

## Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott)

L. Urribarrí C., A. Ferrer O<sup>1</sup>. y A. Colina

Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Maracaibo, Venezuela.

### Resumen

Este estudio tiene como principal objetivo establecer las condiciones de extracción y precipitación de las proteínas solubles de las hojas del pasto elefante enano, para obtener un concentrado proteico adecuado para la alimentación de animales de estómago simple. Se utilizó como agente extractante una solución alcalina, a dos relaciones sólido - líquido (1:10 y 1:15), diferentes condiciones de pH (entre 10 y 12,60), temperatura (entre 30 y 90°C) y tiempo (entre 5 y 30 min), aplicadas a 5 g (b.s) de pasto. La proteína verdadera extraída se determinó por el método de Lowry. Las condiciones de precipitación se evaluaron a pH 4 y 4,5 y temperaturas de 50, 65 y 80°C. La cantidad de proteína extraída no se afectó ( $P>.05$ ) al aumentar el tiempo de extracción, disminuyó al aumentar la temperatura ( $P<.05$ ) y aumentó al incrementarse el pH ( $P<.05$ ). El mayor rendimiento de extracción, 11,7%, se obtuvo a pH 12,6, 30°C y relación sólido - líquido de 1:15 por 5 min. El máximo rendimiento de precipitación, 62,51%, se obtuvo a 50°C y pH 4. El concentrado tuvo un contenido proteico de 27,93% y la proteína resultó limitante en fenil alanina y metionina para cerdos y aves.

**Palabras clave:** pasto elefante enano, proteínas, extracción, precipitación.

### Introducción

La cría de animales de estómago simple se ha visto limitada en los últimos años, pues la alimentación de éstos depende casi exclusivamente de alimentos concentrados importados, lo que involucra un gasto por este concepto de alrededor de 1400 millones

de bolívares anuales (22). El componente proteico mayormente utilizado en los alimentos balanceados es la harina de soya que cuenta con un contenido proteico de alrededor del 46-48% y un adecuado perfil de aminoácidos (4). Las proteínas de las

---

Recibido el 26-9-2003 ● Aceptado el 13-1-2004

<sup>1</sup>Autor de correspondencia email: aferrer1@cantv.net

hojas pueden ser una fuente sustitutiva en los países tropicales, donde la vegetación crece vigorosamente todo el año. Se han reportado proteínas foliares (alfalfa) con un perfil de aminoácidos adecuado para animales de estómago simple, superior al de la proteína del maíz y con mayor contenido de lisina que la proteína de soya (20). Venezuela, posee una gran reserva de origen vegetal, por demás renovable, cuyo contenido de proteína foliar es relativamente alto. Uno de los materiales lignocelulósicos más abundantes en la Región Zuliana (24), es el pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott), que presenta bondades como un contenido de proteína foliar que oscila entre 10 y 15 % dependiendo de la edad del mismo (5), hábitat perenne, alta productividad y su valor nutritivo es generalmente más alto que otros pastos que crecen en zonas tropicales, debido a la estructura baja en fibra de la hoja (13).

La proteína foliar consiste de enzimas y algunas proteínas estructurales, constituyendo entre 70 y 80% del nitrógeno total (23, 28). La proteína citoplásmica, libre de clorofila, es soluble en agua, es de mayor digestibilidad y posee un alto valor nutricional, mientras que, la fracción cloroplástica (proteína verde), insoluble en agua, es una lipoproteína en estado coloidal asociada con los cloroplastos (16), de menor digestibilidad y valor nutritivo (17). La pared celular de las hojas contiene alrededor de un 10% de

proteínas (2).

Estudios realizados (14, 27) han mostrado que las mejores condiciones para recuperar las proteínas del jugo extraído de las hojas son temperaturas entre 65 y 85°C con ajustes de pH en el jugo. La recuperación de la proteína del jugo extraído del prensado de alfalfa cortada es técnicamente factible (3, 9, 12). Sin embargo, el alto costo de la desintegración mecánica aunado al poco valor de la fibra residual para animales rumiantes por su baja digestibilidad no han permitido su desarrollo industrial.

