Elaboración propia

4.3.2 Estudio de las propiedades coagulantes

La evaluación de las propiedades coagulantes de los extractos crudos obtenidos se realiza mediante test de actividad.

Dado los escasos recursos existentes en la zona donde se llevó a cabo la aplicación real, los test de actividad coagulante se realizaron de forma cualitativa observando la reducción en la turbiedad del agua tratada con el extracto de la semilla, por comparación visual con el blanco.

Los test de actividad se realizaron utilizando disoluciones de agua turbia sintética y agua superficial procedente de quebrada y de río.

A) Preparación del agua turbia sintética

Para preparar la disolución de agua turbia sintética, se pesan 5 gramos de caolín B en la balanza analítica (marca DHAUS modelo Scout Pro rango 4000 g), y se disuelven en 500 mL agua purificada envasada sin gas, de la marca PURE WATER®. La suspensión resultante, se vierte en una botella de plástico y se agita durante 1 hora. A

continuación, se deja sedimentar durante 24 horas, para facilitar la hidratación de las partículas de arcilla.

La tabla 4.12 muestra las principales características físico-químicas del agua purificada.

Tabla 4.12 Análisis físico-químico del agua purificada
Fuente: Elaboración propia

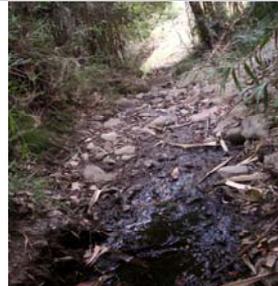
Parámetro	Valor
pH (unidades)	6
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	4.46
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	19.8

B) Agua natural superficial

El agua superficial natural utilizada en los ensayos, fue recogida en tres emplazamientos diferentes: río, quebrada y un reservorio, que suministra agua a la aldea de Pillincay en la sierra andina ecuatoriana.

Las propiedades físico-químicas de las aguas utilizadas se resumen en la tabla 4.13.

Tabla 4.13 Análisis físico-químico del agua superficial
Fuente: Elaboración propia

Origen	Punto de toma de muestra	Parámetro		
		pH (unidades)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Río Girón	 	6-7	97.8	20
Quebrada Girón	 	6-7	152.3	16
Reservorio Pillincay	 	6-7	34.6	13.7

C) Ensayo de actividad coagulante

Se llevan a cabo dos ensayos diferentes:

- en tubo de ensayo, utilizando un volumen de 30 mL de agua cruda.
- en botellas de 600 mL de capacidad, utilizando un volumen de 400 mL de agua cruda.

Para el test en tubo de ensayo, se añade 150 μ L de extracto crudo procedente de la semilla estudiada, en un tubo de ensayo (marca PIREX de dimensiones 25 x 150 mm) y se afora el volumen hasta 30 mL con la suspensión de agua turbia sintética previamente preparada o el agua superficial recogida. La disolución resultante, se homogeneiza y se deja sedimentar durante 1 hora. El mismo ensayo se repite para volúmenes de extracto crudo de 300 μ L y 600 μ L. En todos los ensayos de actividad, se prepara un blanco, compuesto por 150 μ L, 300 μ L ó 600 μ L de agua destilada y la disolución de agua turbia sintética o agua superficial, según el caso.

Para el ensayo realizado en botella de plástico de 600 mL, se añade 2 mL de extracto crudo procedente de la semilla, en 400 mL del agua cruda a tratar, agitando el contenido para homogeneizar la mezcla y dejándolo sedimentar durante 60 minutos. El mismo ensayo se repite para 4 mL de extracto crudo.

En ambos casos, una vez transcurrido el tiempo de sedimentación, se determina cualitativamente el efecto coagulante del extracto ensayado sobre el agua tratada por comparación con el blanco, observando tanto la clarificación obtenida con la formación de precipitados en el agua tratada.



Figura 4.10 Test de actividad cualitativo en la aplicación real

Fuente: Elaboración propia

4.3.3 Estudio de las propiedades antimicrobianas

La evaluación de las propiedades antimicrobianas se lleva a cabo por cultivo en placa Petri del agua cruda tratada con el extracto coagulante previamente seleccionado.

El cultivo en medio sólido se realiza, esterilizando en primer lugar todo el material a emplear en el autoclave a 121° C durante 15 minutos. A continuación se prepara el medio de cultivo, utilizando agar comercial ACUMEDIA (*Standard Methods Agar for the enumeration of bacteria in water, wastewater, food and dairy product, modelo 7157A*) y preparando la solución siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez preparada la placa Petri, se procede a la inoculación de esta con 10 μL de agua cruda tratada con coagulante natural. Además, en la placa se incluye el blanco compuesto por el agua cruda sin adición de coagulante primario y en el centro, agua destilada esterilizada para verificar que no hay contaminación exterior de los cultivos durante su incubación.

La figura 4.11 muestra la distribución de las muestras inoculadas en la placa Petri.

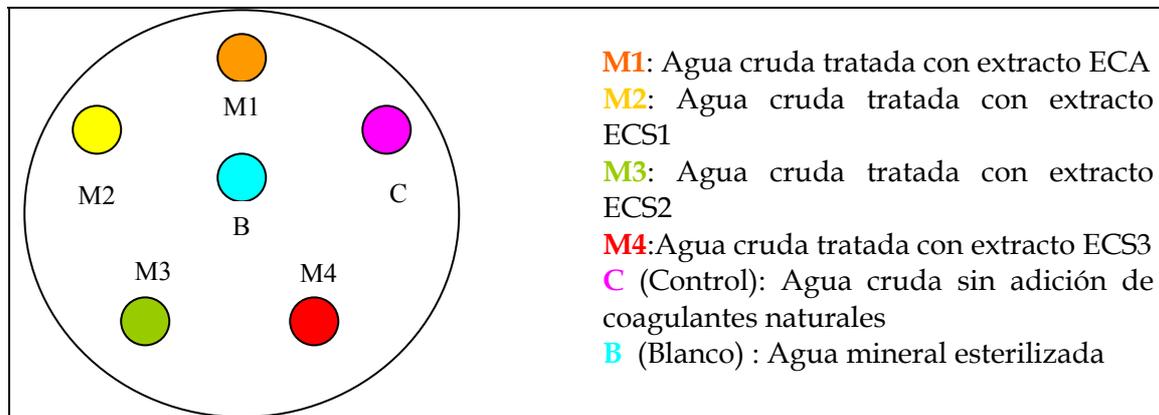


Figura 4.11 Esquema inoculación de las muestras en placa Petri.

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, se procede a la incubación de las placas en la estufa a 37° C durante 48 horas.

Adicionalmente, se repitió el test antimicrobiano pero adicionando 0.1 ppm de cloro al agua tratada con coagulantes naturales y se realizó un ensayo de incubación, siguiendo las indicaciones del ensayo anterior.

5. RESULTADOS

5.1 Estudio comparativo inicial

En este apartado se muestran los principales resultados obtenidos en los ensayos de actividad coagulante primaria para extractos crudos acuosos, extractos crudos salinos y sus diluciones, así como sus principales características.

5.1.1 Test de actividad coagulante primaria para extractos crudos acuosos y salinos

De acuerdo con la metodología, el objetivo de este ensayo es verificar la presencia de actividad coagulante de los extractos acuosos (ECA) y salinos (ECS) procedentes de las 21 semillas seleccionadas para el estudio, mediante la aplicación de un test de medida de la actividad a 500 nm. Se considera que hay actividad coagulante cuando el porcentaje de sedimentación de la muestra observado al cabo de 60 minutos, es superior a la sedimentación producida de forma natural en la disolución turbia sintética (control o blanco).

Las 21 semillas utilizadas, se distribuyen en 2 grupos: semillas de frutas exóticas o de cultivo y semillas leguminosas. Los resultados experimentales obtenidos tras el test de actividad realizado, se presentan en los gráficos 5.1 y 5.2.

En el gráfico 5.1 se observan los resultados del test de actividad coagulante primaria para las semillas de frutas exóticas y semillas de cultivo. La línea base de color naranja, representa el porcentaje de sedimentación del blanco, tras un tiempo de sedimentación de 60 minutos, (en este caso sedimenta un 12 %). En cada ensayo, se ha incluido como referencia la semilla de *Moringa oleifera* de probada capacidad coagulante primaria.

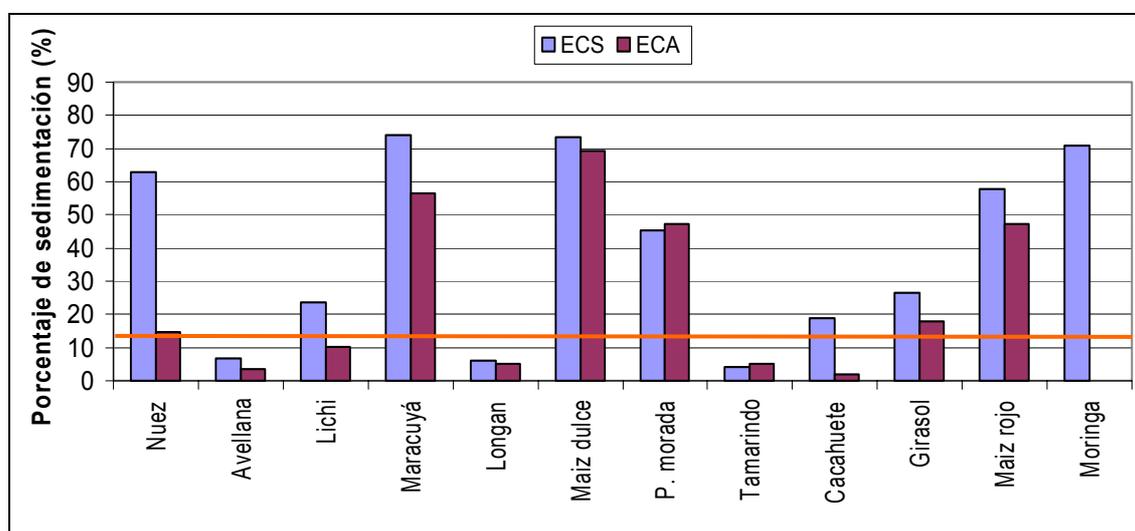


Gráfico 5.1. Test de actividad para los extractos acuoso y salino procedentes de semillas de frutas exóticas y de cultivo

En el gráfico 5.1 se observa que:

- Tanto el extracto crudo salino como el acuoso de las semillas de Avellana, Lichi, Longan, Tamarindo, Cacahuete, Girasol no muestran actividad coagulante primaria. Sin embargo, no se deshechan inicialmente ya que al igual que ocurre con *Moringa oleifera*, puede darse la circunstancia de que presenten actividad coagulante al diluir el extracto crudo.

- Las semillas de Nuez (extracto salino), Maracuyá (extracto salino y acuoso), Maíz dulce (extracto salino y acuoso), fruta de la pasión morada (extracto salino y acuoso) y Maíz rojo (extracto salino y acuoso) muestran capacidad coagulante, ya que reducen la turbidez de la disolución turbia sintética inicial entre un 45 y un 75 %.
- Los extractos crudos (tanto salino como acuoso) de las semillas Maracuyá y Maíz dulce presentan una actividad coagulante similar a la *Moringa*, con un porcentaje de reducción de la turbidez inicial superior al 70 %, tras 60 minutos.

Además, se tiene que para todas las semillas estudiadas, el extracto salino presenta mejores resultados de actividad coagulante que el extracto acuoso. Dicha circunstancia, se debe a que la actividad coagulante se relaciona con la presencia de proteínas coagulantes en el extracto que por su naturaleza y conformación, se estabilizan al formar uniones e interacciones con el medio que las rodea. El medio salino a diferencia del medio acuoso, favorece que las proteínas solubles presentes en la muestra estén más estabilizadas, debido al efecto de la sal.

Dicho efecto fue observado también en el caso de la *Moringa oleifera* (Okuda et al., 1999). En ese caso, los ensayos demostraron que el extracto crudo salino mostraba actividad coagulante con dosis 7.4 veces inferior al extracto crudo acuoso.

En el gráfico 5.2 se observa los resultados del test de actividad coagulante primaria para las semillas de leguminosas.

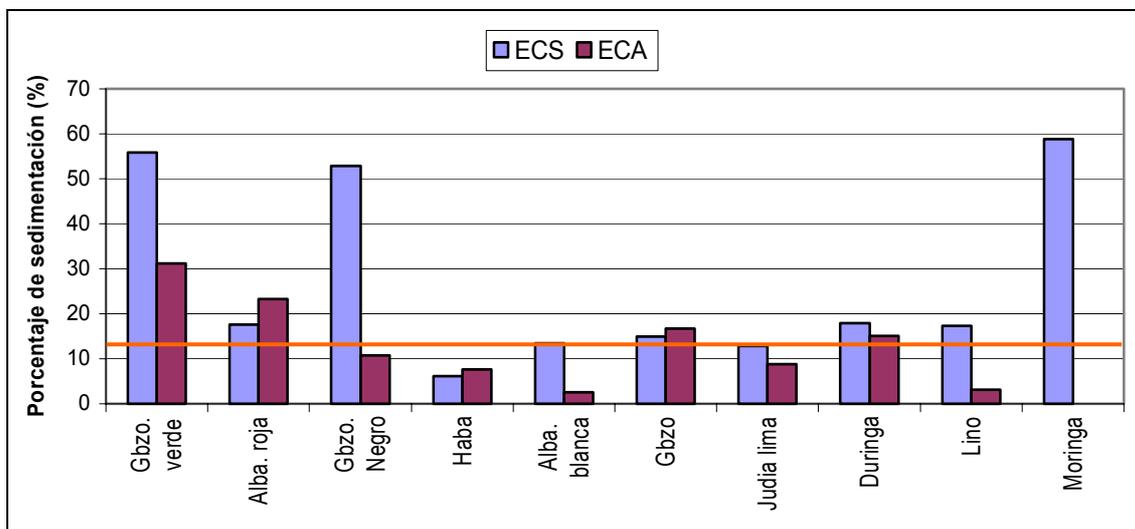


Gráfico 5.2. Test de actividad para los extractos acuoso y salino procedentes de semillas leguminosas

En el gráfico 5.2 se observa que:

- Las semillas de Alubia roja, Haba, Alubia blanca, Garbanzo, Judía de lima, Duringa y Lino tanto en extracto salino como acuoso, no presentan reducción de la turbidez apreciable al cabo de 60 minutos.
- La semilla de Garbanzo verde (extracto acuoso y salino), y el Garbanzo negro (extracto salino) presenta un porcentaje de sedimentación entre el 50 y el 60 %, similar al de *Moringa oleifera*.

5.1.2 Test de actividad coagulante para los extractos crudos acuosos y salinos diluidos

Con el fin de estimar la concentración óptima de extracto que es necesario adicionar para reducir de forma eficaz la turbiedad de la disolución turbia sintética, se realizaron diluciones de los extractos crudos y se sometieron a un test de actividad.

A) Extractos crudos salinos (ECS)

Los estudios previos con *Moringa*, indican que dicha semilla es capaz de obtener mejores resultados en el test de actividad, si se trabaja con extracto salino diluido tanto crudo (ECMO) como purificado (EPMO). Por tanto, se estudiará la actividad coagulante de los extractos salinos diluidos para todas las semillas seleccionadas en los ensayos.

Los resultados obtenidos se muestran en los gráficos 5.3, 5.4 y 5.5.

El gráfico 5.3 muestra los resultados experimentales del test de actividad, para el extracto crudo salino sin diluir y diluido 3, 9, 27 y 81 veces, de las semillas de frutas exóticas y semillas de cultivo. La línea roja representa el porcentaje de sedimentación del blanco tras 60 minutos de reposo, al igual que en los gráficos previos. En el gráfico también se representan los resultados obtenidos para la semilla *Moringa*, tanto para su extracto crudo salino (ECMO) como para su extracto salino purificado (EPMO).

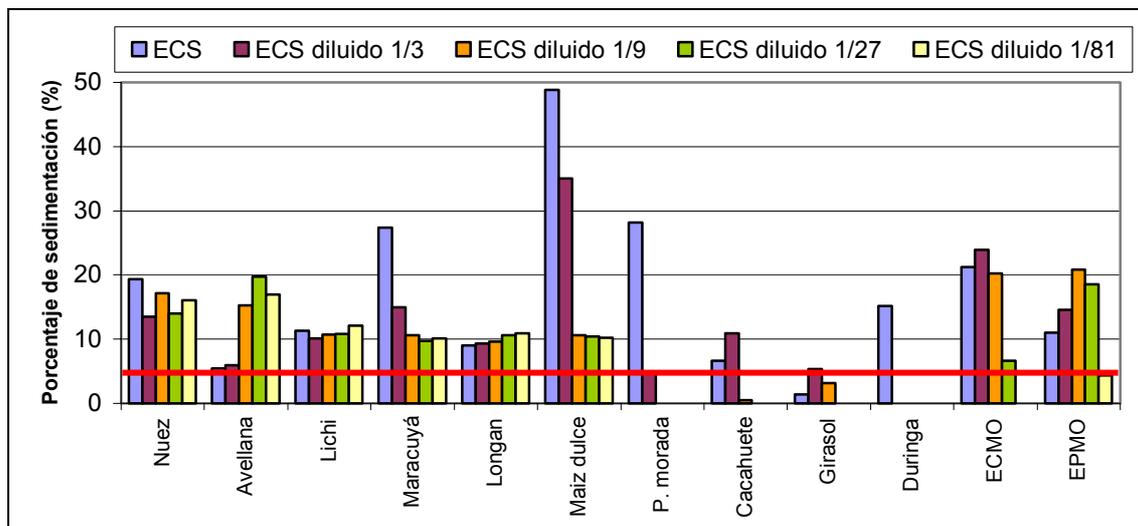


Gráfico 5.3. Test de actividad para el extracto salino diluido de semillas de frutas exóticas y de cultivo

En el gráfico 5.3 se observa que:

- Los extractos crudos salinos de las semillas de nuez, maracuyá, maíz dulce y fruta de la pasión morada, disminuyen su actividad coagulante, al aumentar el factor de dilución. Los extractos salinos de lichi y longan, mantienen la actividad coagulante, al aumentar el factor de dilución pero con valores muy inferiores a los que se observan en otras semillas como la *Moringa*.

- Los extractos crudos salinos no diluidos de las semillas de maracuyá, maíz dulce y fruta de la pasión morada proporcionan los mismos resultados que en el test de actividad coagulante inicial, es decir, muestran actividad coagulante similar a la *Moringa oleifera* tras 60 minutos de sedimentación. En este ensayo, los porcentajes son sensiblemente inferiores respecto a los obtenidos en los test de actividad mostrados en los gráficos 5. 1 y 5.2, sin embargo, la referencia de la semilla *Moringa oleifera* permite mantener el orden de magnitud para la comparación.
- El extracto crudo salino de la semilla avellana es el único que incrementa su actividad coagulante al ser diluido, obteniendo los mejores resultados en el test de actividad cuando es diluido 27 veces.
- Los resultados de las diluciones no representadas para la fruta de la pasión morada, cacahuete, girasol y duringa así como los resultados de las semillas tamarindo y lino no se muestran en el gráfico, al proporcionar valores negativos del porcentaje de sedimentación cuando aumenta el factor de dilución en el test de actividad.

El gráfico 5.4 muestra los resultados obtenidos para los extractos crudos salinos diluidos de semillas procedentes de plantas leguminosas.

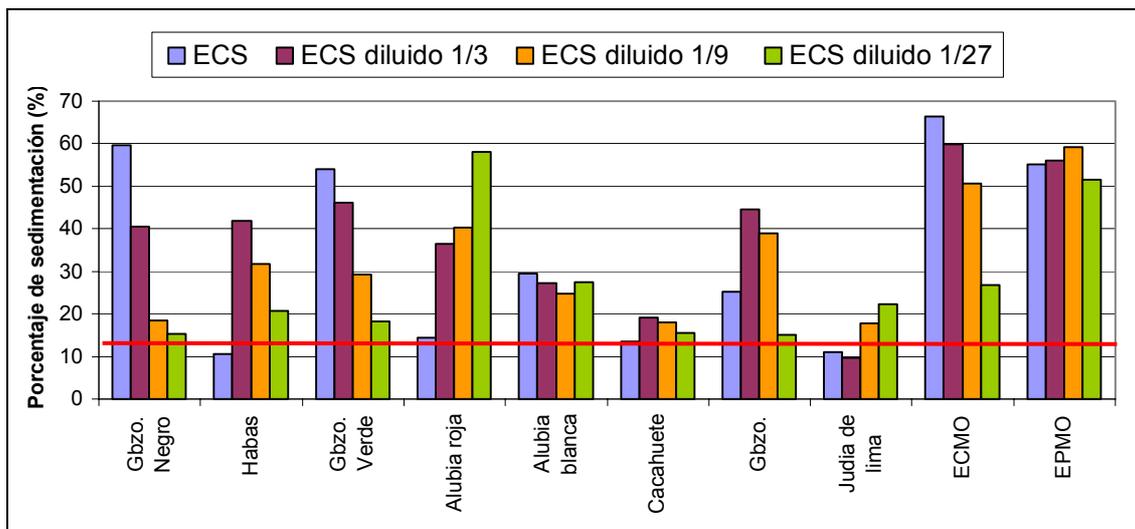


Gráfico 5.4. Test de actividad para el extracto salino diluido de semillas leguminosas

En el gráfico 5.4 se observa que:

- Las semillas de garbanzo negro, garbanzo verde, ven reducida su capacidad coagulante primaria tras ser diluidos.
- Las semillas de alubia blanca, cacahuete y judía de lima mantienen o incrementan su actividad coagulante, al aumentar el factor de dilución. No obstante, los valores del porcentaje de sedimentación obtenidos, son muy inferiores a los observados para *Moringa* y otras semillas ensayadas.
- Por el contrario, las semillas de habas, alubia roja y garbanzo incrementan su actividad coagulante, al diluir el extracto crudo salino, situándolo en

valores comparables a los observados por *Moringa oleifera*. Concretamente:

- La semilla de haba incrementa su porcentaje de sedimentación de un 10 % a un 43 % al ser diluida 3 veces. Sin embargo, dicha tendencia no se mantiene al realizar una segunda y una tercera dilución.
- La semilla de alubia roja incrementa su actividad coagulante de un 14 % a un 36 %, al diluir el extracto crudo 3 veces. Se observa la misma tendencia al diluir 9 veces el extracto crudo (actividad coagulante de un 40%) y 27 veces (actividad coagulante 57 %). Para la tercera dilución, el porcentaje de sedimentación es similar al obtenido para *Moringa*.
- La semilla de garbanzo incrementa su actividad coagulante de un 25 a un 45 % al diluir el extracto crudo 3 veces. Sin embargo, esta tendencia no se mantiene en las siguientes diluciones, ya que la actividad se ve disminuida a un 38 % al diluir el extracto crudo 9 veces y es prácticamente inapreciable al diluirlo 27 veces.

Finalmente, en este ensayo se comprueba que los extractos salinos de *Moringa oleifera* admiten diluciones sin pérdida apreciable de actividad coagulante primaria tal y como indica la bibliografía (Ghebremichael et al., 2005). El extracto purificado salino de *Moringa* (EPMO), admite diluciones de hasta 27 veces sin pérdida de actividad coagulante considerable mientras que el extracto crudo de *Moringa* (ECMO), admite 3 diluciones sin pérdida de capacidad coagulante.

