

CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE COAGULANTE ACTIVO DE LAS SEMILLAS DE *Moringa oleifera* MEDIANTE HPLC

Jubisay Campos, Gilberto Colina*, Nola Fernández,
Gabriel Torres, Betzabe Sulbarán y Graciela Ojeda

Departamento de Ingeniería Sanitaria (DISA), Universidad del Zulia.
E-mail: gjcolina@luz.ve

Resumen. *Moringa oleifera* es una planta tropical cuyas semillas contienen un agente que exhibe excelentes propiedades coagulantes en el tratamiento de las aguas. Los estudios preliminares sugieren que dicha sustancia puede estar compuesta por una o varias proteínas, con características catiónicas, solubles en agua. Se caracterizó el agente activo de las semillas de *M. oleifera*, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), aplicando el método comercial Pico Tag. El Perfil de aminoácidos obtenido reveló la presencia de 17 aa: Asp, Glu, Ser, Gli, His, Arg, Tre, Ala, Pro, Tir, Val, Met, Cis, Ile, Leu, Fen y Lis, representando un total de 6,92% p/p; el ácido glutámico es el componente mayoritario (1,680% p/p). A los aminoácidos polares con carga negativa, Asp y Glu, corresponde el 2,01% p/p mientras que a los aminoácidos polares con carga positiva, His, Arg y Lis, corresponde el 1,14% p/p. La presencia de Lis, 0,26% p/p, no se ha reportado en otras investigaciones. La naturaleza hidrofílica de los aminoácidos Asp, Glu, His, Arg y Lis, presentes en las semillas de *M. oleifera* probablemente permite, mediante los mecanismos de adsorción y puente químico, que éstos puedan interactuar con las partículas coloidales responsables de la turbiedad de las aguas, contribuyendo así a su remoción.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, Moringaceae, coagulación, coagulante orgánico, HPLC, perfil de aminoácidos, tratamiento de aguas.

*Autor para la correspondencia.

Recibido: 04 Noviembre 2002 / Aceptado: 26 Mayo 2003
Received: 04 November 2002 / Accepted: 26 May 2003

CHARACTERIZATION OF THE ACTIVE COAGULANT AGENT IN *Moringa oleifera* SEEDS THROUGH HPLC

Abstract. *Moringa oleifera* is a tropical plant the seeds of which contain a water soluble substance that has excellent coagulation properties for water treatment. Preliminary studies on the active ingredients of *Moringa oleifera* as a coagulant have suggested that the active components are one or several water soluble cationic peptides. The active agent of the seeds of *M. oleifera* was characterized by HPLC, using the commercial method called Pico-Tag. The amino-acid profile of the seeds of *M. oleifera* revealed the presence of 17 aa: Asp, Glu, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu, Phe y Lys, which represent 6.92%p/p, having Glu, the highest percentage (1.680%). Polar amino-acids with negative charge, Asp and Glu, was 2.1%, while for the polar amino-acids with positive charges, His, Arg and Lys, were 1.1%. The presence of Lys, 0.26% p/p, was not reported in other researches. The hydrophilic nature of Asp, Glu, His, Arg and Lys, present in the *M. oleifera* seeds, probably allows them to interact with the colloidal particles responsible for water turbidity through the Adsorption and Bridging mechanisms, contributing to their removal in this way.

Key words: Amino acid profile, coagulation, HPLC, *Moringa oleifera*, Moringaceae, organic coagulant, water treatment.

INTRODUCCIÓN

Los agentes coagulantes son usados convencionalmente en la potabilización de las aguas crudas para el consumo humano. El sulfato de aluminio o alumbre es el agente coagulante más ampliamente usado en las plantas de tratamiento debido a su probada efectividad y bajo costo. Sin embargo, algunos estudios han reportado que el Aluminio podría inducir enfermedades neurológicas, tales como el mal de Alzheimer, síndromes de demencia y disminución de la capacidad motora y mental (Okuda *et al.* 2001, Ndabigengesere y Narasiah 1998). Recientemente se ha estudiado la factibilidad de sustituir el uso del alumbre por compuestos orgánicos naturales de origen vegetal y animal. En varios países de África y Latinoamérica se han utilizado algunas plantas para mejorar la calidad del agua, destacando las

semillas de melocotón y habas usadas en Bolivia y las de *Moringa oleifera* comúnmente en Guatemala, El Sudán y Malawi. Sin embargo, entre todas las especies investigadas, las semillas de *Moringa oleifera* han demostrado una mayor efectividad como coagulante primario para el tratamiento de agua (Sutherland 2001).