A pesar del amplio potencial de la proteína foliar, ésta no puede ser aprovechada por animales de estómago simple puesto que, éstos no cuentan con las enzimas requeridas para la hidrólisis de los enlaces de la compleja matriz lignocelulósica en la que se encuentra la proteína, además la fibra crea una gran viscosidad en el intestino delgado de estos animales impidiendo la absorción de los nutrientes (18)

En este estudio se plantea como alternativa estudiar las condiciones de pH, tiempo, relación sólido – líquido (solución extractante) y temperatura que facilitan la extracción, y condiciones de pH y temperatura que facilitan la separación por precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano para obtener un concentrado proteico. El residuo fibroso puede utilizarse como fuente energética o para producir azúcares mediante hidrólisis enzimática.

## Materiales y métodos

Material lignocelulósico. Se utilizó el pasto *Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott (Pasto elefante enano) de ocho semanas de crecimiento y de diez años de establecimiento, utilizado como pasto de corte. Se recolectó en el Estado Zulia, tomándose ocho muestras al azar que luego se mezclaron para tener una muestra representativa. Posteriormente, se guardaron en bolsas plásticas en cava a 8°C hasta el momento de su uso.

Pretratamiento. La muestra de pasto se secó parcialmente en una estufa de convección forzada a 48°C por 48 h. El pasto se molió posteriormente a un tamaño de partícula de 1 mm (11).

Análisis. El pasto se caracterizó determinándose el contenido de humedad (6), proteína cruda (11) celulosa, hemicelulosa y lignina (15).

La proteína soluble presente en los extractos y en los sobrenadantes de la precipitación se determinó por el método de Lowry modificado (19), en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 (Mulgrave, Victoria, Australia) a una longitud de onda de 742 nm y utilizando albúmina de suero de bovino como proteína estándar.

Método de extracción de las proteínas. Se utilizó como agente extractante hidróxido de calcio. Las extracciones se realizaron por triplicado en Erlenmeyers de 250 mL con 5 g de materia seca en un baño de maría con agitación constante (100 rpm). Posteriormente, se filtró al vacío empleando una tela sintética y los sólidos se lavaron con 10 mL de agua

destilada. Al extracto y lavado se les midió el pH. Los extractos se guardaron a 4°C por 24 h. Luego se sometieron a centrifugación (10000 rpm) por 30 min en una centrífuga Centra NTMP4R (International Equipment Company, Nedham Heights, Massachusetts, USA), separando así la fibra y la proteína verde presente en el extracto proteico. En éste se recuperó la proteína blanca o citoplásmica (17).

Se determinó proteína soluble a los extractos por el método de Lowry modificado (19). Posteriormente se calculó el rendimiento de extracción como el cociente entre los gramos de proteína soluble en el extracto y la proteína cruda inicial expresado como porcentaje.

Selección del tiempo de extracción. Se realizaron extracciones a pH 10 de la solución de hidróxido de calcio (7), 60°C, relación sólido – líquido 1:10 en tiempos de 5, 10, 20 y 30 min.

Selección del pH de la solución extractante. Se realizaron las extracciones a valores de pH de la solución extractante de hidróxido de calcio de 10, 11, 12 y 12,60 (solución saturada), a 60°C, relación sólido – líquido 1:10 y tiempo de extracción óptimo determinado en la experiencia anterior.

Selección de la temperatura y la relación sólido – líquido. Se efectuaron extracciones a temperaturas de 30, 45, 60, 75 y 90°C y relaciones sólido - líquido 1:10 y 1:15 (factorial 5 x 2), utilizando el pH óptimo de la solución de hidróxido de calcio y el tiempo óptimo

de extracción. Se evaluó el rendimiento de extracción de proteínas en cada una de las condiciones planteadas y se seleccionaron como óptimas aquellas condiciones donde se obtuvo mayor rendimiento.