B) Extractos crudos acuosos (ECA)

Aunque los test de actividad coagulante inicial para los extractos crudos, mostraron mejores resultados para los extractos salinos que para los extractos acuosos, se realizó un test para comprobar la influencia de la dilución sobre estos últimos.

En el caso de que se obtuvieran resultados positivos en dicho test, permitiría emplear directamente dichos extractos en el proceso de purificación posterior, sin acondicionamiento previo asegurando además el mantenimiento de su capacidad coagulante tras la cromatografía (que provoca una dilución de la muestra inicial, durante la elución) y evitando también una etapa de concentración posterior (que prolongaría el proceso de obtención del extracto coagulante y probablemente lo encarecería).

Los extractos crudos seleccionados para este ensayo pertenecen a las semillas de alubia roja, garbanzo, garbanzo verde, garbanzo negro, maíz dulce, cacahuete y *Moringa oleifera*. Los criterios seguidos para la selección de estas semillas fueron:

- extractos salinos que mantienen su actividad coagulante al ser diluidos (caso de la alubia roja, del garbanzo y del cacahuete).
- extractos crudo salino con capacidad coagulante considerable (caso del garbanzo negro y del maíz dulce).
- extractos crudo acuoso con capacidad coagulante aceptable (caso del garbanzo verde).

Los resultados obtenidos se representan en el gráfico 5.5.

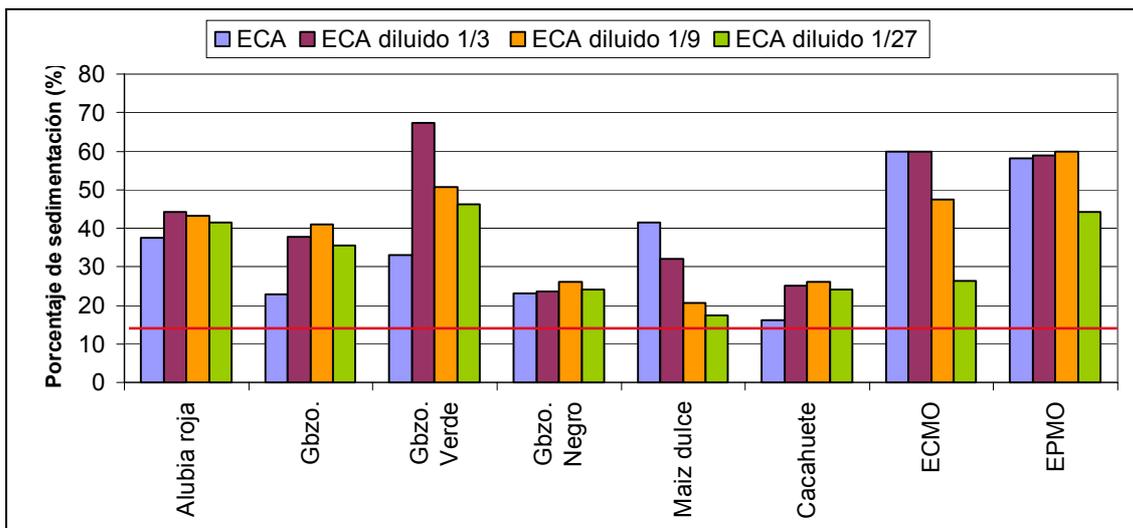


Gráfico 5.5 Test de actividad para el extracto acuoso diluido procedente de distintas semillas

El gráfico permite observar que:

- el extracto crudo acuoso de la alubia roja, garbanzo, garbanzo verde, garbanzo negro y cacahuete mantienen o incrementan su actividad coagulante, al aumentar el factor de dilución. Cabe resaltar el caso del garbanzo verde, que incrementa notablemente su actividad (valores cercanos al 70 %) al ser diluida 3 veces.
- el extracto crudo acuoso del maíz dulce no admite dilución sin pérdida de actividad por lo que este extracto no se empleará en la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.

5.1.3 Test de actividad para diferentes variedades de *Zea mays*

Estudios previos muestran que semillas procedentes de distintas fuentes poseen rendimientos de coagulación diferentes, debidos a su diferente composición, su distinto contenido en proteína o al diferente estadio de desarrollo vegetativo de la semilla (Narasiah et al., 2002).

En el presente estudio, se ha observado que semillas de la misma especie tales como el maíz dulce y maíz rojo proporcionan buenos resultados en los test de actividad. Se decidió realizar nuevos test para comparar la actividad de estas semillas con otras variedades de la misma especie y con maíz procedente de distintas fuentes.

El gráfico 5.6 muestra los resultados del test de actividad coagulante para tres variedades distintas de maíz.

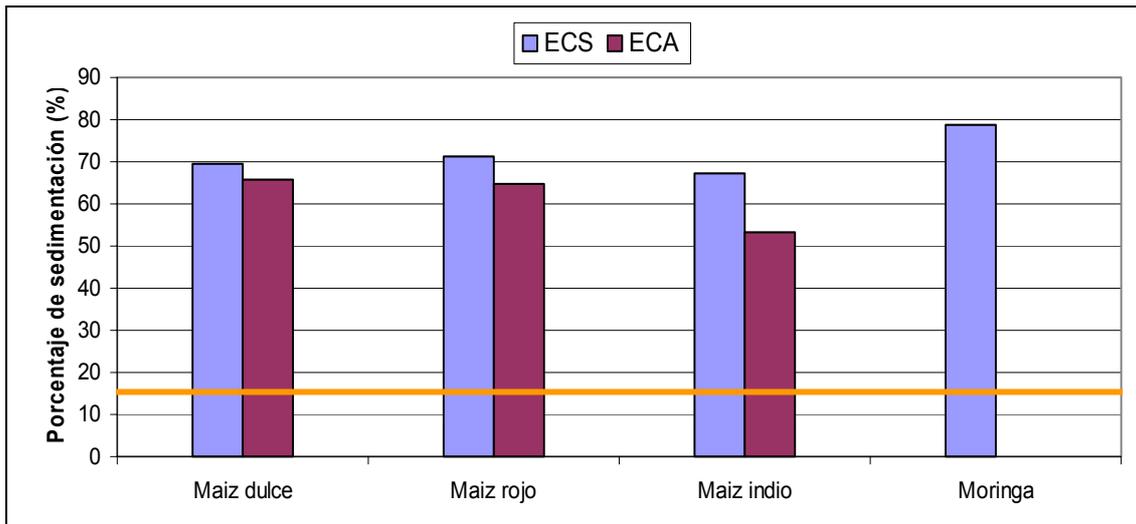


Gráfico 5.6 Resultados del test de actividad para distintas variedades de la especie *Zea mays*

En el gráfico 5.6 se observa que los mejores resultados de actividad coagulante primaria se obtienen para las semillas de maíz dulce y maíz rojo (con porcentajes de sedimentación entorno al 70 % tras 60 minutos de sedimentación). La semilla de maíz indio presenta un porcentaje de sedimentación similar a las semillas anteriores, aunque relativamente inferior (entorno al 65 %).

Este ensayo pone de manifiesto que a pesar de tratarse de semillas de la misma especie, los compuestos activos primarios difieren en concentración o en composición con la variedad o el grado de maduración.

Adicionalmente, se estudió maíz de distinto origen y tras la obtención del extracto crudo con tampón acetato de amonio, se realizó un test de actividad a 500 nm. Los resultados del test de actividad para los extractos en acetato de amonio (ECT) se muestran en el gráfico 5.7.

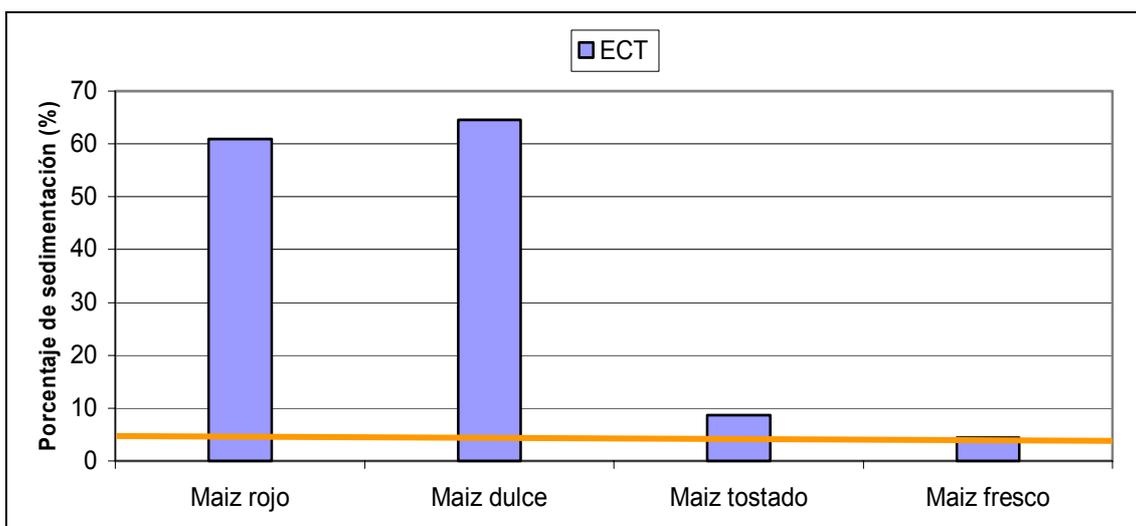


Gráfico 5.7 Test de actividad para maíz procedente de distintas fuentes

En este ensayo, no se observa actividad coagulante apreciable para el maíz fresco ni para el maíz tostado, aunque se mantienen los resultados positivos para las especies de maíz rojo y maíz dulce.

Esta circunstancia, pone de manifiesto la influencia del grado de maduración de las semillas en la expresión de la proteína coagulante activa. De hecho, en el caso del maíz fresco las proteínas del grano aun no están completamente desarrolladas y pueden no ser activas y en el caso del maíz tostado, las proteínas pueden haberse desnaturalizado como consecuencia del proceso de tostación y por tanto no están activas.

Dichos resultados confirman también los estudios sobre proyectos genómicos que se están realizando en la actualidad para demostrar que las plantas expresan proteínas diferentes en función de su etapa de desarrollo (Suárez et al., 2003; Dong et al., 2004).

5.1.4 Análisis de la evolución de la sedimentación

Uno de los parámetros de operación a analizar en el presente estudio es el tiempo de sedimentación.

Las referencias bibliográficas anteriores del trabajo con *Moringa*, indicaban como tiempo óptimo para observar el efecto del extracto coagulante sobre la turbidez del agua cruda, 60 minutos de sedimentación. No obstante, en el presente ensayo se ha estudiado la evolución de la sedimentación realizando medidas de absorbancia cada 10 minutos durante 90 minutos. Los extractos crudos seleccionados para este ensayo, son los que han obtenido mayores porcentajes de sedimentación en los test de actividad inicial, con excepción de la alubia roja para la que se utilizó el extracto diluido 27 veces.

Los resultados se muestran en el gráfico 5.8.

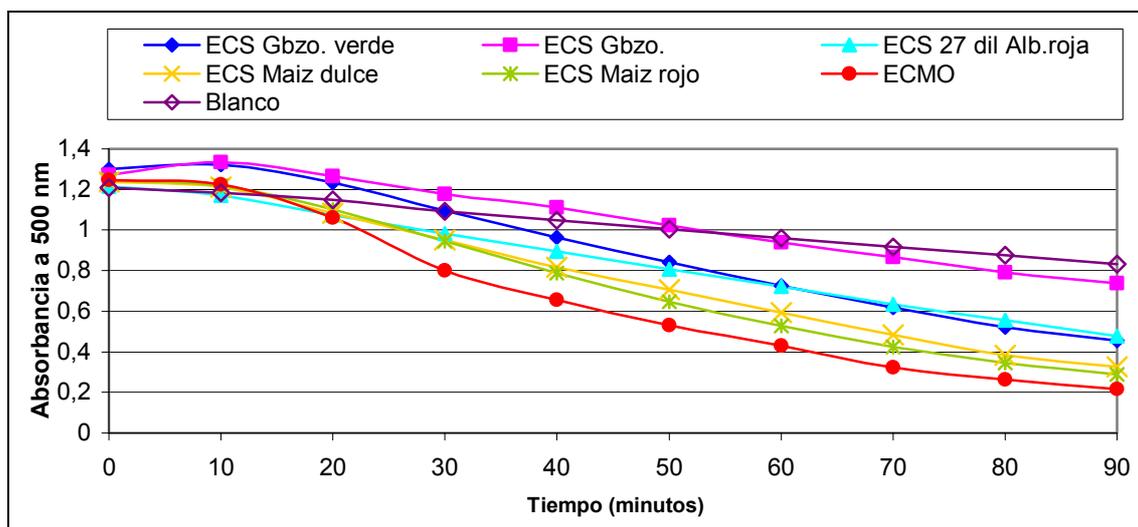


Gráfico 5.8. Evolución de absorbancia a 500 nm durante la sedimentación en el test de actividad

En el gráfico anterior se observa que:

- el extracto salino diluido 27 veces de la semilla alubia roja respecto del extracto crudo, presenta una disminución considerable (del 35 %) de la absorbancia, al aumentar el tiempo de sedimentación de 60 a 90 minutos.
- los extractos salinos crudos de las semillas de maíz dulce y maíz rojo muestran un descenso menos acusado de la absorbancia entre los 60 y los 90 minutos. La evolución de la sedimentación a lo largo del tiempo es similar a la evolución obtenida para *Moringa oleifera*.

Por tanto, y dado que la alubia roja precisa un tiempo de sedimentación de 90 minutos para obtener resultados aceptables, se tomará a partir de ahora ese tiempo de sedimentación para los próximos experimentos en los que se trabaje con dicha semilla.

5.1.5 Análisis de la influencia de la temperatura en los compuestos activos

Otro de los ensayos realizados para determinar las condiciones de trabajo de las semillas seleccionadas, consiste en estudiar la resistencia térmica de los compuestos activos.

Los resultados del test de actividad tras 90 minutos de sedimentación, para extractos crudos sometidos a calentamiento a diversas temperaturas (85 y 95° C) se muestran a continuación, en el gráfico 5.9.

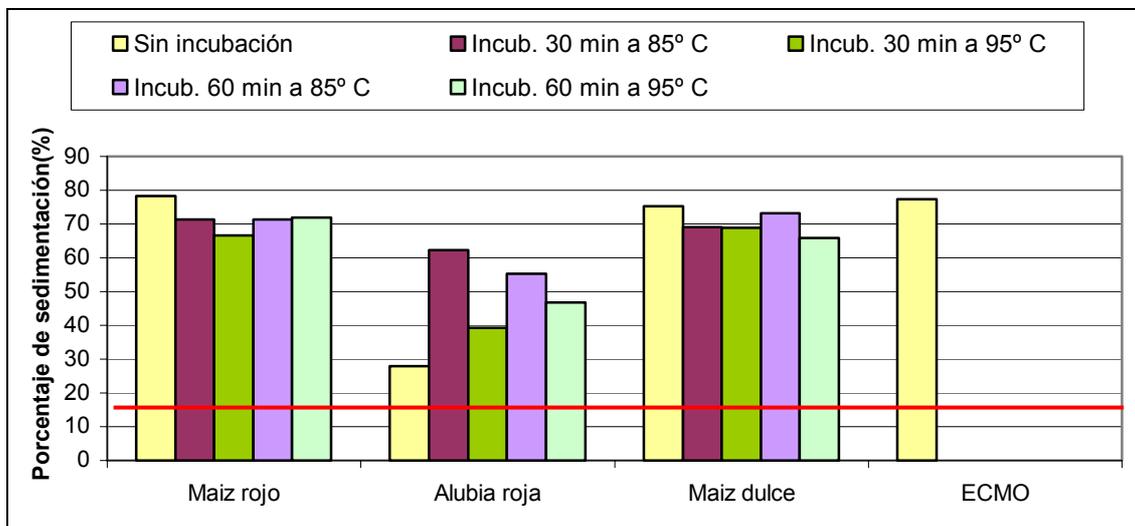


Gráfico 5.9 Resultados del test de actividad para el estudio de la influencia de la temperatura en el componente activo

Se observa que los extractos de las semillas Maíz rojo y Maíz dulce están afectados por el calentamiento, debido a que se observa una disminución en el porcentaje de sedimentación respecto del extracto crudo no sometido a incubación. Después de 30 minutos incubado a 85° C, el porcentaje de sedimentación disminuye entorno a un 5%. Sin embargo después de 1 hora de incubación a 85° C, la semilla Maíz rojo mantiene su actividad y la semilla Maíz dulce aumenta en un 3%.

El mismo test realizado a 95° C tras 30 minutos de calentamiento, muestra una disminución en el porcentaje de sedimentación entorno al 10 % para ambas semillas y después de 60 minutos, la semilla Maíz rojo incrementa su actividad alrededor de un 5 % (pero manteniéndose siempre por debajo del obtenido inicialmente para el extracto crudo) y la semilla Maíz dulce continua disminuyendo su actividad.

La semilla Alubia roja por el contrario posee una evolución contraria. Después de 30 minutos de calentamiento a 85° C, la actividad aumenta en un 35 %, y después de 1 hora de calentamiento, se incrementa en un 30%. A la temperatura de 95° C, el calentamiento incrementa la actividad pero no en un porcentaje tan elevado como para los 85° C.

En resumen, el análisis de la influencia de la temperatura permite concluir que:

- Para las semillas Maíz rojo y Maíz dulce, la proteína activa ve afectada parcialmente su capacidad coagulante a una temperatura superior a los 85° C. Los pequeños incrementos en la actividad después de 1 hora de calentamiento, no son resultados concluyentes, y pueden ser debidos a que el volumen de la muestra no fue corregido tras el calentamiento, y por tanto, al cabo de una hora, el volumen de muestra se ve reducido como consecuencia de la evaporación. Dicha reducción de volumen implica una concentración de la muestra y por tanto, una mayor cantidad de principio activo en el mismo volumen. Por ello, se obtienen mejores resultados en el test de actividad.
- La semilla Alubia roja aumenta su actividad cuando es sometida a calentamiento a 85° C durante 30 minutos. Al cabo de 1 hora, la proteína se ve afectada por el calentamiento, y a pesar de que mantiene una actividad superior a la de la muestra cruda sin calentamiento, esta disminuye respecto del dato anterior. Los resultados para 95° C no son concluyentes.
- El incremento de la actividad coagulante observado en el ensayo al someter a la proteína a un calentamiento, se produce por la activación de ciertas enzimas como consecuencia del calor aplicado que fragmentan a las proteínas en péptidos más pequeños dejando al descubierto los centros activos.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que los coagulantes naturales de las semillas seleccionadas pueden ser utilizados a cualquier temperatura, teniendo en cuenta que la incubación de los extractos puede incluso aumentar la capacidad coagulante de estos.

5.1.6 Estudio del método de conservación de los extractos crudos

Finalmente, se estudia la estabilidad de los extractos con el fin de establecer el mejor método de conservación para estos (Katayon et al., 2006).

Para ello, se realizó un test de actividad sobre extractos de las distintas semillas conservados en el congelador (a -18° C) o refrigerados (a 4° C) durante 7 días.

Los resultados obtenidos para la alubia roja se muestran en el gráfico 5.10.

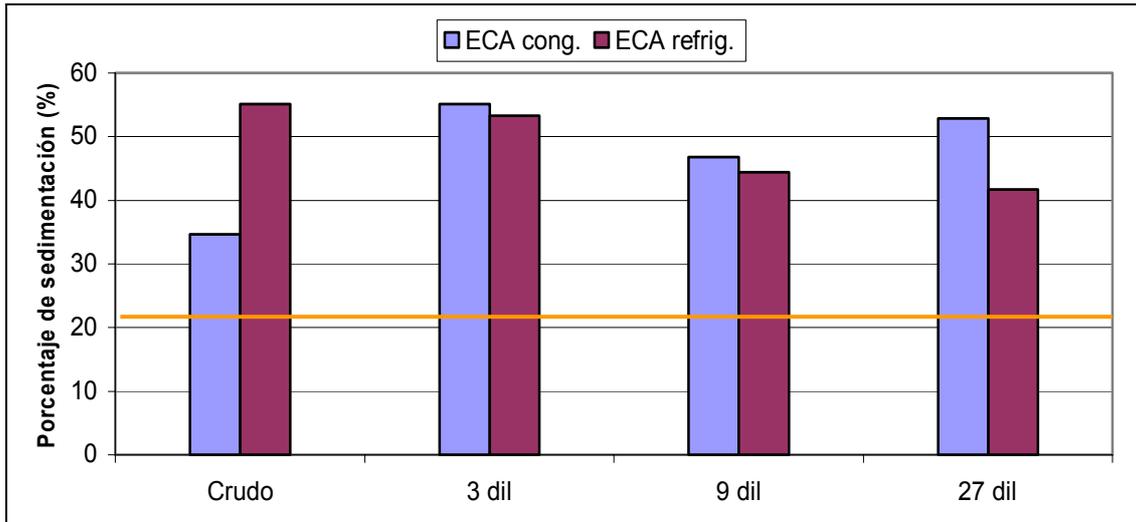


Gráfico 5.10 Test de actividad para alubia roja. Determinación del método de conservación

En el gráfico se observa, que en todos los casos, el ECA de alubia roja conservado en el congelador mantiene su actividad coagulante, a diferencia de lo que sucede para el ECA refrigerado. Únicamente para el caso del ECA crudo, se obtienen mejores resultados para el extracto refrigerado que congelado, aunque dicho resultado no es concluyente.

Los resultados obtenidos para el maíz dulce y rojo se muestran en el gráfico 5.11.

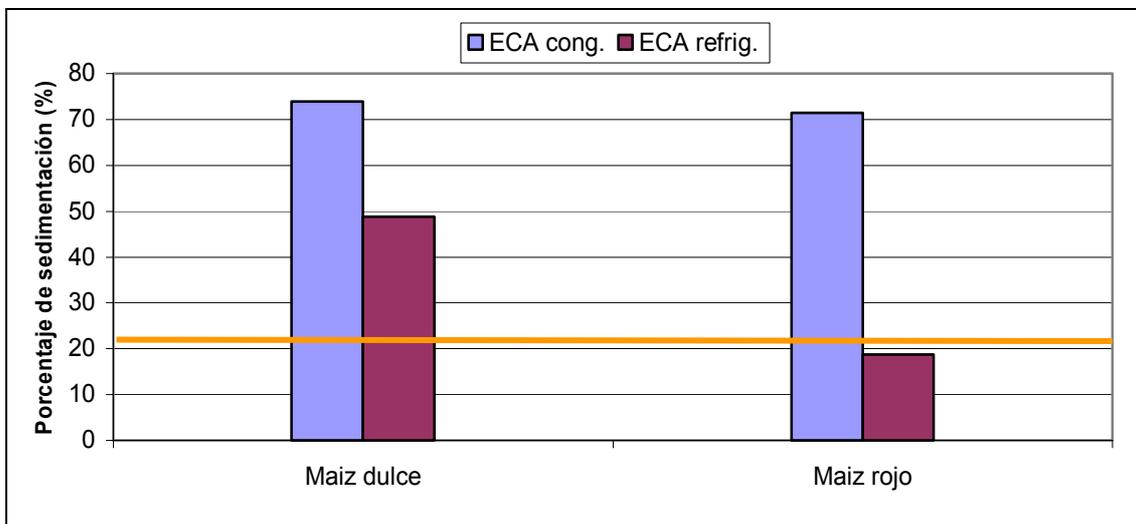


Gráfico 5.11 Test de actividad para maíz dulce y maíz rojo. Determinación del método de conservación

Al igual que en el caso anterior, se observa que los extractos ven reducida su actividad coagulante al conservarse refrigerados a 4° C durante 1 semana.