Moringa oleifera (Moringaceae) es una planta tropical, cuyas semillas contienen un agente activo que permite su uso como coagulante alternativo en el tratamiento de las aguas. Los estudios preliminares sobre el ingrediente activo de *M. oleifera* sugieren que está constituido por péptidos catiónicos con un peso molecular entre 6 y 16 KDa (Gassenschmidt *et al.* 1995; Ndabigengesere *et al.* 1995).

El objetivo de esta investigación es caracterizar el agente coagulante activo de la semillas de *M. oleifera*, mediante la identificación y cuantificación de los aminoácidos constituyentes por HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DEL POLVO CRUDO

Se colectaron las vainas secas de árboles de *M. oleifera* ubicados en el cementerio Corazón de Jesús de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Se extrajeron las semillas y se pulverizaron mediante un molino; luego se tamizó para obtener un polvo más fino, el cual se envasó y colocó en el desecador para su posterior utilización.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA HIDRÓLISIS ÁCIDA

El polvo crudo (5 g) de *M. oleifera* se trató con éter de petróleo (100 mL) y se agitó (30 min.). El residuo se separó por filtración, se secó al horno (60°C, 2h) y se conservó en un desecador para su posterior utilización.

3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) mediante la aplicación de un método co-

mercial (Manual Pico-Tag 1995). Este método involucra tres etapas: hidrólisis ácida, resecado-derivatización y análisis cromatográfico de la muestra.

El proceso de hidrólisis ácida se llevó a cabo tratando el polvo crudo de las semillas de *M. oleifera* con HCl 6N al 1% de fenol durante un periodo de 24 h. Posteriormente el hidrolizado se secó al vacío para eliminar cualquier tipo de impurezas, se agregó una solución resecante preparada con etanol, agua y trietilamina (TEA) (2:2:1) y nuevamente se secó al vacío. Cada muestra resecada se trató con una solución derivatizante preparada mezclando etanol, TEA, agua y fenilisotiocianato (PITC) en una proporción de 7:1:1:1. Finalmente se agregó una solución diluyente preparada con Na_2HPO_4 , agua y acetonitrilo y se inyectaron 25 μL de muestra al cromatógrafo.

El análisis cromatográfico se realizó en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución, marca Waters, equipado con una bomba cuaternaria modelo 600E, un detector de arreglo de fotiodo (PDA) modelo 996, un inyector automático modelo 717, y una columna de fase reversa (C-18) para análisis de aminoácidos Waters Pico-Tag modelo 88131 de 3,9 mm \times 150 mm. Los datos fueron procesados en un computador NEC POWER MATE 433 con el software Millennium 2032.

La separación de los aminoácidos (aa) se logró mediante elución por gradiente, a 38°C, usando como fase móvil la combinación de los eluentes A: acetato de sodio trihidratado (19 g), agua (1 L), TEA (0,5 mL) y B: acetonitrilo (600 mL) y agua (400 mL). El tiempo total de análisis y equilibrio del sistema fue de 20 minutos.

El proceso de resecado-derivatización también se aplicó a una solución estándar sigma AA-S-18, la cual contenía los aminoácidos investigados a la misma concentración (2,5 $\mu\text{mol/mL}$), a excepción de cisteína (2,5 $\mu\text{mol/mL}$). Para cada uno de estos aa se preparó una curva de calibración, inyectando por duplicado alícuotas de 15 μL , 20 μL y 25 μL .

Se aplicó el método de estándar externo, mediante comparación de los tiempos de retención y de las áreas de los picos entre la muestra y la solución estándar de aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil de aminoácidos de las semillas de *M. oleifera* (Fig. 1), permitió identificar 17 aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), glicina (Gli), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Tre), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tir), valina (Val), metionina (Met), cistina (Cis), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Fen) y lisina (Lis). Gas-senschmidt *et al.* (1995) reportaron la presencia de estos aminoácidos en la fracción activa de *M. oleifera*, a excepción de la lisina. Este último aminoácido podría participar en la desestabilización de las partículas coloidales, responsables de la turbidez del agua, y de su subsiguiente coagulación.