Método de precipitación de las proteínas. Se realizaron tratamientos termoquímicos por triplicado. Se tomaron alícuotas de 20 mL del extracto resultante de la mejor condición de extracción (mayor rendimiento de extracción obtenido) en vasos de precipitado y se ajustó el pH a 4 o 4,5 (puntos isoeléctricos de la proteína foliar) con ácido clorhídrico 1N estandarizado. Posteriormente se introdujeron en un baño de maría a temperaturas de 50, 65 y 80°C por 30 minutos (factorial 2 x 3) y se centrifugaron, obteniéndose un precipitado proteico que se llevó a una estufa a 60°C por 24 h hasta secarse, y luego se le determinó proteína cruda; al sobrenadante se le determinó proteína soluble. La proteína precipitada se determinó por diferencia entre la proteína del extracto respectivo y la del sobrenadante. El rendimiento de precipitación se obtuvo del cociente entre la cantidad en gramos de proteína en el precipitado y la cantidad en gramos de proteína soluble en el extracto proteico, expresado como porcentaje.

Preparación de las muestras para HPLC. Se pesaron 50 mg de concentrado proteico por triplicado y se llevaron a tubos de cierre hermético para la hidrólisis de las proteínas con 20 mL de HCl 6 N. Se desplazó el aire con nitrógeno gaseoso. Los tubos se colocaron en una estufa a 110°C por

22 h. Cumplido el tiempo de hidrólisis, se eliminó el exceso de HCl por neutralización con 20 mL de NaOH 6 N. El pH de las muestras se ajustó a 2,2 con una solución de HCl 0,05 N. Se filtró el contenido de los tubos con papel Whatman 1 y el sobrenadante se colocó en balones volumétricos de 100 mL y se aforaron con solución de buffer citrato a pH 2,2. Luego se filtraron con filtros Millipore de 0,2 mm de diámetro de poro. El filtrado se conservó en congelación a -10°C hasta su uso.

Derivatización. Las muestras y los estándares se derivatizaron pre-columna en forma automatizada, utilizando un inyector Shimadzu modelo SIL6B. A 75 mL de la muestra (mezcla estándar de aminoácidos o hidrolizado) se le agregaron 300 mL de solución fluorescente de Ortoftaldehido- tiol (OPT). El tiempo programado para la inyección fue de 2 minutos, después de la derivatización.

Análisis de aminoácidos. Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mediante la utilización de un cromatógrafo marca Shimadzu, equipado con un detector de fluorescencia modelo FLD 6A a una longitud de onda de 350 nm, dos bombas de alta presión modelo LC 6A provistas de una cámara mezcladora de solventes, necesarias para crear gradientes, y un horno modelo CTO 6A. Se inyectaron 20 mL de muestra utilizando un inyector automático modelo SIL 6B. La columna utilizada fue tipo Altex Ultrasphere ODS con partículas esféricas de 5 micras de diámetro y un sistema controlador SCL

6B que gobierna las funciones del equipo. El tiempo de retención y área bajo la curva se obtuvo mediante un integrador Chromatopac CR-4A. Se utilizaron dos sistemas de solventes, un sistema A compuesto por buffer acetato a pH 6,6, metanol y tetrahidrofurano en proporciones 80:19:1; un solvente B, compuesto por metanol y buffer acetato a pH 6,6, en proporciones 80:20. Se utilizó un gradiente binario en combinaciones tanto isocráticas como de incremento lineal del solvente B. El flujo fue constante e igual a 1,2 mL/min y la

temperatura de la columna fue de 33°C. Se usó una estándar SIGMA LAB de concentración 50 pmol/mL como referencia para la cuantificación de los aminoácidos.

**Análisis Estadístico.** Los resultados de las extracciones se analizaron usando procedimientos GLM del SAS (26). Se aplicó un análisis de varianza a cada uno de los estudios. Se evaluó el efecto de las principales variables, y en el caso de los diseños factoriales temperatura vs. relación sólido - líquido, se evaluaron las interacciones.