Por tanto, se elegirá como método de conservación de la muestra, la congelación. Este hecho supone una desventaja para la aplicación real de este método en zonas de escasos recursos. En cualquier caso, se deben realizar ensayos para estudiar la pérdida de actividad de los extractos refrigerados con el tiempo, o en los casos en que el

protocolo de aplicación sea sencillo, aconsejar la preparación de extracto fresco en el momento de la aplicación.

A escala de laboratorio, se utilizará el extracto congelado, procediendo a su descongelación hasta que alcance temperatura ambiente en el momento de su aplicación.

5.1.7 Conclusiones del estudio comparativo inicial

Los ensayos realizados en el estudio comparativo inicial permiten concluir que:

- El test de actividad inicial para los extractos crudos salinos y acuosos ha permitido observar que los extractos salinos presentan una actividad coagulante mayor que los extractos acuosos. Asimismo, ha mostrado que los extractos crudos de las semillas de maracuyá, maíz dulce, fruta de la pasión morada, maíz rojo, nuez, garbanzo verde y garbanzo negro presentan resultados comparables a los obtenidos por el coagulante natural más eficaz conocido en la actualidad, la *Moringa oleifera*.
- El test de actividad inicial para los extractos crudos salinos y acuosos diluidos concluye que los extractos crudos salinos de avellana, nuez, garbanzo verde, alubia roja y garbanzo y los extractos acuosos de alubia roja, garbanzo y garbanzo verde admiten dilución, incrementando su actividad coagulante. De todos ellos, el extracto salino de la alubia roja diluido 27 veces y el extracto acuoso de garbanzo verde diluido 3 veces alcanza valores del porcentaje de sedimentación similares a los obtenidos para *Moringa oleifera*.
- A pesar de que el maíz dulce y el maíz rojo poseen una actividad coagulante comparable a la *Moringa oleifera*, variedades de la misma especie tales como el maíz indio, o de la misma especie pero en diferentes etapas de desarrollo vegetativo, provocan que los compuestos primarios activos sean diferentes e impide obtener resultados positivos en el test de actividad.
- El tiempo óptimo de sedimentación para los ensayos es de 60 minutos para las especies seleccionadas, excepto para la alubia roja que precisa un tiempo de sedimentación de 90 minutos para obtener resultados aceptables.
- El ensayo de estabilidad de los extractos frente a la temperatura permite observar que los compuestos coagulantes activos del maíz dulce, maíz rojo y alubia roja son estables a temperaturas inferiores a 95° C. El incremento de la actividad coagulante observado se produce por la activación de ciertas enzimas como consecuencia del calor aplicado, que fragmentan a las proteínas en péptidos más pequeños, dejando al descubierto los centros activos.
- Los compuestos activos de los extractos ven afectada su estabilidad en función del método de conservación elegido. A escala de laboratorio, los extractos obtenidos se conservan a -18° C hasta su utilización.

Tras realizar el estudio comparativo inicial para las 21 semillas seleccionadas, se han elegido las 3 semillas que mejores resultados han proporcionado:

- La alubia roja es la única que admite diluciones del extracto crudo salino hasta 27 veces, aumentando su actividad coagulante hasta el 60 % en 90 minutos.
- Las semillas de maíz dulce y maíz rojo son las que proporcionan los mejores resultados en los test de actividad preliminares empleando el extracto crudo salino (hasta el 80 %). Sin embargo, se produce una reducción de la actividad coagulante con la dilución. El tiempo de sedimentación óptimo es de 60 minutos. No admiten calentamiento, ya que el principio activo se desnaturaliza con la temperatura.

Los ensayos realizados a continuación, están dirigidos a caracterizar el coagulante primario encontrado en las semillas seleccionadas (maíz dulce, maíz rojo y alubia roja). La caracterización consistirá, básicamente, en la purificación de la proteína para eliminar la fracción orgánica que no es activa, la determinación del peso molecular de la proteína así como el estudio de la capacidad antimicrobiana del compuesto activo purificado.

5.2 Purificación del compuesto activo

En este apartado se muestran los principales resultados obtenidos tras la purificación del compuesto activo por cromatografía de intercambio iónico (CIE) así como las principales características del extracto purificado obtenido (peso molecular y carga eléctrica del compuesto activo).

5.2.1 Resultados del acondicionamiento del ECS mediante cromatografía de filtración en gel

Previamente a la purificación del extracto crudo por CIE, este debe ser acondicionado con el fin de evitar que el contenido de NaCl de la muestra, interfiera en la purificación.

El acondicionamiento, tal y como se comentó en la metodología experimental, consiste en eliminar mediante cromatografía de filtración en gel (CFG) el cloruro sódico que contiene el extracto crudo (desalado). De esta forma, se evita que el NaCl compita con la proteína activa por los centros activos de la matriz de la columna de intercambio iónico

Una vez realizada la desalación, las fracciones obtenidas se someten a un test de actividad a 500 nm para comprobar que la desalación no afecta la capacidad coagulante de la proteína.

Los resultados para las semillas de maíz dulce, maíz rojo y alubia roja se presentan en los siguientes gráficos 5.12 y 5.13.

El gráfico 5.12 muestra los resultados del test de actividad para el extracto crudo de alubia roja tras la cromatografía de filtración en gel.

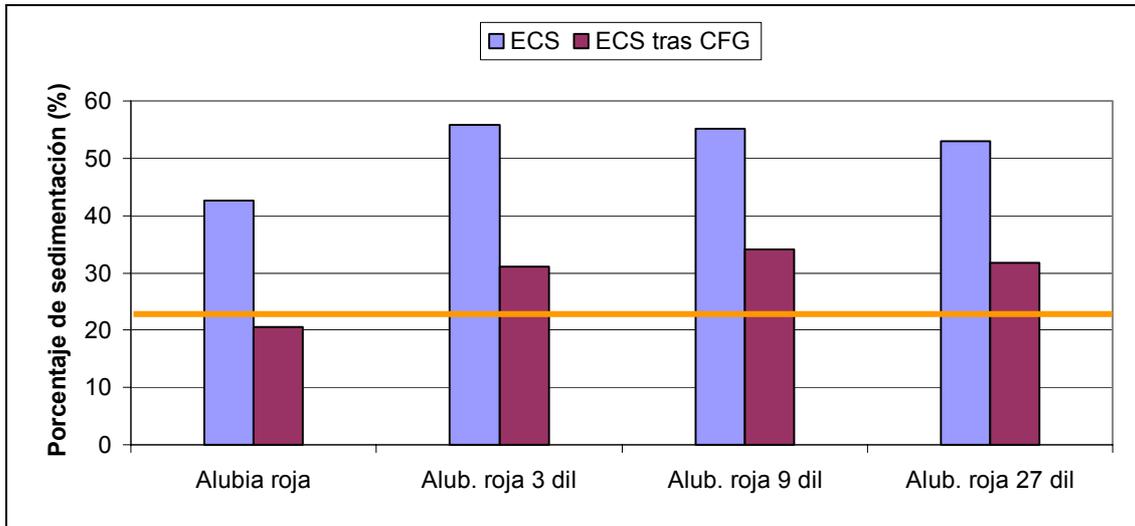


Gráfico 5.12 Test de actividad para ECS de alubia roja tras cromatografía de filtración en gel

En el gráfico se observa que el test de actividad no muestra resultados positivos tras la desalación, reduciéndose la actividad de los extractos en aproximadamente un 20 %.

El gráfico 5.13 muestra los resultados del test de actividad para los extractos crudos de maíz dulce y maíz rojo tras la cromatografía de filtración en gel. Se observa que el test de actividad no presenta resultados positivos tras la desalación, reduciéndose la actividad de los extractos en un 50 %.

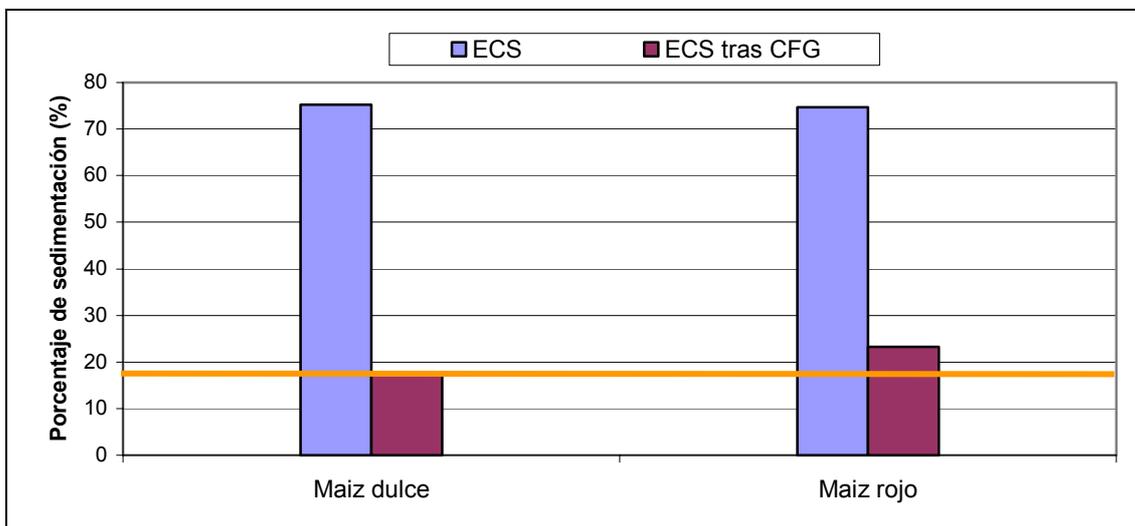


Gráfico 5.13. Test de actividad para ECS de maíz dulce y maíz rojo tras cromatografía de filtración en gel

En ambos casos, se observa que la eliminación de NaCl por cromatografía de filtración en gel, afecta a la actividad coagulante del extracto. Este hecho puede ser debido a que la eliminación de la sal del medio resta estabilidad a la proteína o bien, a que durante la desalación, la cantidad de proteína contenida en el extracto inicial se ha repartido en

las diferentes fracciones y al estar menos concentrada en cada fracción, pierde efectividad.

Por estos motivos, se decidió que la etapa de desalación en las condiciones realizadas no era una opción adecuada para el acondicionamiento de los extractos crudos de las semillas seleccionadas.

Por tanto, las decisiones tomadas en este punto fueron:

- Dado que no se puede eliminar la sal (NaCl) del extracto salino sin perder capacidad coagulante de la proteína, se deberá:
 - emplear el extracto acuoso en los casos en que presente una actividad aceptable.
 - realizar la extracción empleando la disolución tampón que se emplea posteriormente en la purificación, es decir el acetato de amonio. Previamente, se deberá comprobar que la actividad inicial del extracto crudo de la semilla no se ve afectada por el cambio de disolvente.
- En el caso de que la pérdida de efectividad se deba a una disminución de la concentración de la proteína, se deberá proceder a una concentración previa del extracto crudo.

Para el caso de las semillas objeto de estudio se decide:

-Dado que el extracto de la alubia roja (tanto acuoso como salino) proporciona mejores resultados al ser diluido, se trabajará con el extracto acuoso sin concentrar (ECA). Dicho extracto proporciona menor actividad que el salino pero evita los problemas asociados con la desalación mediante cromatografía de filtración en gel.

-Para las semillas de maíz dulce y maíz rojo, la decisión anterior no es válida ya que el ECA de estas semillas no presenta actividad coagulante apreciable. En ese caso, se realizará una extracción con acetato de amonio, que permite mantener al componente activo en disolución salina para poseer actividad. A continuación, se concentrará la muestra para incrementar el contenido proteico, que en dicho extracto es muy bajo.

El gráfico 5.14 muestra los resultados del test de actividad para los extractos en Acetato de Amonio de las semillas de maíz dulce y maíz rojo.

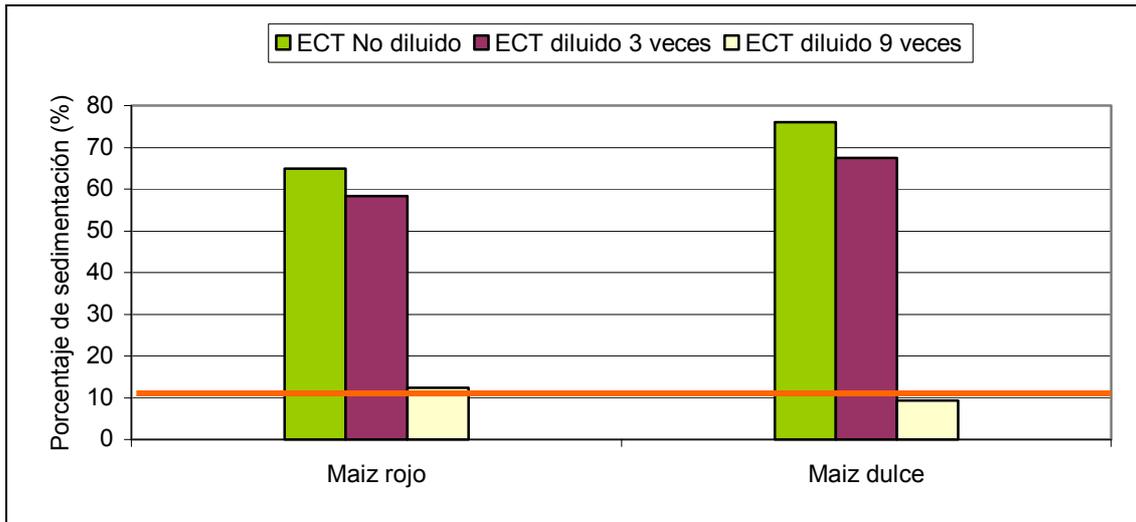


Gráfico 5.14 Resultados del test de actividad para los extractos con Acetato de Amonio de maíz dulce y maíz rojo

Se observa que no hay pérdida de actividad de las semillas al cambiar el disolvente con el que se realiza la extracción del componente activo y se mantienen las mismas conclusiones respecto a la dilución, es decir, hay pérdida de actividad (entre un 15 y un 50%) al diluir el extracto crudo.

5.2.2 Purificación del coagulante activo por cromatografía de intercambio iónico

A) Resultados para alubia roja

Durante la cromatografía de intercambio iónico (CIE) se obtienen dos picos de absorbancia a 280 nm: el pico a (fracciones 2-8), correspondiente a la etapa de adsorción una vez introducida la muestra y el pico b (fracciones 22-28), correspondiente a la etapa de elución con el gradiente salino de NaCl. El incremento de la absorbancia para el pico b, se produce cuando se introduce la disolución de cloruro sódico en la columna y las proteínas fijadas a la matriz por los centros activos se eluyen y quedan liberadas (fracción bound o unida).

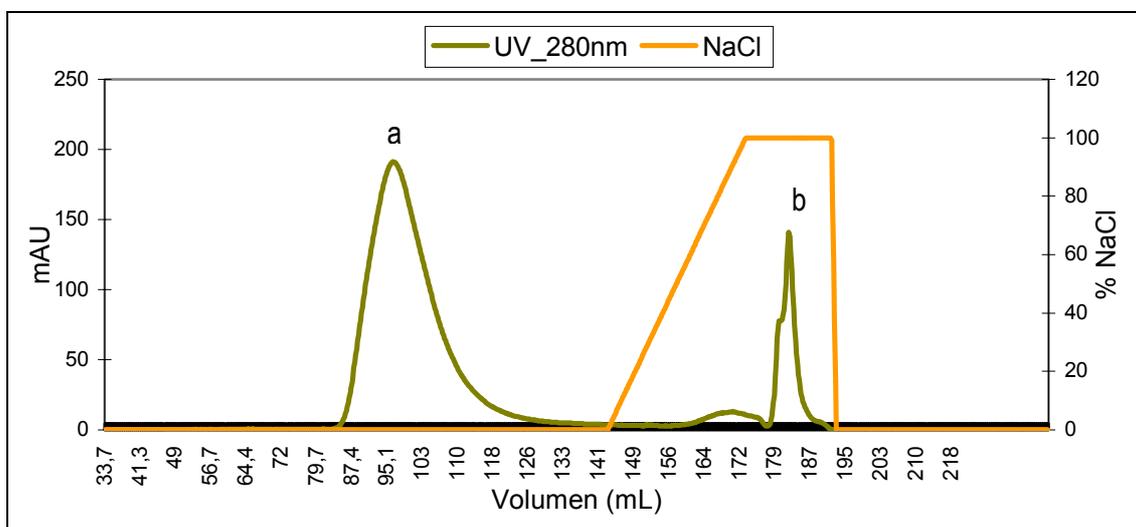


Gráfico 5.15 Cromatografía de Intercambio iónico para el ECA de la alubia roja

Para determinar si las proteínas detectadas por la medida en continuo de la absorbancia a 280 nm, corresponden con proteínas activas, se procedió a realizar un test de actividad a 500 nm, para las fracciones correspondientes a los picos a (fracción “unbound”) y b (fracción “bound”).

Los resultados del test de actividad, se muestran en el gráfico 5.16.

En el gráfico se observa que únicamente presentan actividad coagulante las fracciones correspondientes al pico b (fracciones 25 a 28). Los valores de actividad son sensiblemente superiores (próximos al 65 %) a los que se obtienen para el extracto crudo diluido (entorno al 50%).

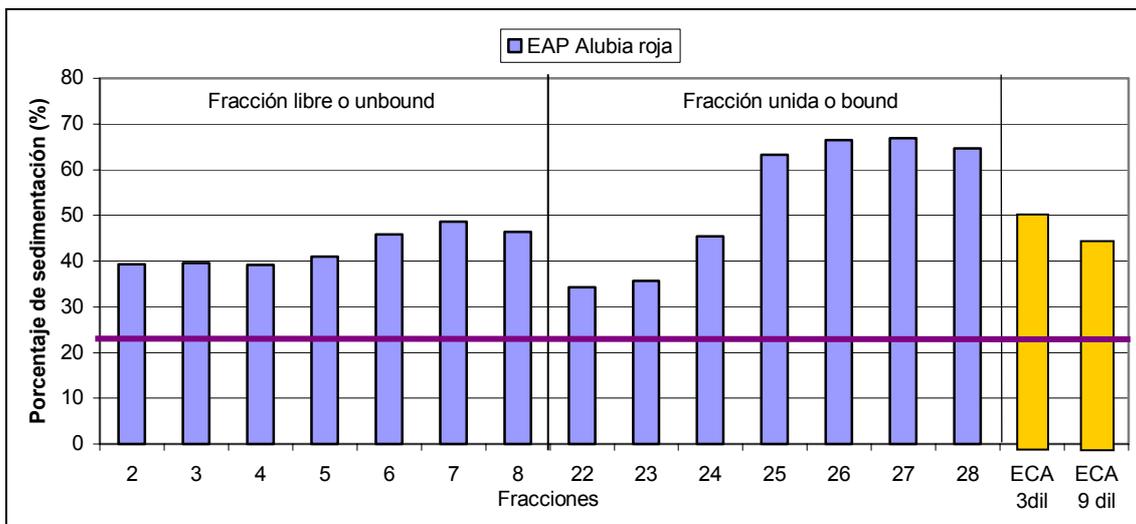


Gráfico 5.16 Test de actividad para el extracto acuoso de Alubia roja tras CIE

Por tanto, se puede concluir que la purificación del componente activo para la alubia roja incrementa la capacidad coagulante de la semilla, respecto del extracto crudo.

Debido a que las fracciones activas se obtuvieron durante la etapa de elución mediante gradiente de NaCl, fue necesario eliminar la sal por CFG, con el fin de poder utilizarlas para la electroforesis SDS-PAGE, teniendo la seguridad de que el contenido salino no distorsionará los resultados.

El gráfico 5.17 muestra los resultados del test de actividad realizado tras la desalación de las muestras.

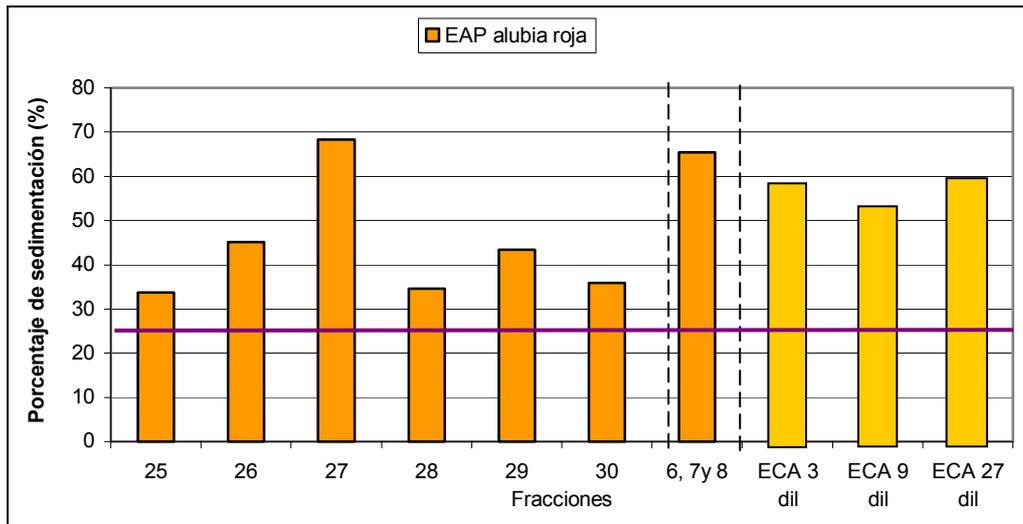


Gráfico 5.17 Test de actividad para EAP alubia roja

En dicho gráfico se observa, que para la fracción más activa (27), la eliminación de NaCl del extracto acuoso purificado no afecta a la actividad coagulante de la proteína y ésta, sigue manteniendo porcentajes de sedimentación superiores a los del extracto crudo. No obstante, se observa una reducción de la capacidad coagulante para las fracciones 25-26, que puede ser debida a la dilución de la muestra que tiene lugar como consecuencia de la cromatografía de filtración en gel.

Por otra parte, se observa que la fracción unbound, compuesta por las fracciones 6-7-8, que de forma individual tras la purificación no dieron resultados positivos en el test de actividad, presenta ahora un porcentaje de sedimentación similar al de la fracción 27. Este incremento de la actividad puede ser debido a que hay parte de proteína activa diluida en estas fracciones, y que al unir las se ha incrementado la concentración, permitiendo observar su actividad coagulante.

B) Resultados para Maíz dulce

Al realizar la purificación por cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron dos picos de absorbancia a 280 nm: el pico a, correspondiente a la fracción libre (unbound) y el pico b, correspondiente a la fracción unida (bound).