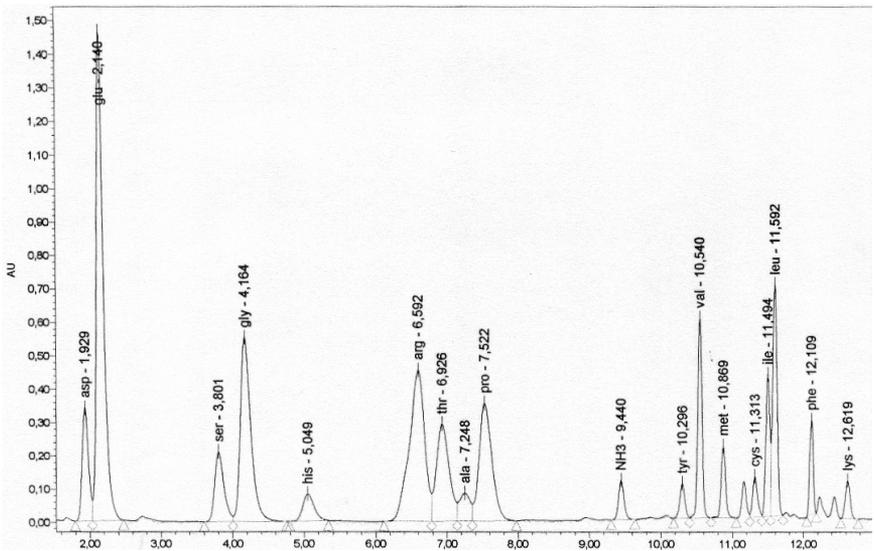


FIGURA 1. Perfil de aa constituyentes del agente activo de las semillas de *M. oleifera*.

La presencia de aminoácidos polares hidrofílicos en la muestra, tales como Glu, Asp, Arg, His y Lis, sugiere que el agente coagulante activo de las semillas de *M. oleifera* podría estar constituido principalmente por una o varias proteínas o cadenas polipeptídicas solubles en agua, tal como ha sido reportado por otros investigadores (Sawar y Botting 1993, Ndabigengesere *et al.* 1995, Gassenschmidt *et al.* 1995).

El contenido total de aminoácidos en las semillas de *M. oleifera* representa el 6,92% p/p. El mayor porcentaje corresponde al ácido glutámico (1,680%), seguido de arginina (0,687%) mientras que el menor porcentaje corresponde a la tirosina (0,105%) (Fig. 2).

La proporción (% p/p) de aminoácidos, varía en orden decreciente, de la siguiente forma: Glu > Arg > Pro > Thr > Gly > Leu > Ala > Asp > Val > Phe > Lys > Ile > Ser > His > Cys > Tyr (Fig. 2), como lo reportó Gassenschmidt *et al.* (1995).

Los resultados obtenidos indican que ocho de los 17 aa caracterizados en el agente activo de las semillas de *M. oleifera* son no polares: Gli, Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Fen (Fig. 2); estos aminoáci-

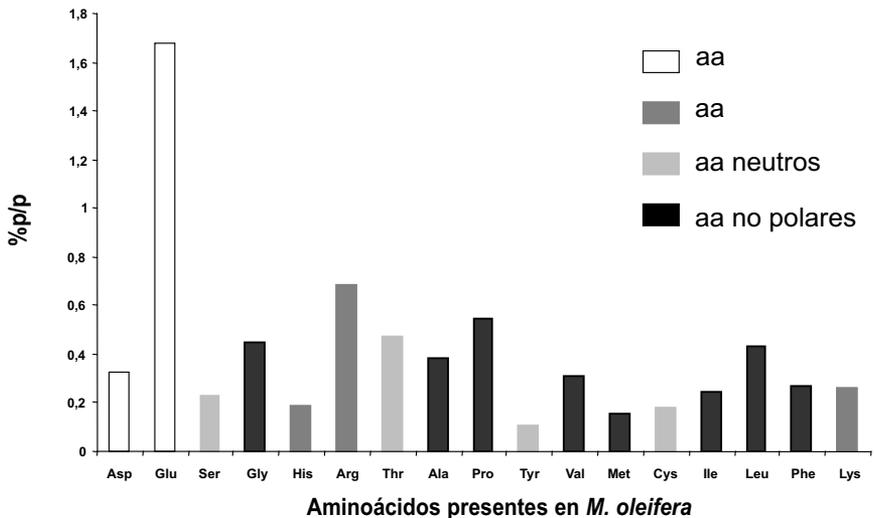


FIGURA 2. Clasificación y % p/p de los aminoácidos constituyentes de la proteína activa de *M. oleifera*.