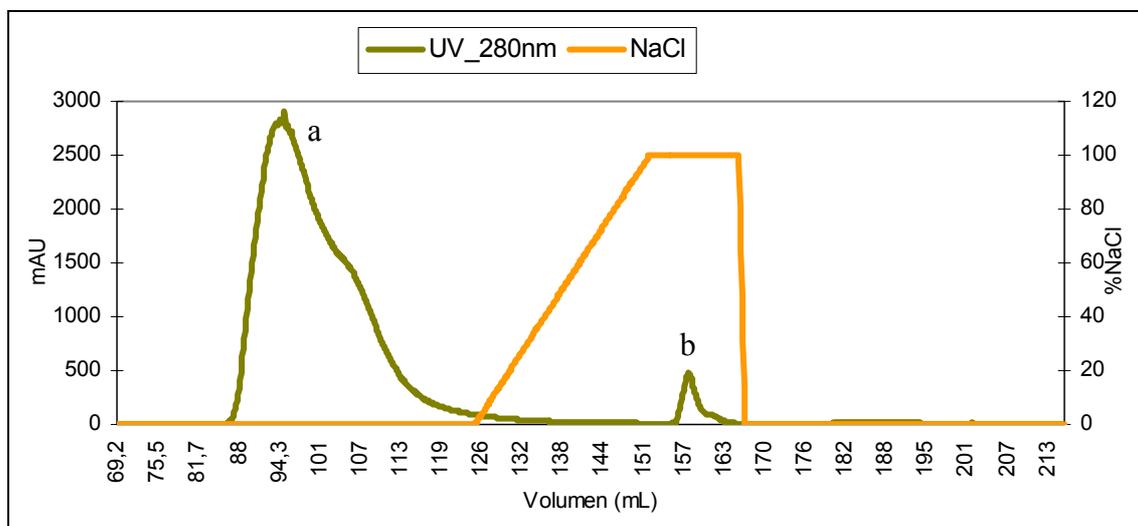


Gráfico 5.18 Cromatografía de Intercambio iónico para el ECT de maíz dulce

A continuación se realizó el test de actividad para las fracciones purificadas del “bound” (fracciones 35-43) y del “unbound” (fracciones 1-8) obtenidas tras el intercambio iónico. Los resultados se muestran en el gráfico 5.19.

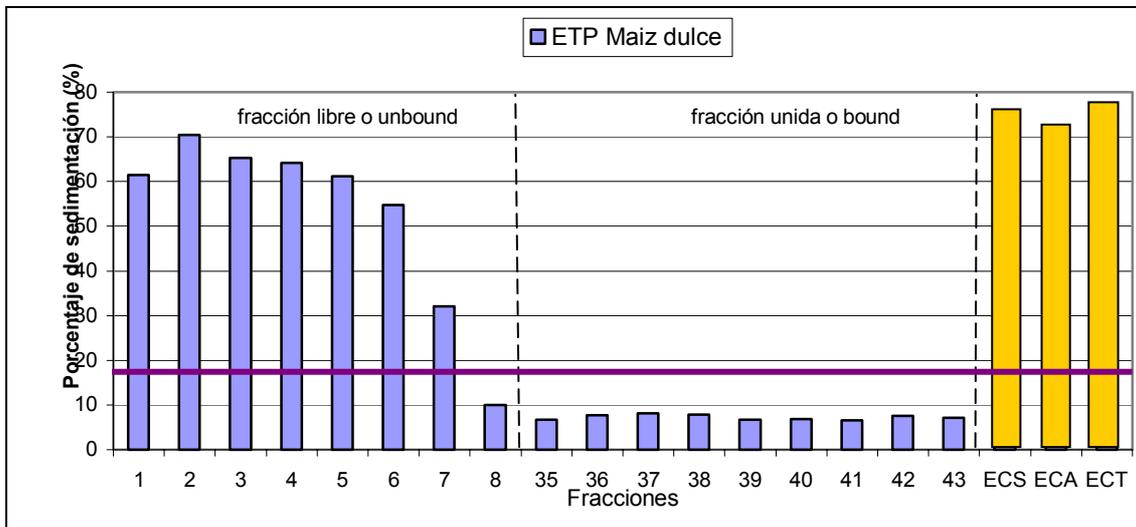


Gráfico 5.19 Test de actividad para el ETP de Maíz dulce tras CIE

En el gráfico se observa, que a diferencia de lo que sucedía para el caso de la alubia roja, las fracciones que presentan actividad coagulante son las del “unbound” (fracciones de 2 a 5). Debido a que el extracto crudo fue concentrado previamente a la purificación, la actividad coagulante se mantiene (valores entorno al 70 %) a pesar de la dilución de la muestra.

Esta circunstancia particular en la purificación, evita la etapa de la desalación de las fracciones ya que estas se encuentran diluidas en una disolución salina de muy baja concentración (Acetato de Amonio 10 mM) y pueden ser utilizadas directamente en la electroforesis posterior.

C) Resultados para Maíz rojo

Al igual que en el caso del Maíz dulce, se observan dos picos: pico a correspondiente a la fracción “unbound” (etapa de adsorción en la purificación) y pico b correspondiente a la fracción “bound”, producido al realizar el enjuague de la columna con NaCl 1 M.

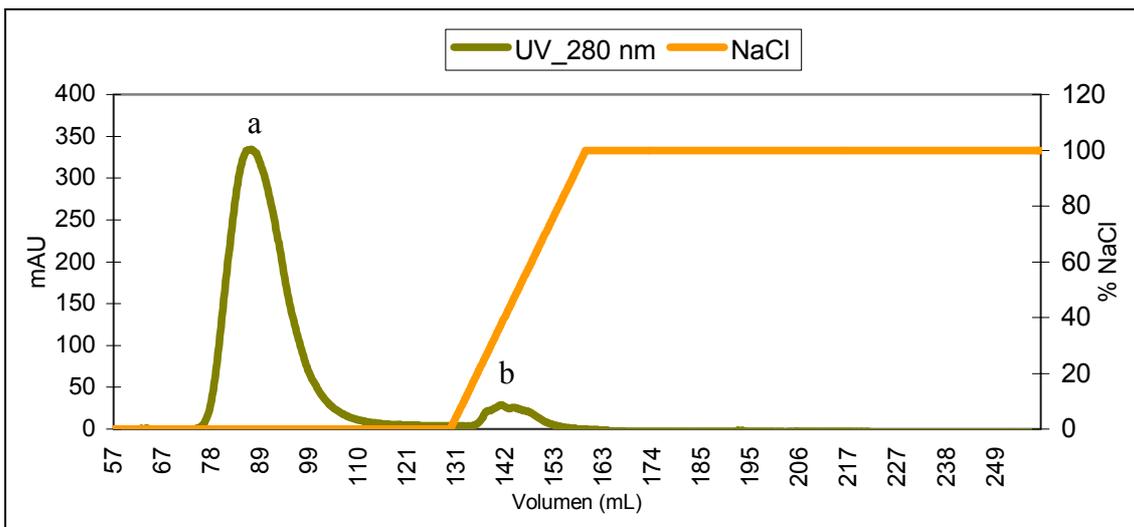


Gráfico 5.20 Cromatografía de Intercambio iónico para el extracto en Acetato de Amonio del maíz rojo

El test de actividad realizado para las fracciones del unbound y del bound a 500 nm, muestra que al igual que en el caso del maíz dulce, las fracciones que contienen el principio activo son las del unbound (3-23). Dichas fracciones, mantienen o incrementan su porcentaje de sedimentación (valores cercanos al 80 %) y evitan la cromatografía de filtración en gel para eliminar la sal previamente a la electroforesis al estar en una disolución salina muy diluida (Acetato de Amonio 10 mM).

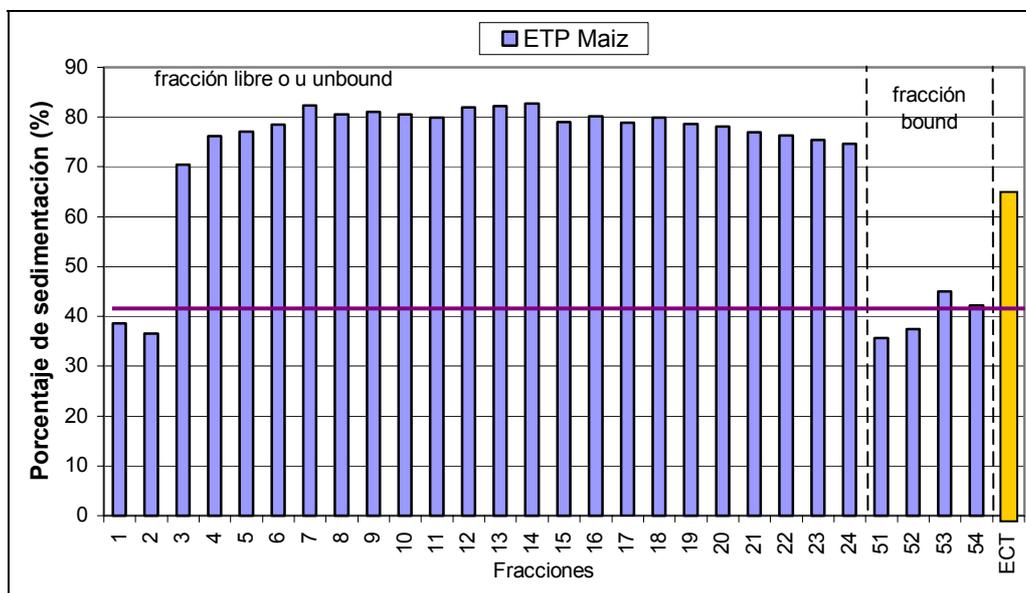


Gráfico 5.21 Test de actividad para el ETP del Maíz rojo tras el Intercambio Iónico

5.2.3 Caracterización e identificación del compuesto activo: Electroforesis en geles SDS-PAGE y Protocolo Nativo Ácido

5.2.3.1 SDS-PAGE

Los resultados de la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) para los extractos purificados de las semillas seleccionadas se muestran en el siguiente apartado.

A) Alubia roja

La figura 5.1 muestra las fotografías del gel con las fracciones desnaturalizadas de la proteína activa.

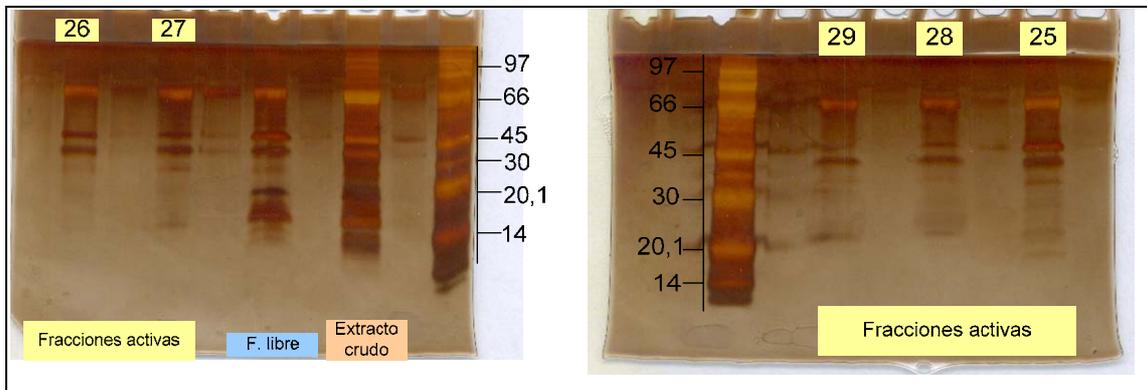


Figura 5.1 SDS-PAGE revelado en tinción de plata para el EAP Alubia roja
Fuente: Elaboración propia

Todas las fracciones activas (25, 26, 27, 28 y 29) presentan 3 bandas características. Una banda ancha con un peso molecular estimado de 67 kDa y dos bandas más estrechas con un peso molecular aproximado de 43 kDa. No se ha podido determinar el peso molecular aproximado de la proteína activa, ya que se desconoce cual de las 3 bandas es la responsable de la actividad coagulante.

La fracción de la región “unbound” presenta en el gel 6 bandas diferentes. Tres de ellas son similares a las obtenidas en las fracciones obtenidas en el “bound”, lo que explicaría la presencia de actividad coagulante en dicha fracción. Además las otras tres bandas, poseen un peso molecular aproximado de 30 kDa una y cercano al 20,1 kDa las otras dos.

B) Maíz dulce

La figura 5.2 muestra los geles obtenidos tras la electroforesis de los extractos purificados del maíz dulce.

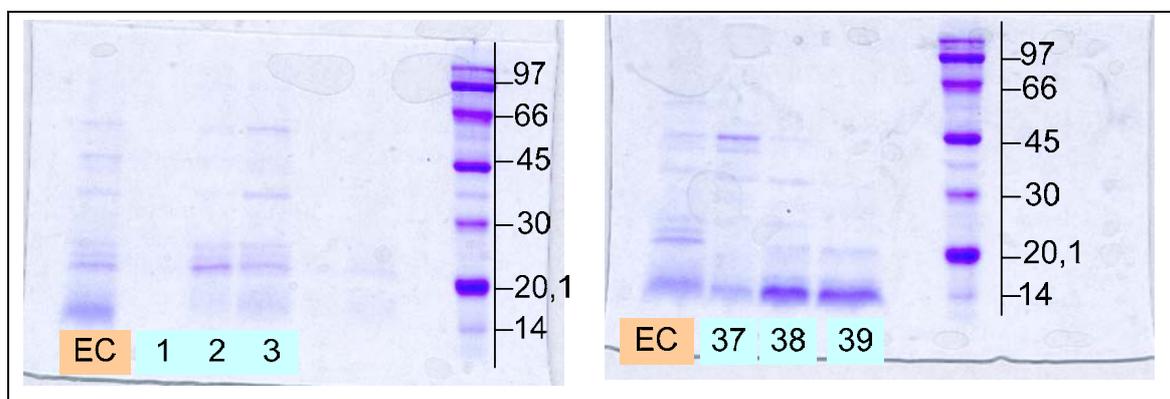


Figura 5.2 SDS-PAGE revelado en azul de Coomassie para el ETP de maíz dulce
Fuente: Elaboración propia

Las fracciones activas pertenecientes a la región del unbound (1, 2 y 3) presentan tres bandas, de peso molecular estimado 60, 37 y 21 kDa.

Las fracciones correspondientes al bound (37, 38 y 39) muestran más bandas y de mayor amplitud. Sólo la banda con peso molecular aproximado 20 kDa es común con las fracciones de la región bound. Las otras bandas obtenidas no serán objeto de análisis al carecer de actividad coagulante dichas fracciones.

C) Maíz rojo.

En la figura 5.3 se muestra los geles revelados tras el SDS-PAGE para el maíz rojo. El gel de la izquierda muestra las fracciones activas obtenidas durante el “unbound”. El gel de la derecha muestra una de las fracciones correspondientes al “bound” (correspondiente a la elución con el gradiente de NaCl).

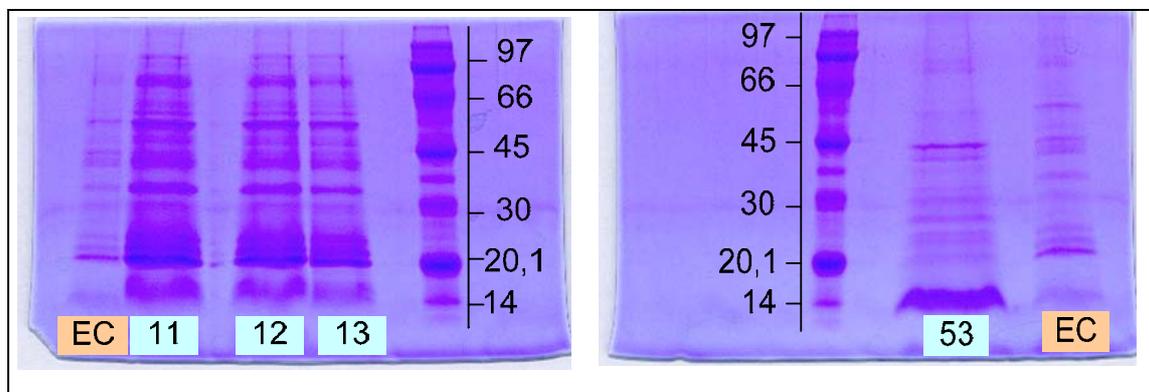


Figura 5.3 SDS-PAGE revelado en azul de Coomassie para ETP de Maíz rojo
Fuente: Elaboración propia

Tal y como se observa, la purificación con intercambio iónico no proporciona resultados positivos. Todas las bandas aparecen mezcladas y no se observa gran diferencia entre el “bound” (53), “unbound” (11,12 y 13) y el extracto crudo.

5.2.3.2 Protocolo Nativo Ácido

Los resultados del test de actividad se muestran en los siguientes gráficos:

A) Alubia roja

El gráfico 5.22 muestra los resultados del test de actividad para las fracciones de gel obtenidas tras realizar la electroforesis mediante protocolo nativo ácido, para la alubia roja.

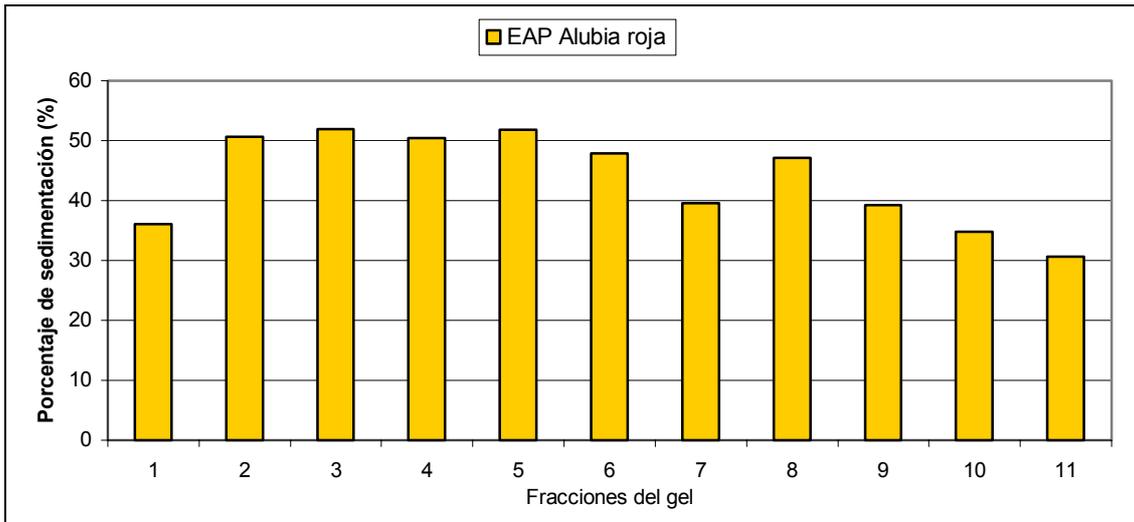


Gráfico 5.22 Test de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Alubia roja

En este caso, la fracción 1 es la lámina de gel que se encuentra próxima al electrodo negativamente cargado y la fracción 11 es la que se encuentra próxima al electrodo positivo. El gráfico muestra que la fracción más activa es la que se corresponde con la fracción 3.

Por tanto, se puede afirmar que la carga de la proteína activa de la alubia roja es positiva. Este resultado confirma, además, la correcta separación de las fracciones obtenida con el intercambio iónico empleando una columna catiónica, y que se obtuvieran las fracciones activas en la región "bound".

B) Maíz dulce

El gráfico 5.23 muestra los resultados del test de actividad para las fracciones del maíz dulce.

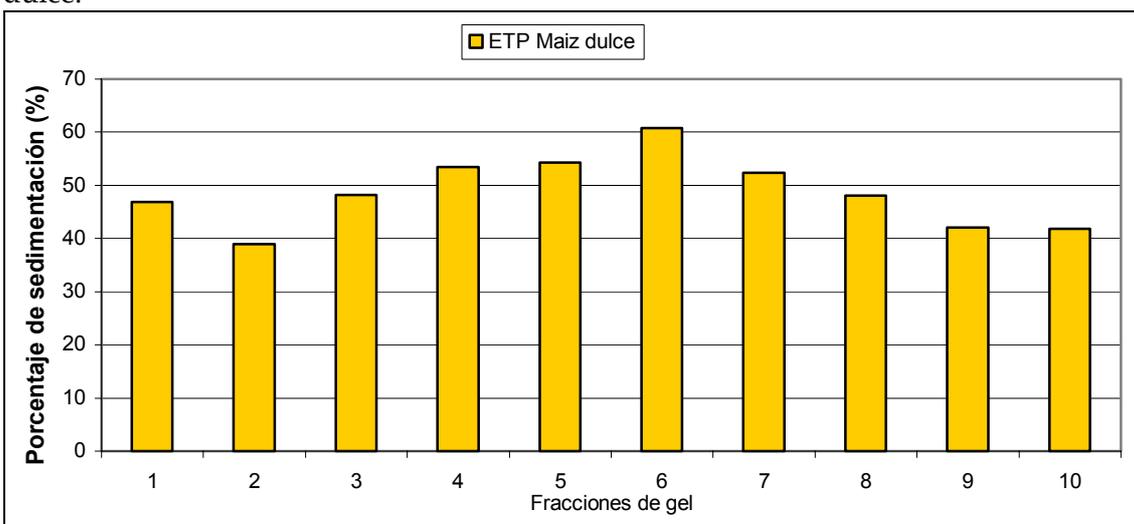


Gráfico 5.23 Test de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Maíz dulce

Al igual que en el caso anterior, la fracción 1 se corresponde con la más cercana al polo negativo (parte inferior del gel) y la fracción 10 es la fracción o lámina de gel más cercana al polo positivo (parte superior del gel).

Los resultados del test de actividad, muestran que de las 10 fracciones obtenidas, la fracción 6 es la que posee mayor actividad coagulante, con un porcentaje de sedimentación próximo al 60%.

Por tanto, se puede afirmar que la proteína activa del maíz dulce posee una carga neutra al someterse a electroforesis en un gel ácido.

C) Maíz rojo

El gráfico 5.24 muestra los resultados del test de actividad para el maíz rojo tras someterse al protocolo nativo ácido.

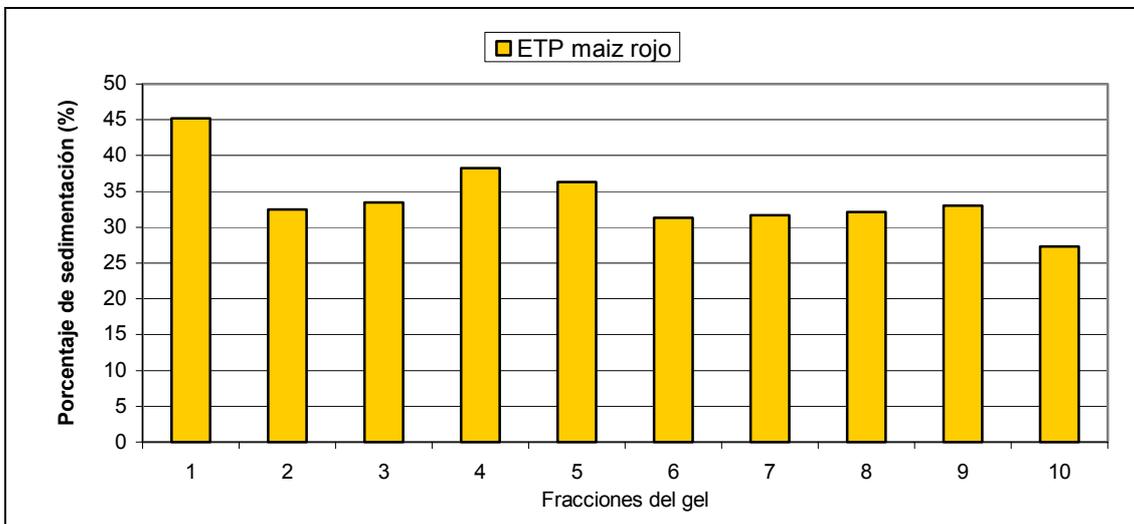


Gráfico 5.24 Test de actividad para fracciones de protocolo nativo ácido de Maíz rojo

La fracción 1 es la que presenta una mayor actividad coagulante, con un porcentaje de sedimentación del 45 %, lo que permite deducir que la proteína activa de esta semilla posee carga positiva.

Sin embargo, este hecho supone una contradicción ya que:

- si la proteína activa tuviera carga positiva, esta se hubiera unido a la matriz catiónica durante la cromatografía de intercambio iónico y no se hubiera diluido en la fracción "unbound" como se vio en los resultados del test de actividad.
- el maíz dulce, que pertenece a la misma familia botánica, posee carga neutra, lo que se podría concluir para el maíz rojo.
- además, los valores de actividad del ensayo son muy bajos comparados con los que se obtienen en los test previos para esta semilla. La pérdida de actividad puede ser debida entre otras razones a:
 - la concentración de proteína en cada fracción es muy baja
 - errores experimentales tales como que el corte de las láminas de gel no se realizó con suficiente rapidez y las proteínas se difundieron en el gel, perdiéndose la separación alcanzada.

Por tanto, los resultados para este ensayo no fueron concluyentes.

5.2.4 Conclusiones de la purificación del compuesto activo

La purificación y caracterización del compuesto activo de las semillas permite obtener las siguientes conclusiones:

- La desalación por cromatografía de filtración en gel, reduce la actividad coagulante de los extractos crudos de las tres semillas estudiadas.

- La purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, mejora la capacidad coagulante de los extractos crudos procedentes de las tres semillas estudiadas.

De hecho, es posible purificar la proteína con actividad coagulante de la alubia roja, siguiendo el mismo método que para la *Moringa oleifera*. La purificación del maíz dulce y el maíz rojo siguiendo el mismo método que para la *Moringa oleifera*, no ha permitido obtener resultados concluyentes. Todas las proteínas activas se encuentran en la fracción unbound, lo que induce a pensar que aunque tengan capacidad coagulante similar, la naturaleza y estructura de la proteína es diferente, por lo que precisa un protocolo de purificación alternativo.

- La electroforesis desnaturalizante permite obtener la distribución de pesos moleculares de las fracciones activas obtenidas a partir del extracto crudo purificado. La alubia roja y el maíz dulce muestran tres bandas claramente definidas pertenecientes a las proteínas de las fracciones activas.

- La electroforesis nativa permite estimar la carga eléctrica neta de las proteínas de la fracción activa. Para la alubia roja, la carga eléctrica obtenida es positiva y neutra para el maíz dulce.

5.3 Test Antimicrobiano

Finalmente, los ensayos a escala de laboratorio evalúan la capacidad antimicrobiana del extracto a través de test que estudian la inhibición del crecimiento celular y test de agrupación celular.

5.3.1 Test de crecimiento

A continuación se muestran los resultados de los test de crecimiento realizados, en los que se monitoriza la cinética de crecimiento de diferentes cepas bacterianas, sometidas a diferentes concentraciones de coagulante primario extraído de las semillas.

A) Test A: Evaluación de la inhibición del crecimiento celular para alubia roja y maíz dulce para concentraciones de 0.1-10 µg/mL

En este ensayo, se analiza la evolución de las curvas de crecimiento de los cultivos bacterianos y medios inoculados con el extracto acuoso (EAP) de la alubia roja y el extracto en acetato de amonio (ETP) del maíz dulce. Asimismo, se analiza la influencia

que pudiera tener la presencia del tampón acetato sobre el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* cepa K-12 y D-21.

-*Escherichia coli* cepa K-12

En los gráficos 5.25 y 5.26 se muestran los resultados del test de crecimiento para el extracto acuoso de la alubia roja y el extracto en acetato de amonio del maíz dulce. La curva en color rojo representa el control o blanco, es decir la evolución de la curva de absorbancia para el medio de crecimiento y el cultivo (en este caso *Escherichia coli* cepa K-12) sin adición de coagulante.

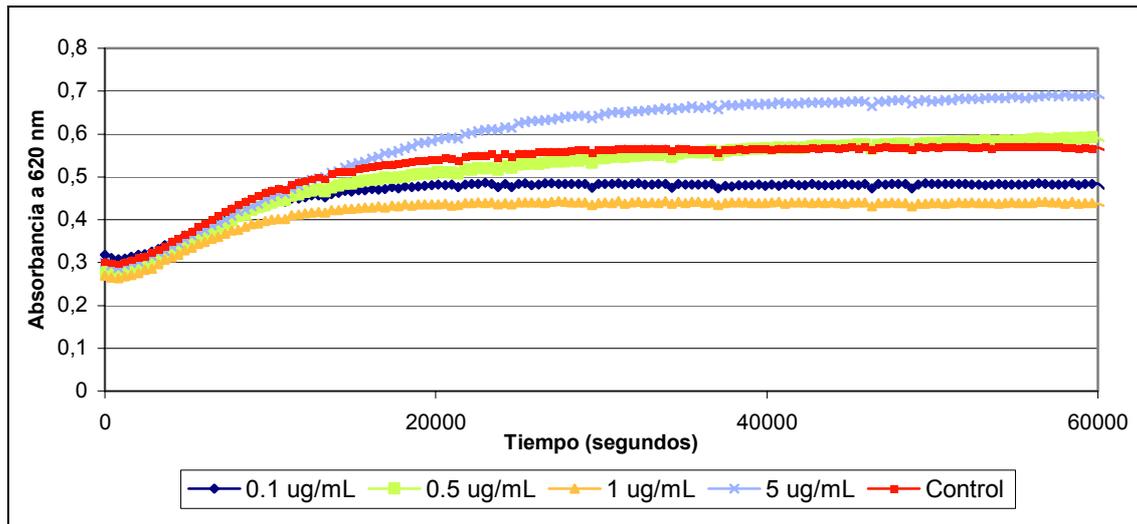


Gráfico 5.25 Test microbiológico de la *Escherichia coli* cepa K-12, para la alubia roja.

El gráfico 5.25 muestra que las concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína purificada del extracto de alubia roja muestran una inhibición parcial o cierta ralentización del crecimiento celular del cultivo al permanecer las curvas de absorbancia en valores inferiores a los mostrados por el control o blanco. La concentración más elevada, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no posee efecto sobre el crecimiento bacteriano del cultivo.

El gráfico 5.26 muestra los efectos de la proteína purificada de maíz dulce sobre el cultivo de *Escherichia coli*, cepa K-12.

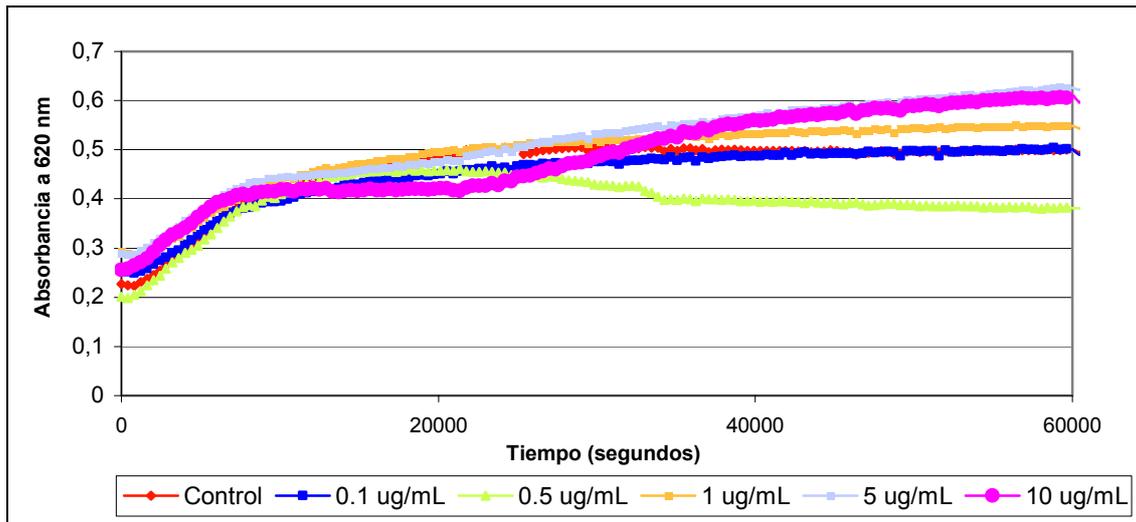


Gráfico 5.26 Test microbiológico de la *Escherichia coli* cepa K-12, para el maíz dulce

En la representación se observa que la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ posee cierta inhibición sobre la curva que representa el crecimiento celular del cultivo, al compararlo con el blanco, que no contiene extracto coagulante de proteína. El resto de concentraciones estudiadas no poseen inhibición alguna del crecimiento celular.

-*Escherichia coli* cepa D-21

Los gráficos 5.27 y 5.28 muestran los resultados para el test microbiológico para la *Escherichia coli* cepa D-21.

En el gráfico 5.27 se observa que los resultados obtenidos para el extracto de alubia roja son similares a los obtenidos para el caso de la cepa K-12. Únicamente los cultivos bacterianos tratados con la concentración de proteína más baja (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) muestran unas curvas de crecimiento por debajo de la curva del blanco, lo que evidencia cierta inhibición del crecimiento celular. El resto de concentraciones estudiadas, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no muestran inhibición o retardo del crecimiento bacteriano.

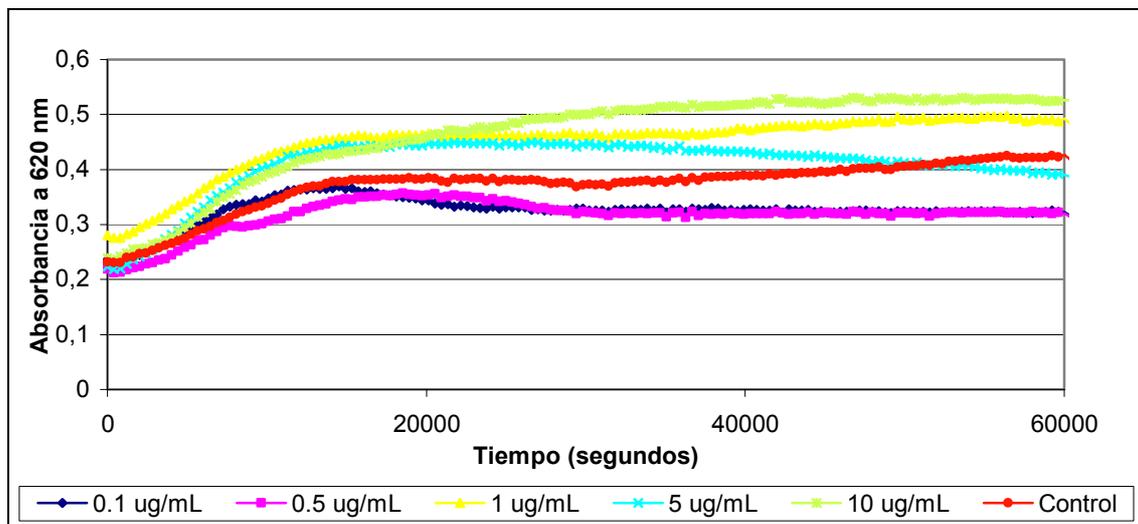


Gráfico 5.27 Test microbiológico de la *Escherichia coli* cepa D-21, para la alubia roja

Para el maíz dulce, el gráfico 5.28 muestra que sólo la concentración de proteína de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta una disminución del crecimiento bacteriano de la *E. coli* cepa D-21, al estar por debajo de la curva de crecimiento que marca el control o blanco.

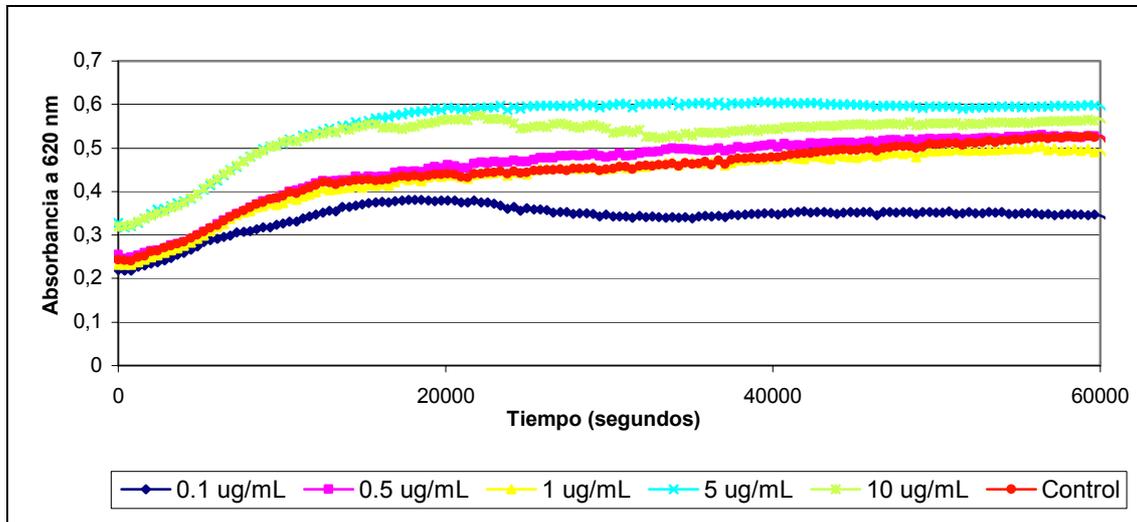


Gráfico 5.28 Test microbiológico de *Escherichia coli* cepa D-21, para maíz dulce

-*Escherichia coli* cepa D-31

Los gráficos 5.29 y 5.30 muestra los resultados del Test microbiológico para la *Escherichia coli* cepa D-31.

En el gráfico 5.29 se observa que para la alubia roja, todas las concentraciones de proteína probadas presentan curvas de crecimiento por encima del control, por lo que se puede afirmar que no hay actividad antimicrobiana de este compuesto activo en esta cepa.

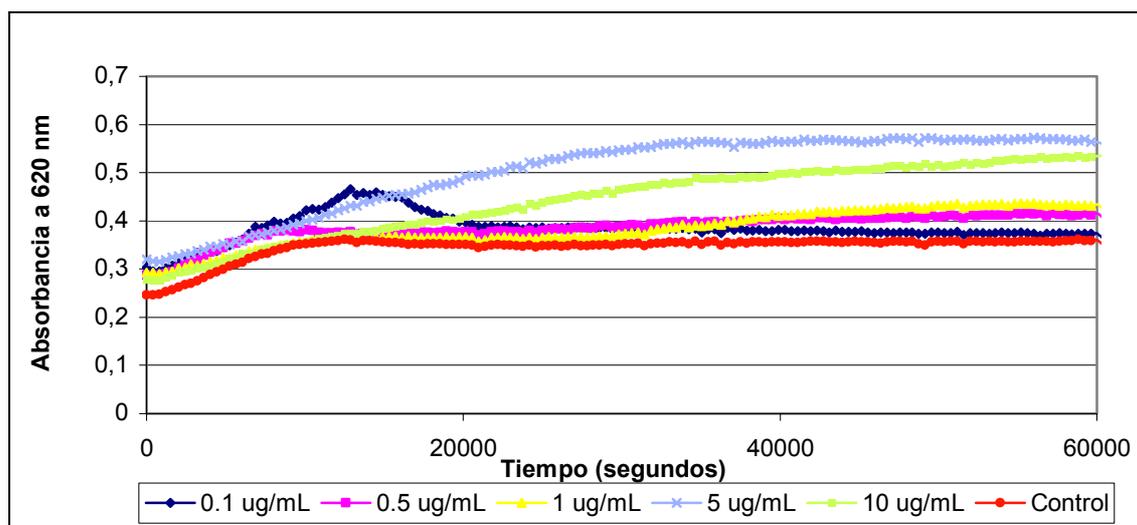


Gráfico 5.29 Test microbiológico de la *Escherichia coli* cepa D-31, para alubia roja

Para el maíz dulce, el gráfico 5.30 muestra que sólo la concentración de proteína más baja (0,1µg/mL) muestra inhibición parcial del crecimiento microbiano comparado con el blanco. Sin embargo, la curva aparece prácticamente paralela al control por lo que el resultado obtenido no es concluyente y no permite afirmar la existencia de actividad bactericida en este caso.

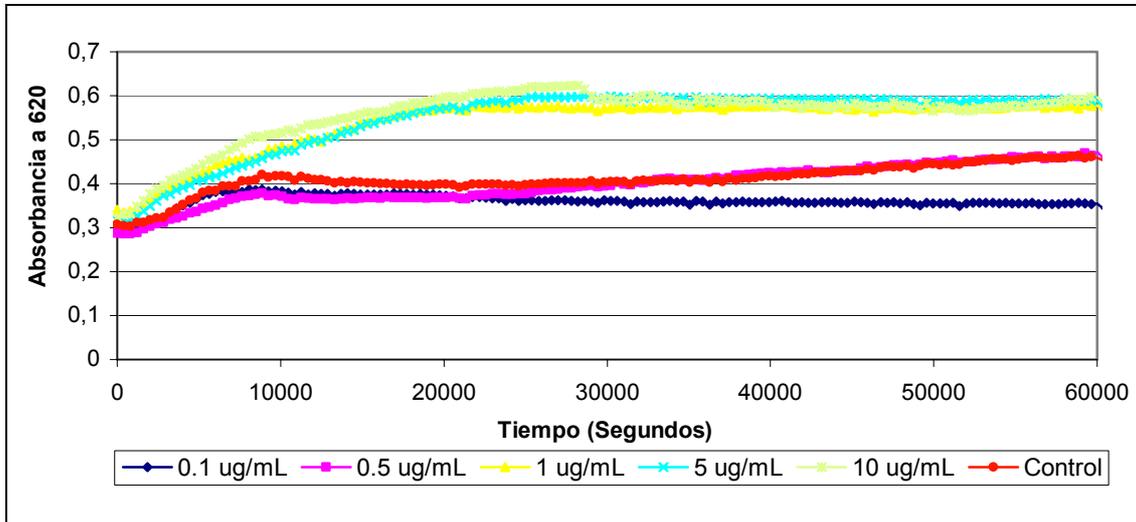


Gráfico 5.30 Test microbiológico de la *Escherichia coli* cepa D-31, para maíz dulce

-*Pseudomonas*

Los gráficos 5.31 y 5.32 muestran los resultados del test microbiológico para las cepas de *Pseudomonas*.

En el gráfico 5.31 se observa que para la alubia roja, ninguna de las concentraciones de proteína probadas muestran curvas de crecimiento por debajo de la curva del control o blanco, lo que significa que no hay inhibición del crecimiento bacteriano, por la adición del extracto de la semilla al cultivo celular.

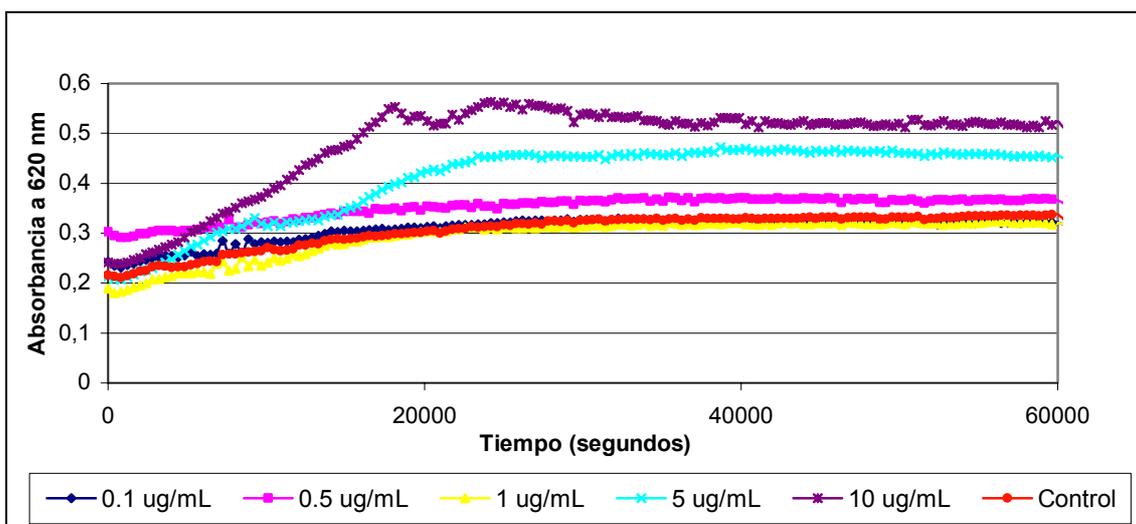


Gráfico 5.31 Test microbiológico de *Pseudomonas*, para alubia roja

Para el maíz dulce, el gráfico 5.32 muestra que las concentraciones de proteínas de 0,1µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL presentan curvas de crecimiento por debajo

de la curva del blanco. La excepción es la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuya curva supera el control o blanco. Sin embargo, este efecto no es muy acusado y se necesitan más estudios al respecto para concluir una posible inhibición o atenuación del crecimiento celular microbiano en este rango de concentración.

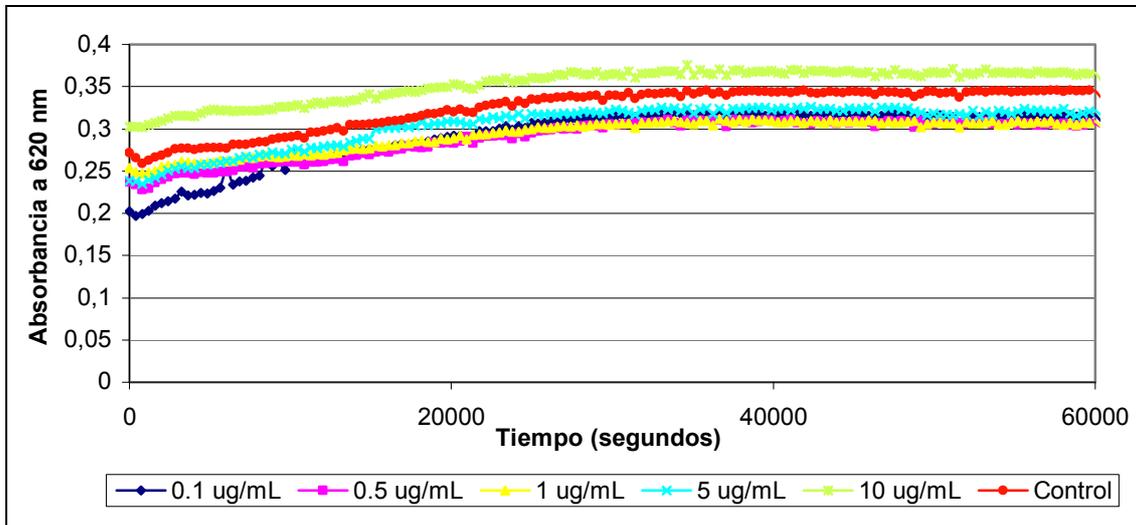


Gráfico 5.32 Test microbiológico de *Pseudomonas*, para maíz dulce

-*Staphylococcus*

Los gráficos 5.33 y 5.34 muestran los resultados del test microbiológico para *Staphylococcus*.