dos son hidrófobos, es decir, que no tienden a asociarse con el agua, y como grupo representan un porcentaje másico de 2,779% p/p. Los nueve restantes aa incluyen grupos radicales polares (Lehninger 1978), Ser, Tre, Tir, Cis, His, Arg, Lis, Asp y Glu, y les corresponde un 4,135% p/p; estos aminoácidos son hidrófilos, es decir, tienen tendencia a asociarse con el agua, en menor o mayor grado, la cual depende de la carga del grupo radical de cada aminoácido. Dentro de este grupo, los aa polares sin carga, Ser, Tre, Tir y Cis (Fig. 2) son débilmente polares y representan un 0,99% del peso total de la muestra. Los aa polares con carga neta positiva, His, Arg y Lis (Fig. 2), son fuertemente polares por lo que normalmente suelen hallarse en las superficies exteriores de las proteínas donde pueden hidratarse por el entorno acuoso que les rodea (Mathews y Van Holde 1999), y como grupo, su porcentaje másico representa el 1,136% p/p; y por último, los aa polares con carga neta negativa (Lehninger 1978), donde se agrupan el Asp y Glu (Fig. 2) representa un porcentaje másico de 2,009% p/p. Al igual que los aa con carga positiva, estos también son claramente hidrófilos, por lo tanto, tienden a encontrarse en la superficie de las moléculas de proteínas, en contacto con el agua que las rodea (Mathews y Van Holde 1999).

La presencia de los aminoácidos aniónicos, Glu y Asp, y de los aminoácidos catiónicos, His, Arg y Lis, nos permite inferir que la proteína activa de las semillas de *M. oleifera* es un polielectrolito que podría tener en su superficie aminoácidos polares con carga positiva y negativa, los cuales estarían disponibles para interactuar con las partículas coloidales responsables de la turbiedad en el agua, y de esta forma contribuir al proceso de coagulación-floculación de las mismas. Los grupos radicales del Asp, Glu, His, Arg y Lis probablemente reaccionan químicamente con las partículas coloidales responsables de la turbiedad y el color, formando así un puente químico entre las partículas que permite el incremento del tamaño de éstas y promueve su eventual precipitación. Los sitios de la proteína activa de las semillas de *Moringa oleifera* cargados positivamente se plegarán o serán adsorbidos a un número determinado de partículas coloidales en uno o más sitios de las mismas; este plegamiento será pro-

ducto de las fuerzas coulombinas de atracción debido a que las cargas de las moléculas involucradas son opuestas. De la misma forma aquellos sitios de la proteína activa cargados negativamente también se plegarán a las partículas coloidales debido a un intercambio iónico, a la formación de puentes de hidrógeno o a las fuerzas de Van der Waals (Benefield y Judkins 1975).

CONCLUSIÓN

Las semillas de *Moringa oleifera* contienen cantidades importantes de aminoácidos polares, con carga neta positiva y negativa, que podrían interactuar con las partículas coloidales responsables de la turbidez y el color, durante el proceso de clarificación de las aguas, contribuyendo a la eliminación de las mismas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento de este proyecto, al Departamento de Ingeniería Sanitaria (DISA) de la Facultad de Ingeniería de LUZ, al Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de LUZ, y a la Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UDICTA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEFIELD L. D. y J. F. JUDKINS. 1975. Process Chemistry for Water and Wastewater Treatment. Chapter 7: Coagulation in Water Treatment. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, US. pp 210-238.
- GASSENSCHMIDT U., K. JANY, B. TAUSHER y H. NIEBERGALL. 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. Biochimica et Biophysica Acta. 1243: 477-481.
- LEHNINGER A. L. 1978. Bioquímica. 2ª edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. Pgs. 73-94.

- MANUAL PICO-TAG . 1995. Capítulo 3. Water's Corporation. Pág. 1-48.
- MATHEWS C. K. y K.E. VAN HOLDE. 1999. Bioquímica. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill Iberoamericana. Madrid, España. Pgs. 142-164.
- NDABIGENGESERE A. y S. NARASIAH. 1998. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Wat. Res.* 32(3): 781-791.
- NDABIGENGESERE A., K. SUBBA y B. TALBOT. 1995. Active agents and mechanism of coagulation of turbid water using *Moringa oleifera*. *Wat. Res.* 29: 703-710.
- OKUDA T., A. U. BAES, W. NISHIJIMA y M. OKADA. 2001. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt slution. *Wat. Res.* 35(2): 405-410.
- SAWAR G. y H.G. BOTTING. 1993. Review: Evaluation of Liquid Chromatographic Analysis of Nutritionally Important Aminoacid in Food and Physiological Samples. *Journal of Chromatography.* 615: 1-22.
- SUTHERLAND J. 2001. www.MoringaoleiferaLam.com. University of Leicester, Department of Engineering, UK.