El gráfico 5.33 muestra que para la alubia roja, ninguna de las concentraciones de proteína estudiada muestran actividad antimicrobiana para el cultivo de *Staphylococcus* ni inhiben el crecimiento celular del mismo.

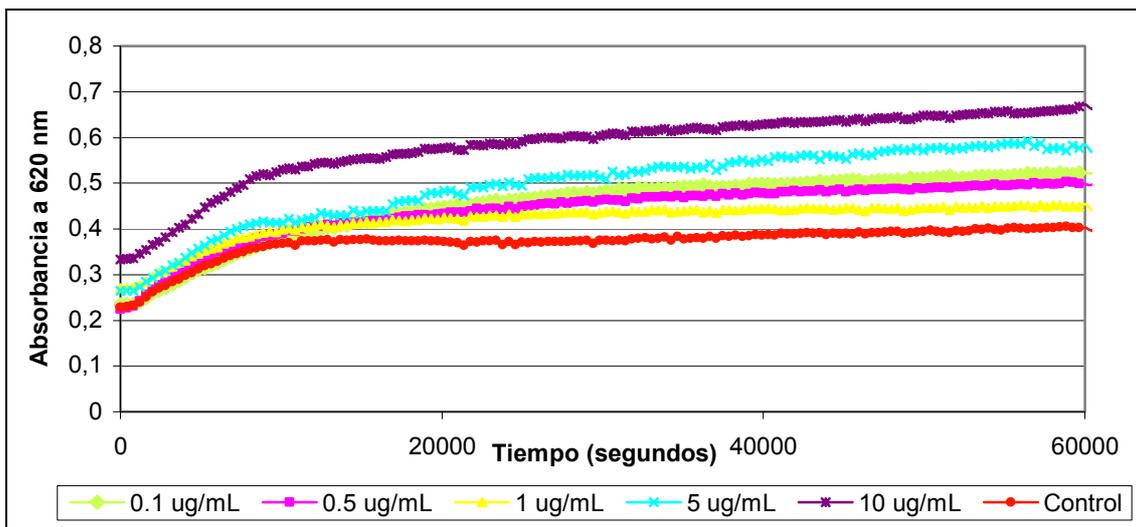


Gráfico 5.33 Test microbiológico para *Staphylococcus*, para alubia roja

El gráfico 5.34 indica que para el caso del maíz dulce, solo la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestra una curva de crecimiento por debajo del control, lo que indica inhibición del crecimiento celular para esta cepa.

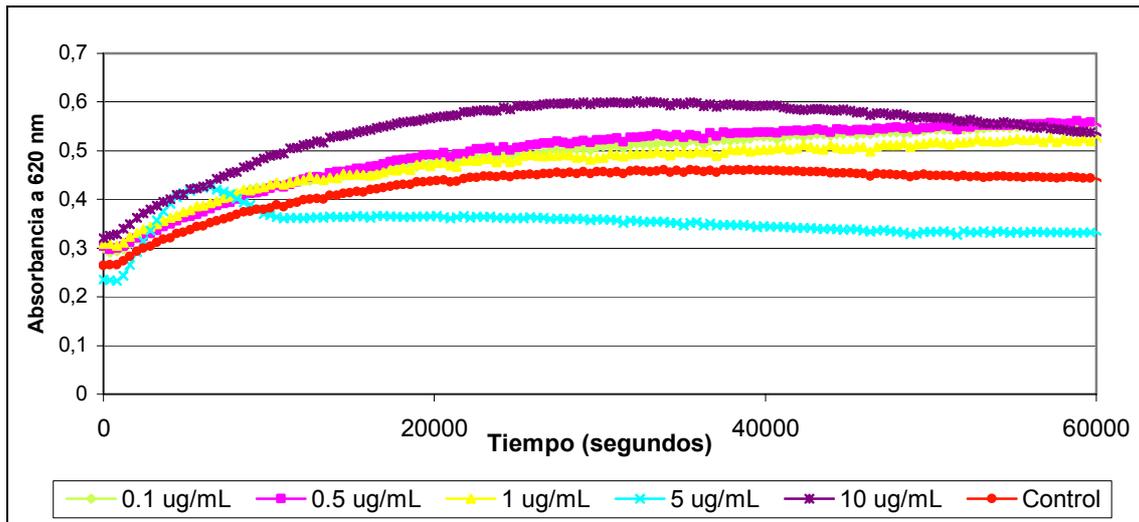


Gráfico 5.34 Test microbiológico para *Staphylococcus*, para maíz dulce

B) Test B: Test de inhibición de crecimiento para una concentración fija de proteína coagulante

A continuación se muestran los resultados obtenidos para concentraciones de proteína de 0.2 mg/mL y 0.6 mg/mL. Se estudiará en cada ensayo la influencia que el Acetato de amonio pueda tener sobre el medio nutriente y el cultivo. La curva de crecimiento de la disolución amortiguadora viene representada en cada gráfico.

-*Escherichia coli* cepa K-12

El gráfico 5.35 muestra los principales resultados obtenidos para el ensayo de crecimiento celular de la *Escherichia coli* cepa K-12, utilizando extractos purificados de alubia roja y maíz dulce.

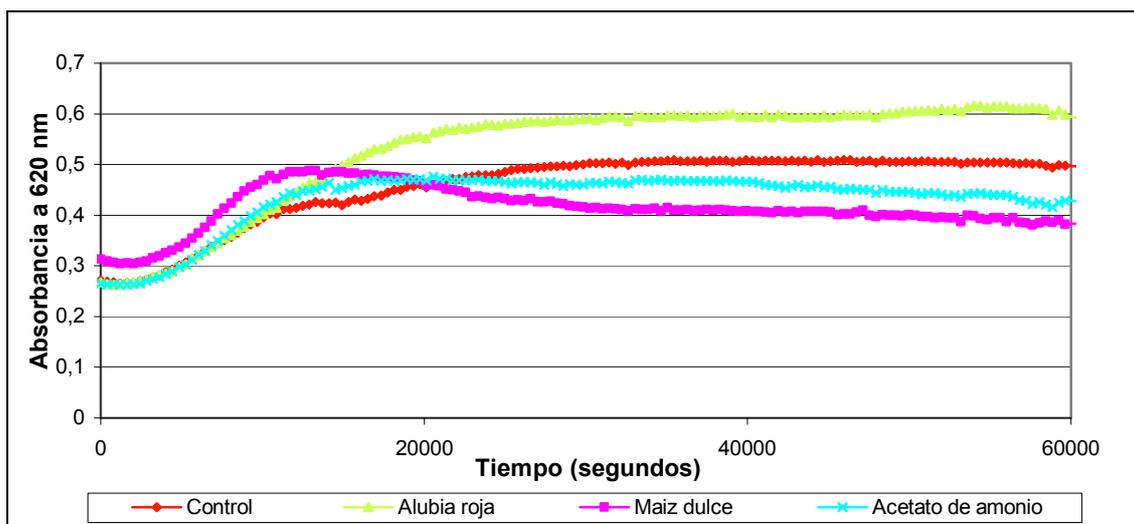


Gráfico 5.35 Test microbiológico para la *Escherichia coli* cepa K-12

La alubia roja (EPA) muestra una curva de crecimiento por encima de la curva de crecimiento del control por lo que se deduce que el extracto de esta semilla a la

concentración probada (0.2 mg/mL), no posee capacidad antimicrobiana en el sentido de reducir, inhibir o retardar el crecimiento de los microorganismos, tal y como se había observado en el gráfico 4.24.

La concentración de ETP de maíz dulce probada (0.2 mg/mL), presenta una curva de crecimiento que tras alcanzar un máximo entorno a los 15000 segundos de ensayo, empieza a decrecer hasta situarse por debajo de la línea de control. Esto supone una inhibición parcial del crecimiento de el microorganismo *Escherichia coli* cepa K-12 si se compara con el blanco.

La curva del tampón Acetato de Amonio se asemeja a la del control, situándose por debajo de este a partir de los 20000 segundos. Esto podría significar que la presencia del tampón acetato en el medio nutriente y el cultivo afecta de algún modo a este último retardando su crecimiento. En cualquier caso, no se puede afirmar que la presencia de actividad antimicrobiana del maíz dulce sea debida solo a la proteína presente y no a la disolución tampón. Se necesitan hacer más estudios con el fin de confirmar los resultados.

-*Escherichia coli* cepa D-31

El gráfico 5.36 muestra los resultados del test microbiológico para la *Escherichia coli* cepa D-31.

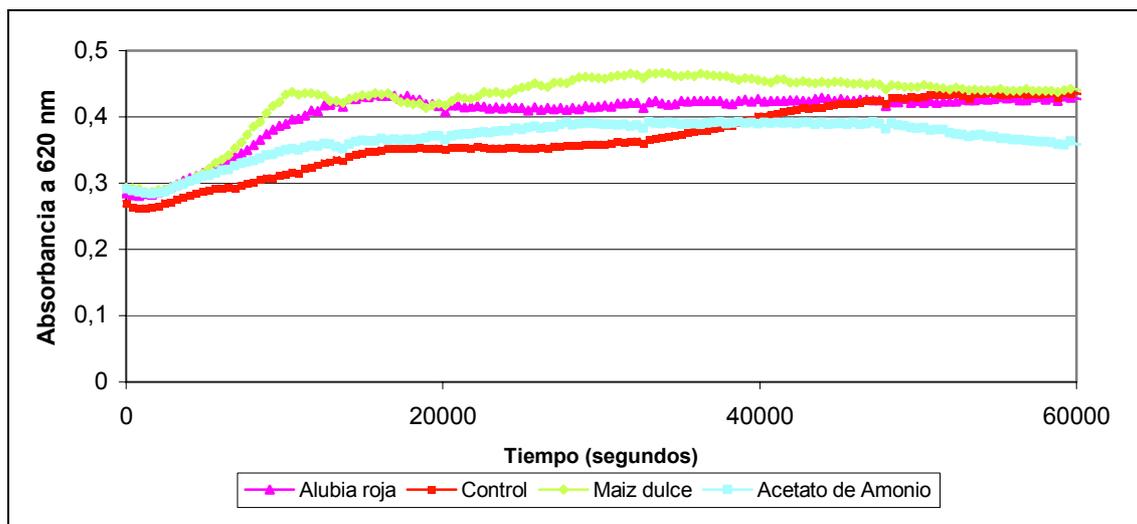


Gráfico 5.36 Test microbiológico para la *Escherichia coli* cepa D-31

La concentración de 0.2 mg/mL de EPA de alubia roja muestra los mismos resultados que para la cepa k-12 y no se aprecia efecto antimicrobiano a la concentración estudiada. Las mismas conclusiones se obtienen para el maíz dulce y el acetato de amonio.

-*Pseudomonas*

El gráfico 5.37 muestra los resultados del test microbiológico para la bacteria *Pseudomonas*.

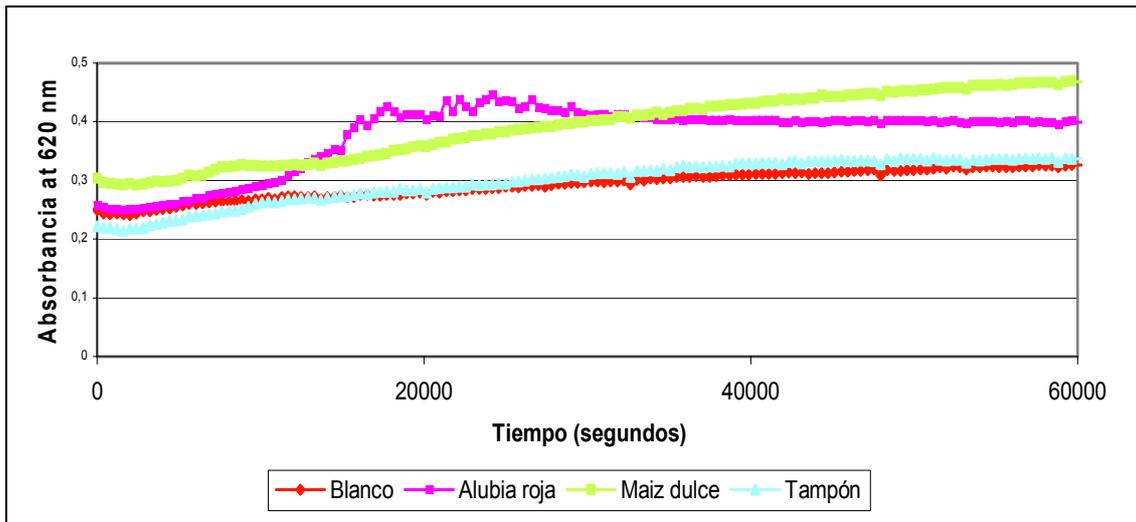


Gráfico 5.37 Test microbiológico para *Pseudomonas*

Del gráfico se concluye que no hay efectos antimicrobianos para la alubia roja, maíz dulce ni para el acetato de amonio a la concentración estudiada (0.2 mg/mL). La curva del tampón Acetato de Amonio se asemeja a la del control, no se aprecia efecto inhibidor de este en el crecimiento.

-*Bacillus thuringiensis* cepa-5

El gráfico 5.38 muestra los resultados del test de crecimiento celular para la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa 5.

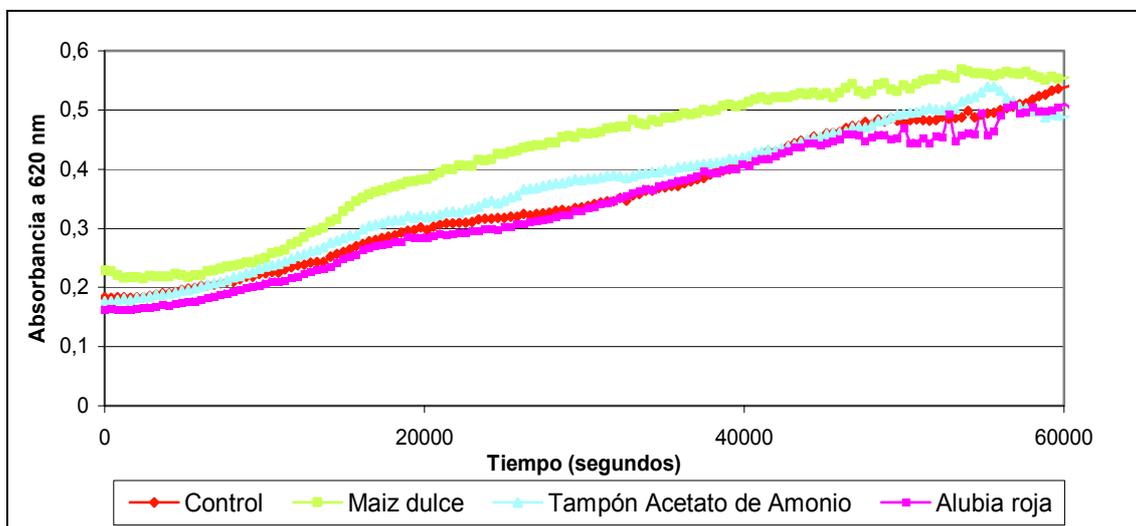


Gráfico 5.38 Test microbiológico para *Bacillus thuringiensis* cepa 5

Tal y como se comentó en el gráfico anterior, no se observa actividad antimicrobiana para las concentraciones probadas de proteínas (0.6 mg/mL) en las semillas de alubia roja, maíz dulce y tampón de Acetato de amonio.

5.3.2 Test de formación de flóculos celulares (“clumping”)

Finalmente, los bioensayos se completan con la realización del test de agrupamiento celular para las especies de *Bacillus thuringiensis* cepa 5, 7 y 75, *Escherichia coli* cepa D-21, D-31 y K-12, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Bacillus thuringiensis -5

En la figura 5.4 se muestran las imágenes del microscopio tomadas del control (constituido por el medio nutriente y la cepa de cultivo) y de los cultivos celulares tratados con los extractos de las semillas de maíz dulce y de alubia roja. Para la alubia roja se observa la formación de pequeños flóculos de *Bacillus thuringiensis* cepa 5 al compararlo con el blanco, por lo que se podría concluir cierta capacidad coagulante del extracto acuoso a esta concentración, dicho resultado no es concluyente. Para el maíz dulce no se observa formación de flóculos celulares.

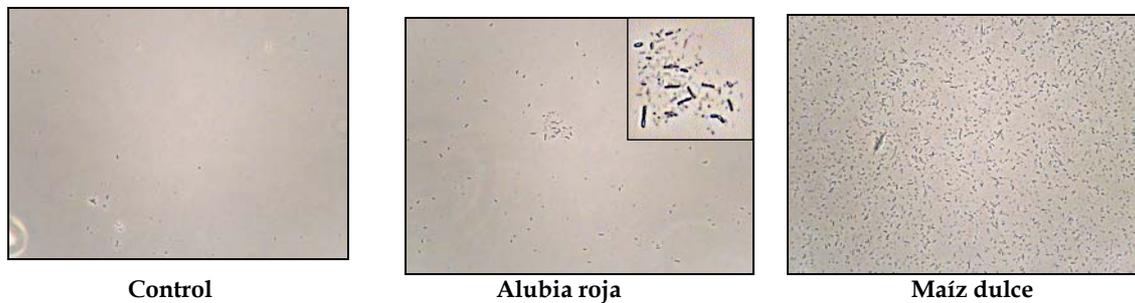


Figura 5.4 Test de agrupamiento celular para *Bacillus thuringiensis* cepa 5
Fuente: Elaboración propia

Bacillus thuringiensis -7

En la figura 5.5 se observa que tanto los extractos de la alubia roja y maíz dulce no poseen capacidad formadora de flóculos celulares para la cepa Bt-7.

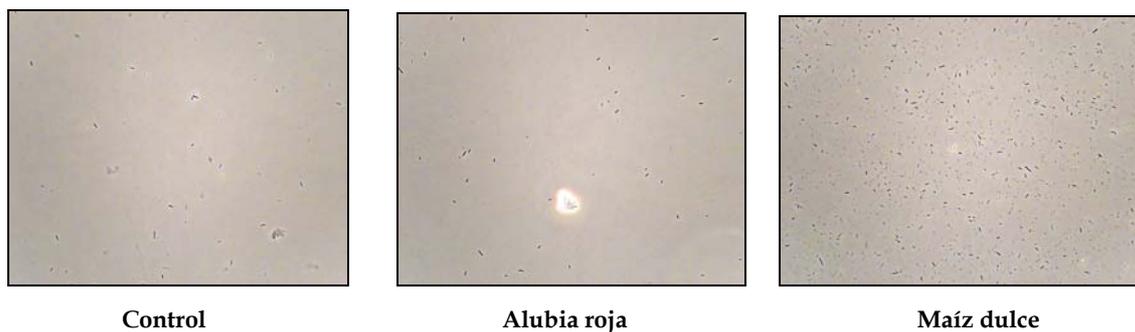


Figura 5.5 Test de agrupamiento celular para *Bacillus thuringiensis* cepa 7
Fuente: Elaboración propia

Bacillus thuringiensis -75

En la figura 5.6, se muestran los resultados del ensayo para el agrupamiento celular. La observación al microscopio del cultivo de Bt-5 tratado con extracto de la alubia roja, muestra una considerable agregación celular. Las células de Bt-75 en contacto con al

extracto purificado de alubia roja, se muestran inmobilizadas, deformadas y en algunos casos, con el citoplasma fuera de la célula, mientras que las células del control o blanco permanecen intactas y con un movimiento rápido.

El maíz dulce, muestra la formación de unos pequeños flóculos celulares tras 3 horas de incubación. Con el fin de confirmar este último resultado, se deberán realizar más tests, con concentraciones mayores de proteínas o bien incrementando el tiempo de incubación.

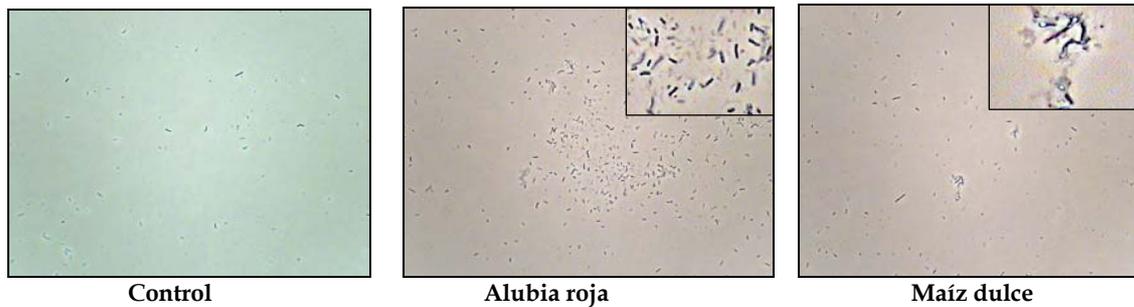


Figura 5.6 Test de agrupamiento celular para *Bacillus thuringiensis* cepa 75
Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli cepa D-21

La figura 5.7 muestra que tanto los extractos de la alubia roja como del maíz dulce no poseen actividad formadora de flóculos celulares, para esta cepa, tras 3 horas de incubación.

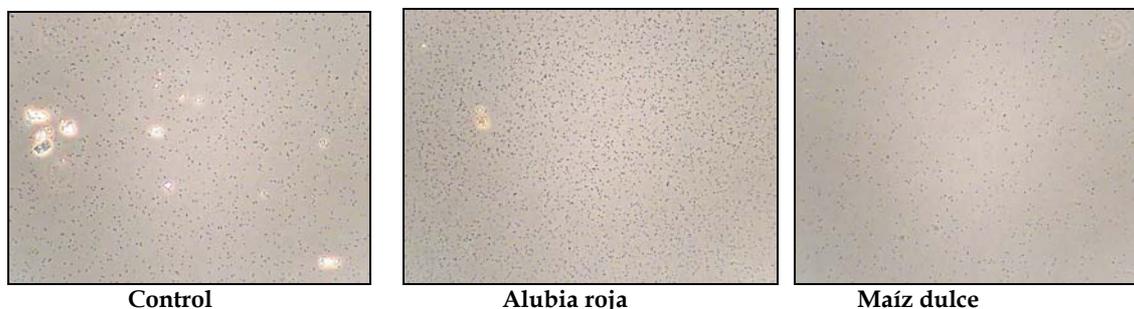


Figura 5.7 Test de agrupamiento celular para *Escherichia coli* cepa D-21
Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli cepa D-31

La figura 5.8 permite observar que para el caso de la bacteria *Escherichia coli* cepa D-31, la alubia roja no muestra actividad formadora de flóculos. Sin embargo, para el maíz dulce se observan pequeños flóculos tras 3 horas de incubación, aunque también un incremento de la población bacteriana en el cultivo.



Figura 5.8 Test de agrupamiento celular para *Escherichia coli* cepa D-31
Fuente: Elaboración propia

Escherichia coli cepa K-12

La figura 5.9 muestra que no hay actividad formadora de flóculos ni para la alubia roja ni para el maíz dulce, aunque se observa una menor densidad de bacterias en el cultivo tratado con extracto crudo de alubia roja.



Figura 5.9 Test de agrupamiento celular para *Escherichia coli* cepa K-12
Fuente: Elaboración propia

Pseudomonas

La figura 5.10 muestra que no hay actividad formadora de flóculos ni para la alubia roja ni para el maíz dulce.



Figura 5.10 Test de agrupamiento celular para *Pseudomonas*
Fuente: Elaboración propia

5.3.3 Conclusiones del test antimicrobiano

El test antimicrobiano permite obtener las siguientes conclusiones:

- El test de crecimiento celular, ha mostrado los mejores resultados para el rango de concentraciones de 0.1 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en los extractos de las semillas de alubia roja y maíz dulce y para las bacterias de *Escherichia coli* K-12 y D-21.
- En el test de floculación celular, se ha obtenido los mejores resultados para la alubia roja, en las cepas Bt-5, Bt-75 y para el maíz dulce Bt-75 y *E. coli* D-31.

5.4 Resultados de la aplicación real

5.4.1 Test de actividad coagulante

En este apartado, se muestran los resultados más representativos del test de actividad coagulante primaria para los extractos crudos obtenidos.

A) Agua turbia sintética

En los ensayos con agua turbia sintética, se obtuvieron únicamente resultados positivos para el maíz amarillo y el maíz blanco.

En la figura 5.11, se muestra el resultado del test de actividad en tubo de ensayo para el maíz blanco. Los tubos de ensayo de la columna de la derecha representan el blanco, los tubos de la fila inferior, son los que contienen 600 μL de extracto crudo, los de la fila central contienen 300 μL de extracto y los de la fila superior contienen 150 μL de extracto. Los tubos de la columna de la izquierda de la figura, han sido tratados con el extracto acuoso (ECA), los de la segunda columna por la izquierda fueron tratados con el extracto salino 0.5 M (ECS1), los de la tercera columna con el extracto salino 0.25 M (ECS 2) y los de la cuarta columna con el extracto salino 0.125 M (ECS 3).



Figura 5.11. Test de actividad cualitativo para maíz blanco y agua turbia sintética

Fuente: Elaboración propia

En la figura se observa, que los tubos de ensayo poseen parte de la materia en suspensión precipitada en la parte inferior de los mismos. Los extractos más eficaces para el maíz blanco son los extractos salinos de mayor concentración, ECS1 seguidos por los ECS2 y los de menor concentración, ECS3. Los resultados para el ECA no son positivos.

Por comparación visual con el blanco, se determina que la concentración más efectiva es la de 600 μL de extracto crudo, seguido por 300 μL y por 150 μL de extracto. Dicho resultado confirma los resultados obtenidos a nivel de laboratorio para el maíz, donde se obtuvo que los extractos salinos eran más efectivos que los extractos acuosos y que en todos los casos, los extractos no admitían diluciones sin pérdida de la actividad coagulante.

B) Agua superficial

En los ensayos con agua superficial, se obtuvieron únicamente resultados positivos para el maíz amarillo y el maíz blanco.

En la figura 5.12 se muestra el resultado del test de actividad en tubo de ensayo para el maíz amarillo.

El blanco o control aparece a la izquierda de la fotografía, el resto de tubos de izquierda a derecha son: el agua superficial tratada con 150 μL del extracto preparado con la disolución de agua destilada, el siguiente es el extracto preparado con la disolución de NaCl 0,125 M, el tercero tratado con la disolución NaCl 0,25 M, y el de la derecha, con la disolución de NaCl 0.5 M.



Figura 5.12. Test de actividad cualitativo para el maíz dulce (150 μL) y agua de quebrada
Fuente: Elaboración propia

En la figura se observa, al igual que en el caso de la disolución turbia sintética, como los extractos salinos son más efectivos que los acuosos. Se observan diferencias cualitativas entre el blanco y los tubos que contienen el agua tratada con los extractos crudos de maíz dulce. En la parte inferior del tubo de ensayo tratado con el extracto ECS1, se observa un precipitado de color pardo tras 1 hora de sedimentación.

En la figura 5.13 se muestra el resultado del test de actividad en tubo de ensayo para el maíz amarillo.



Figura 5.13. Test de actividad cualitativo para el maíz dulce (300 μL) y agua de quebrada
Fuente: Elaboración propia

Al igual que en el caso de la figura anterior, se observa que los extractos salinos son más efectivos que los acuosos. Además a mayor concentración salina, se obtiene mayor cantidad de precipitado en comparación con el blanco.

Comparando los resultados del test cualitativo de actividad, de las figuras 5.12 y 5.13, se observa que el agua de quebrada tratada con mayor volumen de extracto, ofrece mejores resultados en el test de actividad, en el sentido de formar mayor cantidad de precipitado tras 60 minutos de sedimentación.

5.4.2 Test antimicrobiano

Los resultados del test antimicrobiano se muestran a continuación.

En la figura 5.14 se muestran los resultados del test antimicrobiano para el extracto crudo de maíz blanco, siguiendo el esquema de inoculación indicado en la metodología. La imagen de la izquierda, muestra los resultados para el test antimicrobiano del agua de quebrada tratada con 150 μL de extracto crudo de maíz blanco, y la de la derecha el agua tratada pero con 300 μL de extracto crudo de la misma semilla.

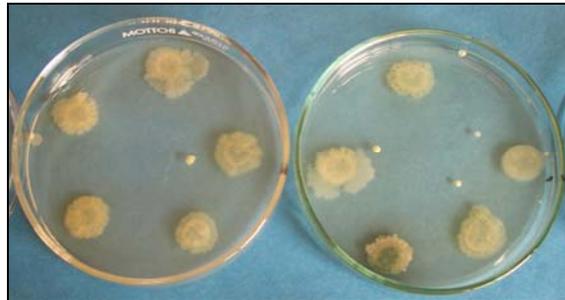


Figura 5.14 Resultados del test microbiológico para 150 y 300 μL de extracto de maíz blanco
Fuente: Elaboración propia

En la figura se observa que para todas las muestras inoculadas, aparece crecimiento de colonias de bacterias en el medio de cultivo de la placa Petri. No se observa diferencia significativas para entre los resultados de las placas tratadas con 150 μL de extracto crudo y con 300 μL de este.

En la figura 5.15 se muestran los resultados del test antimicrobiano para el extracto crudo de maíz amarillo, siguiendo el esquema de inoculación indicado en la metodología. Al igual que en el caso anterior, la imagen de la izquierda, muestra los resultados para el test antimicrobiano del agua de quebrada tratada con 150 μL de extracto crudo de maíz amarillo, y la de la derecha el agua tratada pero con 300 μL de extracto crudo de la misma semilla.

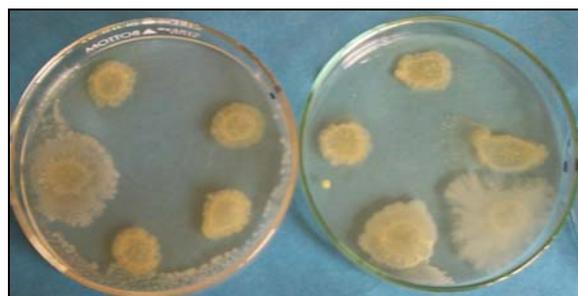


Figura 5.15 Resultados de test microbiológico para 150 y 300 μL de extracto de maíz dulce
Fuente: Elaboración propia

La figura permite afirmar que no se aprecian diferencias entre el agua procedente de una vertiente y el agua tratada con coagulantes naturales, en relación a la disminución del número de unidades formadoras de colonias presentes.

Estos resultados, confirman los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, en los tests de crecimiento celular donde se observaba la ausencia de inhibición del crecimiento bacteriano por la presencia del extracto crudo en el cultivo celular ensayado.

Finalmente, se muestran los resultados del ensayo realizado para el agua tratada con 150 y 300 μL de extracto, seguida de un tratamiento con 0.1 ppm de cloro.

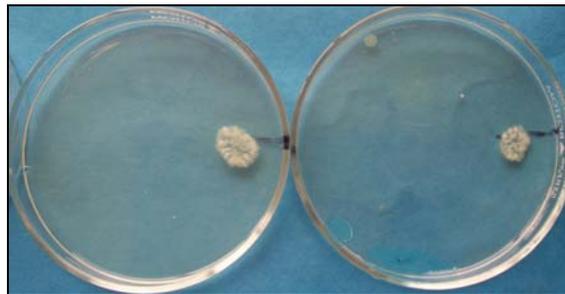


Figura 5.16 Resultados de test microbiológico para 150 y 300 μL de extracto de maíz blanco
Fuente: Elaboración propia

En la figura 5.16 se observa, la ausencia de crecimiento de colonias en las muestras tratadas con el maíz blanco y el cloro, y la presencia de bacterias en la muestra de agua de quebrada no tratada.

Este último resultado deja de manifiesto, la eficacia de la disolución tratada con extractos de coagulantes naturales y cloro, lo que deberá ser estudiado en los ensayos posteriores como un tratamiento combinado de potabilización: clarificación con coagulantes naturales y desinfección con cloro.

5.4.3 Conclusiones de la aplicación real

La aplicación real permite concluir que:

- Es posible utilizar el protocolo de trabajo desarrollado a nivel de laboratorio, para la aplicación real en zonas con recursos limitados.
- Los resultados positivos del test de actividad cualitativo realizado en la aplicación real confirman, para las semillas de maíz, los resultados obtenidos previamente en el laboratorio.
- Los resultados del test microbiológico realizado en la aplicación real no son concluyentes para las concentraciones estudiadas.

6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras los ensayos experimentales permiten realizar las siguientes consideraciones:

6.1 Alubia roja

-Actividad coagulante

El extracto crudo salino muestra un porcentaje de sedimentación del 55 % pero sólo posee capacidad coagulante cuando está diluido (los mejores resultados se han obtenido cuando el extracto crudo trabaja diluido 27 veces). Dicha semilla, también admite la utilización del extracto crudo acuoso, aunque obtiene porcentajes de sedimentación (próximos al 45 %) inferiores al del extracto salino y admite hasta 9 diluciones del extracto crudo acuoso sin pérdida de actividad.

-Características del extracto crudo

El tiempo de sedimentación para los experimentos se estima en 90 minutos, ya que la velocidad de coagulación es más lenta que la que posee *Moringa oleifera*.

Los ensayos realizados sobre la estabilidad del extracto frente a la temperatura, muestran que el coagulante activo no ve afectada su capacidad coagulante por la temperatura, si ésta no se encuentra por encima de 85° C. Este hecho, permite trabajar con el extracto crudo a temperatura ambiente, sin pérdida de actividad.

-Purificación del compuesto activo

La purificación del extracto crudo empleando una columna catiónica, permite obtener fracciones activas en la región "bound", es decir, cuando se produce el lavado con el gradiente salino de NaCl 1M. Además, estas fracciones alcanzan un porcentaje de sedimentación entorno al 70 %, que es más elevado que para el extracto crudo.

-Caracterización del compuesto activo

Respecto a los geles, la electroforesis nativa desnaturalizante permite obtener 3 bandas en todas las fracciones activas. Se observa una banda ancha con un peso molecular de aproximadamente 67 kDa, y dos bandas más estrechas con un peso molecular de 43 kDa.

Por otra parte, el protocolo nativo ácido realizado para los extractos activos, permite concluir que las fracciones activas del gel se encuentran cargadas positivamente.

-Propiedades antimicrobianas

Los resultados obtenidos permiten concluir que no se observa presencia de efecto antimicrobiano del extracto para las concentraciones de proteína entre 0,1 y 10 µg/mL y los microorganismos *Escherichia coli* (cepas K-12, D-21, D-31), *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus thuringensis* (cepas 5, 7, 75) ni para concentraciones de extracto purificado superiores, en el rango de 0,2-0,6 mg/mL.

Finalmente, los resultados para la formación de flóculos celulares (“clumping”) fueron positivos para *Bacillus thuringensis* cepa 5. Sin embargo, no se observó formación de flóculos para el resto de microorganismos probados: *Escherichia coli* (cepas K-12, D-21, D-31), *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus thuringensis* (cepas 7 y 75).

6.2 Maíz dulce

-Actividad coagulante

El extracto salino crudo muestra un porcentaje de sedimentación entorno al 75 %, pero no admite dilución. Es posible emplear el extracto acuoso crudo pero la actividad del compuesto disminuye hasta el 40 % y éste extracto tampoco admite diluciones sin pérdida de actividad coagulante. También se estudió el extracto con Acetato de amonio, para el cual se obtuvieron resultados similares al extracto salino con NaCl, con porcentajes de sedimentación cercanos al 75 %, y admite hasta 3 diluciones sin pérdida de actividad.

-Características del extracto crudo

El tiempo de sedimentación considerado es el mismo que el determinado para los experimentos con *Moringa*, 60 minutos.

El componente activo, se ve afectado en gran medida por la temperatura, si esta supera los 85° C. A pesar de ello, el maíz dulce permite trabajar a temperatura ambiente sin tomar otro tipo de precauciones.

-Purificación del compuesto activo

La purificación por intercambio iónico con una columna catiónica, permite obtener todas las fracciones activas en la región “unbound”, es decir, en la región previa a la elución con un gradiente salino de NaCl. A pesar de la dilución asociada con la purificación, la actividad de las fracciones en el “unbound” no se ve afectada y los resultados son similares a los obtenidos para el extracto crudo, entorno al 70 %.

-Caracterización del compuesto activo

El gel con SDS-PAGE muestra 3 bandas con un peso molecular estimado entorno a 60, 37 y 21 kDa. El gel con protocolo nativo ácido muestra que las fracciones activas poseen carga neutra y por tanto, el componente activo del maíz dulce es distinto al encontrado para la alubia roja.

-Propiedades antimicrobianas

Respecto a los test antimicrobianos, se observa una ralentización del crecimiento bacteriano para las concentraciones más bajas de extracto (0,1-5 µg/mL) sobre los microorganismos *Escherichia coli* (cepas K-12, D-21, D-31), *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus thuringensis* (cepas 5, 7, 75). Para concentraciones de proteínas más elevadas, en el rango de 0.2 y 0.6 mg/mL sólo se ve ralentizado el crecimiento de *Escherichia coli* cepa K-12, para el resto *Escherichia coli* (cepa D-31), *Pseudomonas*, y *Bacillus thuringensis* (cepa 5) no se observa ningún efecto.

Se observa la formación de flóculos para los microorganismos *Escherichia coli* cepa D-31 y *Bacillus thuringiensis* cepa 75. No se observan flóculos para *Bacillus thuringiensis* (cepas 5 y 7), *Escherichia coli* (cepas K-12, D-21, *Pseudomonas* o *Staphylococcus*).

6.3 Maíz rojo

-Actividad coagulante

El extracto crudo salino muestra un porcentaje de sedimentación entorno al 75 %, pero no admite diluciones sin pérdida de actividad. También se ha estudiado la actividad para el extracto con acetato de amonio, obteniéndose una tasa de sedimentación similar a la obtenida para el extracto salino, entorno al 65 % pero admite 3 diluciones del extracto crudo sin pérdida excesiva de actividad.

-Características del extracto crudo

El tiempo de sedimentación para los experimentos es de 60 minutos, al igual que para *Moringa*. El coagulante activo se ve afectado por la temperatura, si esta se encuentra por encima de 85° C aunque la actividad es todavía elevada, la tasa de sedimentación es cercana al 70 %. En cualquier caso, el maíz rojo admite trabajar a temperatura ambiente sin tomar ningún tipo de precaución adicional.

-Purificación del compuesto activo

La purificación por intercambio iónico con una columna catiónica, permite obtener todas las fracciones activas en el "unbound". Sin embargo, y a pesar de la dilución asociada al proceso de purificación, la actividad de las fracciones purificadas es superior que para el extracto crudo, situándose entorno a valores del 70 %.

-Caracterización del compuesto activo

El gel SDS-PAGE no muestra bandas claras de los componentes y no es posible estimar su peso molecular. El gel obtenido tras el protocolo nativo ácido, no proporciona resultados concluyentes sobre la carga del componente activo.

En este caso particular, resulta evidente que la purificación con una columna catiónica no funciona y que se debe emplear otra columna al realizar la purificación.

-Propiedades antimicrobianas

Debido a la imposibilidad de obtener el extracto crudo purificado, no se pudieron realizar test antimicrobianos.

7. CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo de investigación permiten concluir que:

Alubia roja

- El extracto crudo actúa como un coagulante natural primario, ya que reduce la turbidez del agua en un rango de 55-65 % respecto de la turbidez inicial. Este coagulante, admite su manipulación y trabajo a temperatura ambiente, e incluso mantiene su actividad tras ser calentado durante 1 hora a 85 °C.
- Su componente activo se purifica fácilmente por cromatografía de intercambio iónico. El extracto purificado obtenido se puede añadir al agua cruda, lo que permite almacenar el agua tratada con este compuesto, por tiempos superiores a 24 horas.
- El extracto purificado obtenido no posee capacidad antimicrobiana a las concentraciones estudiadas (0.1-10 µg/mL, 0.2 mg/mL y 0,6 mg/mL).

Maíz dulce

- El extracto crudo es un buen coagulante primario natural debido a que permite reducir la turbidez del agua tratada en un rango del 70-75 %, respecto del inicial. El extracto puede ser utilizado a temperatura ambiente y el tiempo de sedimentación estimado es de 60 minutos.
- El extracto crudo posee efectos similares a la semilla de *Moringa oleifera*, ya que alcanza porcentajes de sedimentación similares o incluso superiores a ésta. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con la *Moringa*, el maíz dulce no admite diluciones sin pérdida de actividad coagulante.
- El extracto purificado posee una baja actividad antimicrobiana en el rango de concentraciones estudiadas (0.1-10 µg/mL, 0.2 mg/mL y 0,6 mg/mL).
- En los test de floculación celular, se observa la capacidad que esta semilla posee para formar agregados celulares sobre las bacterias. Esta característica particular, contribuye a proseguir con las investigaciones para su utilización en el tratamiento del agua destinada a consumo humano.

Maíz rojo

- El extracto crudo ofrece resultados prometedores debido a la elevada tasa de sedimentación observada. Sin embargo, las dificultades encontradas en su purificación hacen más interesante proseguir los estudios posteriores con las semillas de alubia roja y maíz dulce.

El presente trabajo de investigación permite concluir que:

- El estudio comparativo realizado ha permitido seleccionar entre 21 semillas analizadas, 3 semillas de cultivos comunes (leguminosas y cereales), que presentan una excelente capacidad coagulante, reduciendo la turbidez inicial del agua cruda en porcentajes comparables al coagulante natural más extendido en la actualidad, la semilla de *Moringa oleifera*.
- El protocolo desarrollado para la extracción del compuesto activo, es sencillo y puede adaptarse fácilmente a zonas de escasos recursos, permitiendo su utilización para la clarificación del agua cruda. Dicho protocolo ha sido contrastado en la aplicación real en Ecuador, ofreciendo resultados prometedores en la reducción de la turbidez y de la concentración bacteriana, en combinación con el cloro.
- Los coagulantes naturales estudiados representan una alternativa a considerar en la clarificación de aguas superficiales de turbidez elevada, para zonas de escasos recursos.
- Es necesaria la profundización en aspectos tales como la purificación del compuesto activo con métodos sencillos y de bajo coste, y el estudio de la aplicación en grandes volúmenes de agua.

8. LINEAS FUTURAS DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

En la experimentación inicial con las semillas de alubia roja, maíz dulce y maíz rojo, los resultados han sido prometedores al mostrar tanto su capacidad de actuar como coagulantes primarios en la clarificación del agua cruda como en mostrar actividad antimicrobiana. Dado que el trabajo de investigación constituye una fase preliminar en el desarrollo de la tesis doctoral, la investigación posterior irá orientada a profundizar en la utilización de dichos coagulantes naturales para la potabilización de agua en países en vías de desarrollo.

Los estudios futuros contemplarán los siguientes aspectos:

-Estudios preliminares orientados a mejorar la purificación de los extractos crudos, los test antimicrobianos de inhibición del crecimiento y de agrupamiento celular. Concretamente:

- Mejora de la purificación de todas las semillas.
- Ampliación del rango de concentración de proteína activa para el test de crecimiento celular.
- Estudio de los efectos de la ampliación del tiempo de incubación en el test de capacidad floculante.

-Estudio comparativo entre las tasas de sedimentación de los coagulantes naturales estudiados y de coagulantes sintéticos.

-Estudios de toxicidad para demostrar la inocuidad del compuesto activo en el agua destinada a consumo humano.

-Aplicación de los coagulantes naturales a escala piloto, trabajando tanto con disoluciones turbias sintéticas como con aguas superficiales naturales.

-Desarrollo e implementación de un prototipo o protocolo para la utilización de coagulantes naturales en países en vías de desarrollo.

-Estudio de la posible combinación del tratamiento de los coagulantes naturales con otras técnicas tales como filtración en lecho de arena o técnicas de membranas, como la ultrafiltración.

9. REFERENCIAS

Adinolfi M., Corsaro M.M., Lanceta R., Parrilli M., Folkard G., Grant W., Sutherland J.; *Composition of the coagulant polysaccharide fraction from Strychnos potatorum seeds*. Carbohydrate Research 263 No 1-3 (1994) 103-110

Alfrey A.C., Legendre G.R., Kaehny W.D.; *The dialysis encephalopathy syndrome, a possible aluminum intoxication*. J. Med 294 (1976) 184-188

Al-Khalili R. S., Sutherland J.P. Folkard G. K. (1997); *Filtration with a natural coagulant*. Proceedings from 23rd WEDC Conference Water and sanitation for all: partnerships and innovations. Durban (South Africa)

Almendárez de Quezada N.; *Comprobación de la efectividad del coagulante (Cochifloc) en aguas del lago de Managua "Piedras Azules"*. Revista Iberoamericana de Polímeros 5 No.1 (2004) 46-54

Al-Samawi A. A., Shokrala E.M.; *An investigation into an indigenous natural coagulant*: Journal Environ, Sci. Health, A31 No. 8 (1996) 1881-1897

Barnes D., Mampitiyarachichi T.R.; *Water Filtration Using Rice Hull Ash*. Waterlines 2 (1983) 21-23

Bertani G.; *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J. Bacteriol. 62 (1951) 293-300

Boisvert J.P., To T., Berrak A., Jolicoeur C.; *Phosphate adsorption in flocculation processes of aluminium sulphate and poly-aluminium-silicate-sulphate*. Water Res., 31 (1997) 1939-1946

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

Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G. W., Osborn R. W.; *Antimicrobial Peptides from plants*. Critical reviews in plant sciences 16 No. 3 (1997) 297-323

Broin M., Santaella C., Cuine S., Kokou K., Peltier G., Joët T.; *Flocculent activity of a recombinant protein from Moringa oleifera Lam seeds*. Applied Microbiology Biotechnology 60 (2002) 114-119

Chantrel E.; *Caracteristiques du Moringa pour le traitement des eaux*. PROPAGE. Disponible via web : <http://www.moringanews.org/documents/GeneralMoringa.doc> Fecha de consulta: Septiembre de 2004

Chantrel E.; *Les autres flocculants naturels*. PROPAGE. Disponible via web : <http://www.moringanews.org/documents/Flocculantsnaturels.doc> Fecha de consulta: Diciembre de 2005

Chaudhuri M., Babu R.; *Home water treatment by direct filtration with natural coagulant*. Journal of water and health 3 No. 1 (2005) 27-30

- Chuang P.H., Lee C.W., Chou J.Y. Murugan M., Shieh B.J. Chen H.M.; *Antifungal activity of crude extracts and essential oil of Moringa oleifera Lam.* Bioresource technology 98 No. 1 (Enero 2007) 232-236
- Christopher, H. M., Michael P.S., Doyle G. G.; *In vitro acrylamide exposure alerts growth cone morphology.* Toxicology and Applied Pharmacology 131 (1995) 119-129
- Crapper D.R., Krishnan S.S., Dalton A.J. *Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration.* Science 180 (1973) 511-513
- Crapper M.D.R., Boni D.; *Aluminum in human brains disease - an overview.* Neurotoxicol. 1 (1980) 3-16
- Davidson A.M., Walker G.S., Lewins A.M.; *Water supply aluminum concentrations, dialysis dementia, and effects of reverse osmosis water treatment.* Lancet 2 (1982) 785-787
- Dearfield K.L., Abernathy C.O., Ottley S., Brantner J.H., Hayes P.F.; *Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity.* Mutation Res. 195 (1964) 45-77
- Diaz A., Rincón N., Esorihuela A. Fernandez N. Chacin E. Forster C.F.; *A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela.* Process Biochemistry 35 (1999) 391-395
- Dong Q., Schlueter S.D., Brendel V.; *Plant GDB, plant genome database and analysis tools.* Nucl. Ac. Res., 32 (2004) 354-359
- Dorea C.C.; *Use of Moringa spp.seeds for coagulation: a review of a sustainable option.* Water Science 6 No. 1 (2006) 219-227
- Eilert U., Wolters B., Nahrstedt A.; *The antibiotic principle of seeds of Moringa oleifera and Moringa stenopetala.* Planta Medica 42 (1981) 55-61
- Fling S.P., Gregerson D.S.; *Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea.* Analytical Biochemistry 155 (May 1986) 83-88
- Folkard, G.K., Sutherland J.P.; *Water Clarification with Natural Coagulants and Dissolved Air Flotation.* Waterlines 5 (1986) 23-26
- Folkard G.K., Sutherland J.P., Grant W.D.; *Natural coagulants for small scale water treatment - potential applications.* Asian Society for Environmental Protection 6 (1990) 1-4
- Folkard G., Sutherland J.P., Al-Khalili R.; (1995) *Natural coagulants- a sustainable approach.* Proceedings from 21st WEDC conference. Kampala (Uganda)
- Ganjidoust H., Tatsumi K., Yamagishi T., Gholian R. N.; *Effect of synthetic and natural coagulant on ligning removal from pulp and paper waste water.* Water Science Technology 35 (1997) 286-291

Gardner M.J., Gunn A.M.; (1991) *Bioavailability of Al from food and drinking water*. Proc. Royal Soc. Med. Round Table Series: Alzheimer's Diseases and the Environment, London, UK

Gassenschmidt U., Jany K. D., Tauscher B., Niebergall H. *Isolation and characterization of a flocculating protein from Moringa oleifera Lam.* Biochimica et Biophysica Acta 1243 (1995) 477-481

Generalitat Valenciana; Consellería de Presidencia, Dirección General de Cooperación al Desarrollo y Relaciones Externas. *Plan Director de la Comunidad Valenciana 2004-2007*. web:http://www.pre.gva.es/cdre/cooperacion/cas/doc/2004/legislacion/PlanDirector2004_2007.pdf. Fecha de consulta: Enero de 2006

Ghebremichael K. A. (2004) *Moringa seed and pumice as alternative natural materials for drinking water treatment*. Tesis Doctoral, ISSN 1650-8602

Ghebremichael K. A., Gunaratna K.R., Henriksson H., Brumer H., Dalhammar G.; *A simple purification and activity assay of the coagulant protein from Moringa oleifera seed*. Water Research 39 (2005) 2338-2344

Ghebremichael, K. A., Gunaratna K.R., Dalhammar G. *Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from Moringa oleifera seed*. Applied Microbiol. Biotechnol 70 (2006) 526-532

González G., Chávez M., Mejías D., Mas y Rubí M., Fernández N., León de Pinto G.; *Use of exudated gum produced by Samanea saman in the potabilization of the water*, Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 29 No. 1 (2006)14-22

Hamidi A. A., M. Koffly; *The use of sago starch as coagulant aid in water and wastewater treatment*. Bulletin Institution of Engineers Perak (1998) 27-31

Hamidi A.A., Raghavan S., Koffly, M., Isa M., Abdullah M. H.; *Removal of Sulphate, Chloride, Nitrate-Nitrogen and Turbidity from Water Using Tapioca Starch*, JURUTERA 6 June (2000) 41-47

Hamman Jr, C.L., Mc Ewan J.B., Myers A.G. *Guide to selection of water treatment processes*, capítulo 3 de Water Quality and Treatment-A Handbook of Community Water Supplies (AWWA) McGraw-Hill, New York, 1990

Hultmark D., Engström Å., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H.G., *Insect immunity: Attacins, a family of antibacterial proteins from Hyalophora cecropia*. EMBO J., 2 no 4 (1983) 571-576

Jahn S.A.A, Dirar H.; *Studies on natural water coagulants in the Sudan with special reference to Moringa oleifera seeds*. Water S.A. 5 No. 2 (1979)

Jahn S.A.A.; (1981). *Traditional Water Purification In Tropical Developing Countries: Existing Methods and Potentials*. German Agency for technical cooperation (GTZ). Eschborn, Germany,

Jahn S.A.A.; *Traditional Water Clarification Methods Using Scientific Observation to Maximize Efficiency*. Waterlines 2 (1984) 27-28

Jahn S.A.A.; (1986) *Proper use of African natural coagulants for rural water supplies-research in the Sudan and a guide for new projects*. German Agency for technical cooperation (GTZ) Publ. No. 191, 71-166, Eschborn, Germany,.

Jahn S.A.A.; *Using Moringa seeds as coagulants in developing countries*. Journal of American Water Works Association 80 (1988) 43-50

Jekel M.R.; (1991) *Aluminum in water: How it can be removed? Use of aluminum salts in treatment*. Proceedings of the Int. Water Supply Ass., Copenhagen (Denmark)

Kaggwa R.C., Mulalelo C.I., Denny P., Okurut T.O. *The impact of alum discharges on a natural tropical wetland in Uganda*, Water Res., 35 No 3 (2001) 795-807

Karlsson E., Ryden L., Brewer J., *Ion exchange chromatography*, en: Protein Purification: principals, high resolution methods and applications: Bloque II, Capítulo 4, J-C Janson and L. Ryden Editors.

Katayon S., Megat Mohd Noor M.J., Asma M., Abdul Ghani L.A., Thamer A.M., Azni I., Ahmad J., Khor B.C., Suleyman A.M.; *Effects of storage conditions of Moringa oleifera seeds on its performance in coagulation*. Bioresource Technology 97 (2006) 1455-1460

Kawuamura S.; *Effectiveness of natural polyelectrolytes in water treatment*. Journal of American Water Works Association October (1991) 88-91

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

Lee S. H., Lee S. O., Jang K. L. Lee T.H.; *Microbial flocculant from Arcuadendron SP-49*. Biotechnol. Lett. (1995) 17, 95-100.

Leiva L., Jorge N., Cáceres S., Páez H., Gómez M.; *Empleo del gel de almidón de productos regionales como coadyuvante en el tratamiento de aguas*. Información Tecnológica 8 No. 2 (1997) 169-175

Leiva L., Jorge N., Gómez Vara M. E.; *Uso del gel del almidón de arroz como coadyuvante de floculación en la potabilización de aguas naturales*. Información tecnológica 9 No. 3 (1998) 371-377

Levicki K.; (2005). *A catchment to consumer approach to rural water resource assessment. Baseline study and safe drinking supply strategy for Orongo village, Lake Victoria Basin, Kenya*. MSc Thesis. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

Liew A.G., Noor M.J.M.M., Ng Y. M.; *Turbid Water Clarification using extraction of Cowpea seeds*. KKU Engineering Journal 31 No. 2 (2004) 73-82

Lilliehöök H.; (2005). *Use of sand filtration on river water flocculated with Moringa Oleifera*. MSc Thesis. Luleå University of Technology, Luleå, Sweden ISSN: 1402-1617

Lund E., Jahn S.A.A. (1980). *Water Purification with Primitive Flocculation Methods as Done in Sudanese Villages*. 2nd International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of African and Middle East Countries.

Luria S.E., Adams J.N., Ting R.C.; *Transduction of lactose-utilizing ability among strain of E. coli and S. dysenteriae and the properties of the transducing phage particles*. *Virology* 12 (1960) 348-390

Mallevalle J., Bruchet A., Fiessinger F.; *How safe are organic polymers in water treatment*. *Journal of American Water Works Association* 76 (1984) 431-436

Mandloi M., Chaudhari S., Folkard G K.; *Evaluation of natural coagulants for direct filtration*. *Environmental Technology* 25 No. 4 April (2004) 481-489

Martyn C.N., Barker D.J.P., Osmond C., Harris E.C., Edwardson, J.A., Lacey, R.F.; *Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water*. *Lancet* 1 (1989) 59-62

Mccollister D., Oyen E., Rowe V.K.; *Toxicology of Acrylamide*. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 6 (1964) 172-181

McGuigan K.G., Joyce T.M., Conroy R.M., Gillespie J.B., Elmore-Meegan M.; *Solar disinfection of drinking water contained transparent plastic bottles: Characterizing the bacterial inactivation process*. *Journal of Applied Microbiology* 84 No. 6 (1998) 1138-1148

Meysami B., Kasaeian A.B.; *Use of coagulants in treatment of olive oil wastewater model solutions by induced air flotation*. *Bioresource Technology* 96 (2005) 303-307

Miller R.G., Kopfler F.C., Kely K.C., Stober J.A., Ulmer N.S.; *The occurrence of aluminium in drinking water*. *JAWWA* 76 (1984) 84-91

Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación Española. (2005). *Plan Director de la Cooperación Española 2005-2008*. Disponible via: <http://www.mae.es/es/MenuPpal/Cooperacion+Internacional/Publicaciones/> Fecha de consulta: febrero 2006, fecha de actualización sitio web: 8 Febrero 2006

Mintz E., Bartram J., Lochery P., Wegelin M.; *Not just a drop in the bucket: expanding access to point-of-use water treatment systems*. *American Journal of Public Health* 91 No. 10 (2001) 1565-1570

Mishra A., Bajpai M.; *The flocculation performance of Tamarindus mucilage in relation to removal of vat and direct dies*. *Bioresource Technology* 97 (2006) 1055-1059

Muyibi S.A., Okuofu, C.A.; *Coagulation of low turbidity surface water with Moringa oleifera seeds*. *Int. J. Environ. Stud.* 48 (1995a) 263-273

Muyibi S.A., Evison L.M.; *Optimizing physical parameters affecting coagulation of turbid water with Moringa oleifera seeds*. *Water Research* 29 No. 12 (1995b) 2689-2695

Muyibi S.A., Evison, L.M.; *Coagulation of turbid water and softening of hardwater with Moringa oleifera seeds*. Int. J. Environ. Stud. 49 (1996) 247-259

Naciones Unidas (1992) *Programa 21*. Conferencia de las Naciones Unidas sobre el medio ambiente y desarrollo: Cumbre de la tierra.

Naciones Unidas. (2000). Resolución de la Asamblea General de las Naciones Unidas. A/55/L.2. *Declaración del Milenio*. Disponible via: <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/ares552.html> fecha de consulta: Enero de 2005, fecha de actualización web: 2005

Naciones Unidas. (2003). *Informe sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo*. Disponible via web: www.unesco.org/water/wwap/wwdr/index_es.shtml fecha de consulta: Julio 2005, fecha de actualización sitio web: Marzo 2003

Naciones Unidas. (2005). Resolución de la Asamblea General de las Naciones Unidas. A/60/158. *Medidas adoptadas para organizar las actividades del Decenio Internacional para la Acción, "El agua, fuente de vida", 2005-2015*. Disponible via: <http://daccessdds.un.org/doc/UNDOC/GEN/N05/438/09/PDF/N0543809.pdf> fecha de consulta: 25 julio de 2005, fecha de actualización web: Julio, 2005

Najm I., Tate C., Selby D.; *Optimizing enhanced coagulation with PAC. A case study*. Journal of AWWA 90 No. 10 (1998) 88-95

Narasiah K.S., Vogel A., Kramadhati N.N. *Coagulation of turbid waters using Moringa oleifera seeds from two distinct sources*. Water Science and technology: water supply 2 No. 5-6 (2002) 83-88.

Ndabigengesere A., Narasiah K.S., Talbot B.G.; *Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using Moringa oleifera*. Water Research 29 No. 2 February (1995) 703-710

Ndabigengesere A., Narasiah K. S. *Influence of operating parameters on turbidity removal by coagulation with Moringa oleifera seeds*. Environ. Tech 17 (1996) 1103-1112

Ndabigengesere A., Narasiah K.; *Quality of water treated by coagulation using Moringa oleifera seeds*. Water Research. 32 No. 3 (1998) 781-791

Nkhata D.; (2001) *Moringa as an alternative to aluminium sulphate. An article from people and systems for water, sanitation and health*. Proceedings from 27th WEDC Conference. Lusaka, (Zambia)

Olsen A.; *Low technology water purification by bentone clay and Moringa oleifera seed flocculation as performed in Sudanese villages: effects on Schistosoma mansoni, Cercariae*. Water Research. 21, No. 5 (1987) 517-522

Okuda T., Baes A. U., Nishijima W. Okada M.; *Improvement of extraction method of coagulation active components from Moringa oleifera seed*. Water Research Vol 33 No 15 (1999) 3373-3378

- Okuda T., Baes A. U., Nishijima W., Okada M.; *Isolation and characterization of coagulant extracted from Moringa oleifera seed by salt solution*. Water Research 35 No. 2 (2001a) 405-410
- Okuda T., Baes A. U., Nishijima W., Okada M.; *Coagulation mechanism of Salt solution: extracted active component in Moringa oleifera seed*. Water Research 35 No. 3 (2001b) 830-834
- Optima Environment S.A. (2000). *Process for preparing coagulants for water treatment*. S. A. WO 00/46243
- Optima Environment S.A. (2003 a). *Flocculating agents*. WO 03/008343 A1
- Optima Environment S.A. (2003 b). *Moringa Seed Proteins*. WO 03/008441 A2
- Özacar M., Sengil I. A.; *Effectiveness of tannins obtained from Valonia as a coagulant aid for dewatering of sludge*. Wat. Res. 34 No 4 (2000) 1407-1412
- Özacar M., Sengil I. A.; *The use of tanins from Turkish acorns (Valonia) in water treatment as a coagulant and coagulant aid*. Turkish J. Eng. Env. Sci. 26 (2002) 255-263
- Özacar M., Sengil I. A. *Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng. Aspects 229 (2003) 85-96
- Pollard S.J.T., Thompson F.E, McConnachie G.L.; *Microporous carbons from Moringa oleifera husks for water purification in less developed countries*. Water Research 29 No. 1 January (1995) 337-347
- Programa de Naciones Unidas (PNUD). (2006). *Informe de Desarrollo Humano: "Más allá de la escasez: Poder, pobreza y la crisis mundial del agua"*. Disponible via web: <http://hdr.undp.org/hdr2006/pdfs/report/HDR06-complete.pdf> fecha de consulta: 9 de noviembre de 2006, fecha de actualización web: 2006
- Ravindranath, B. (1989). *Principles and Practice of Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 403-404 y p.461-473.
- Raghuwanshi P.K., Mandloi M., Sharma A. J. Malviya H. S. Chaudhari S.; *Improving filtrate quality using agrobased materials as Coagulant Aid*. Water Quality Research Journal of Canada 37 No.4 (2002) 745-756
- Rodríguez Muñoz A., García Roque O., Muñoz Martínez R; *Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de Moringa oleifera Lam, tropicalizada en Cuba*.
- Rodríguez Muñoz A., García Roque O., Muñoz Martínez R.; *Una solución factible para la clarificación de aguas para consumo humano*. Agua Noticias técnicas del laboratorio. 1 (2002) 21-22
- Roe S. *Separation based on structure*, En: Protein Purification Methods: a practical approach, capítulo 4, E.L.V. Harris and S. Angal (Editors) IRL press de Oxford university press

Schecher W.D., Driscoll C.T.; *An evaluation of equilibrium calculations within acidification models: The effect of uncertainty in measured chemical components*. *Water Resour. Res.* 24 (1988) 533-542

Schulz C.R., Okun D.A.; *Treating surface waters for communities in developing countries*. *JAWWA* 75 (1983) 212-223

Sharma P., Kumari P., Srivastava M.M.; Srivasatava S.; *Removal of cadmium from aqueous system by shelled Moringa oleifera Lam. seed powder*. *Bioresource technology* 97 (2006) 299-305

Shpigun O.A., Zolotov Y.A.; (1988). *Ion Chromatography in Water Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, p 18.

Stoscheck C.M.; *Quantitation of Protein*. *Methods in Enzymology* 182 (1990) 50-69

Suárez M., Entenza. J.M., Doeeries C., Meyer E., Bourquin L., Sutherland J., Marison I., Mermod N.; *Expresion of a plant-derived peptide harboring water cleaning and antimicrobial activities*. *Biotechnology and Bioengineering* 81 No.1 (2003) 13-20

Sutherland J.P., Folkard G. K. Mtawali M. A. Grant W. D. (1994) *Moringa oleifera as a natural coagulant*. *Proceedings of the 20th WEDC Conference: Affordable Water Supply and Sanitation*. Colombo (Sri Lanka)

Tripathi P.N., Chaudhuri M., Bokil S.D. *Nirmali seed-a naturally occurring coagulant*. *Indian J. Environ. Health* 18 (1976) 272-280

UNICEF. 2005. *Informe del Estado Mundial de la Infancia 2005*. Disponible via web: http://www.unicef.org/spanish/publications/index_24432.html fecha de consulta: Julio 2005, fecha de actualización sitio web: Enero 2005

Van Benchosten., Edzwarld;; *Chemical aspects using aluminium salts. Hydrolytic reactions of alum and polyaluminium chloride*. *Water Res* 24 (1990) 1519-1526

Vasudevan D., Gopalakrishna K.; (2002). *Coagulation using ecofriendly natural coagulants*. *Proceedings of the 26 th WEDC Conference: Sustainable Environmental Sanitation and Water Services*. Calcutta (India)

Voet, D., Voet. J., Pratt, C.; (1999). *Fundamentals of Biochemistry Upgrade ed.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 99-101.

Zhang J, Zhang F., Luo Y., Yang H. *A preliminary study on Cactus as coagulant in water treatment*. *Process Biochemistry* 41 (2006) 730-733

Páginas web

Boletín del Comité Sectorial de Agua y Saneamiento en Perú. Página web:

<http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/revistas/agua4/agua4.html>.

Fecha de consulta: Junio 2005, fecha de actualización del sitio web: 10/19/2000

de Vries, M. 2000. Determination of Lead by Chelation Ion Chromatography. Página web: <http://www.chem.ucsb.edu/~devries/chem150/hplc.htm>. Fecha de consulta: Octubre 2004.

Autor desconocido. Ion Exchange Chromatography. Página web: http://www.chromatography.co.uk/techniqs/Bio/bio_003.htm. Fecha de consulta: Octubre 2004.

Autor desconocido. Ion Chromatography. Página web: <http://ameridia.com/html/ic.html>. Fecha de consulta: Octubre 2004

Autor desconocido. Página web: <http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2001/caphane/proteins.html#denaturation>. Fecha de consulta: Febrero 2005

Food Science. Protein Denaturation. Página web: <http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/lectures/Denat.htm>. Fecha de consulta: Septiembre de 2006

Friedli Enterprises. Página web: <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/proteins.html#denaturation>. Fecha de consulta: Mayo de 2006

John Sutherland Página web: <http://www.le.ac.uk/engineering/staff/Sutherland/moringa/pictures/pilot/pilot.htm>. Fecha de consulta: Noviembre de 2006

Organización Mundial de la salud. Página web: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/wsh0207/en/index7.html. Fecha de consulta: Septiembre de 2006

Simple Methods for the Treatment of Drinking Water. Página web: <http://ces.iisc.ernet.in/energy/water/paper/drinkingwater/simplemethods/technology.html>, Fecha de consulta: Noviembre de 2005

UNICEF. Página web: http://www.unicef.org/spanish/wes/index_23777.html. Fecha de consulta: Marzo de 2005

Water aid-water charity. Página web: www.wateraid.org. Fecha de consulta: Enero de 2005

Wikipedia. Water purification. Página web: http://en.wikipedia.org/wiki/Water_purification. Fecha de consulta: Septiembre de 2006

ANEJO I. NOTACIÓN

AcH:	ácido acético
Alb.:	alubia
APS:	del término en inglés (Amonium Persulphate); persulfato amónico
bound:	unido (hace referencia a la fracción que queda adsorbida a la superficie de la matriz en la columna de intercambio iónico)
BSA:	del término en inglés (Bovine Serum Albumine); proteína seroalbúmina bovina
°C:	grados centígrados (celsius)
CFG:	cromatografía de filtración en gel
CIE:	cromatografía de intercambio iónico
cm:	centímetro
Cong.:	congelado
clumping test:	test de agrupación o floculación celular
Da:	dalton
dil.:	diluidos
distaining:	solución de revelado
DSS:	dodecil sulfato sódico
EAP:	extracto acuoso purificado
ECA:	extracto crudo acuoso
ECMO:	extracto crudo de <i>Moringa oleifera</i>
ECS:	extracto crudo salino
ECT:	extracto crudo en disolución tamponada de acetato de amonio
EPMO:	extracto salino purificado de <i>Moringa oleifera</i>
EP:	extracto purificado
ETP:	extracto purificado en disolución amortiguadora
Gbzo.:	garbanzo
IDH:	Índice de desarrollo humano definido por el Programa de Naciones Unidas en el informe de desarrollo humano de 2006
KOH:	hidróxido potásico
LB:	medio de cultivo Luria-Bertani
mA:	miliamperios
mL:	mililitro
mM:	mili molar
M:	molar
NaCl:	cloruro sódico
nm.:	nanómetro
OI:	Ósmosis Inversa
PAGE:	poliacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en geles de poliacrilamida)
PET:	Poli-etilen-tereftalato
P. morada:	fruta de la pasión morada

PNUD:	Programa de Naciones Unidas
p/v:	peso/volumen
refrig.:	refrigerado
rpm:	revoluciones por minuto
Running buffer:	tampón para electroforesis, transportador o de migración
Separation gel:	gel de separación en la electroforesis en geles de poliacrilamida
SDS:	del término en inglés Sodium-dodecil-sulfate (dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE:	Sodium-dodecil-sulfate poliacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis de proteínas en geles de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida)
Stacking gel:	gel de apilamiento o compresor en la electroforesis en geles de poliacrilamida
TEMED:	N, N, N, N'-tetrametilendiamina
Staining:	solución de tinción o fijación
Stock solution:	solución de almacenamiento
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl:	Tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorhídrico
UFC:	unidades formadoras de colonias
µg:	microgramo
µL:	microlitro
Unbound:	libre (hace referencia a la fracción que no queda unida a la superficie de la matriz en la columna de intercambio iónico)
UNT:	Unidades Nefelométricas de Turbidez
µS:	microsiemens
UV:	ultravioleta visible
V:	voltios