## Resultados y discusión

### Contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas.

Los resultados obtenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina (cuadro 1) se encuentran dentro de los rangos reportados por Flores y col. (13) para este tipo de pastos y el contenido de proteína cruda está dentro de los límites reportados por Clavero y Ferrer (5) para pasto elefante enano de ocho semanas de sembrado.

**Selección del tiempo de extracción.** En el cuadro 2, se muestran los resultados obtenidos en la selección del tiempo de extracción con solución de hidróxido de calcio a

pH 10,60°C, y relación sólido – líquido 1:10. El uso de hidróxido de calcio y las condiciones mencionadas han sido recomendados por De La Rosa y col. (7). Se observa que aunque se incrementa el tiempo de extracción de la proteínas del pasto elefante enano, la concentración de proteínas solubles en el medio es la misma para todos los intervalos evaluados, por lo que éste no constituye un factor determinante en el proceso, pues, bastan sólo 5 minutos para extraer la proteína débilmente ligada en la matriz lignocelulósica. Un tiempo tan corto de 5 min significa en un proceso de

**Cuadro 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y proteína cruda del pasto elefante enano.**

Celulosa* (%)	Hemicelulosa* (%)	Lignina* (%)	Proteína Cruda* (%)	Humedad (%)
32,79	20,94	4,01	11,68	10,24

\*% calculado en base seca.

**Cuadro 2. Extracción de proteínas con solución de hidróxido de calcio a pH 10, 60°C, relación sólido – líquido 1:10 y diferentes tiempos de extracción.**

Tiempo de extracción (min)	pH final del extracto	Concentración de proteína soluble (mg/mL)
5	5,89	193,02 <sup>a</sup>
10	5,90	193,15 <sup>a</sup>
20	5,89	193,09 <sup>a</sup>
30	5,89	193,07 <sup>a</sup>

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los resultados ( $P > .05$ )

extracción que la concentración del material extraído corresponde a su solubilidad. Se seleccionó entonces, para los ensayos posteriores, un tiempo de extracción de 5 minutos cuando se trabaja con un pH inicial de 10.

**Selección del pH de la solución extractante.** Los resultados obtenidos en los experimentos de pH se muestran en el cuadro 2.

Se observa que la concentración de proteínas solubles obtenida para los pH 10, 11 y 12 es comparativamente mucho más baja que la resultante para las extracciones a pH 12,60 ( $P < .05$ ). Esto pudiera deberse a que el pH final de los extractos pertenecientes a las extracciones a pH 10, 11 y 12 están muy cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas del pasto, pH 4–5 (9), limitando su solubilidad y por ende la capacidad de difundir desde la matriz lignocelulósica del mismo hacia la fase acuosa del medio; por otro lado, a pH inicial 12,60, se observa un efecto inverso, el porcentaje de extracción es muy superior debido a la posible presencia de la arginina, aminoácido cargado positivamente cuyo  $pK_a$  es de 12, por lo que al ser el pH de la solución

12,60, éste se encuentra principalmente sin carga y los grupos carboxilos de otros aminoácidos se encuentran como carboxilatos, de modo que existe mayor repulsión de cargas negativas entre las proteínas, facilitando su movilidad y por lo tanto, su extracción cuadro 3. Con los resultados obtenidos se estableció 12,60 como pH óptimo para las extracciones para el resto de los ensayos, el cual corresponde a una solución 0,02 M de hidróxido de calcio, la cual se encuentra en estado de saturación cuadro 4.

**Selección de la temperatura y la relación sólido – líquido para la extracción.** En la figura 1, se observa que a medida que se incrementa la temperatura disminuye gradualmente el rendimiento de extracción de las proteínas. Se evidencia que para todas las condiciones de temperatura, la extracción de proteínas fue mayor a menor relación sólido – líquido. Sin embargo, para ambos ensayos a diferentes temperaturas, el comportamiento de las curvas de extracción es muy similar. Por otro lado, en la misma también se observa que para ambas

**Cuadro 3. Extracción de proteínas con solución de hidróxido de calcio a diferentes valores de pH, 60°C, relación sólido – líquido 1:10 y tiempo de extracción de 5 minutos.**

pH del hidróxido de calcio	pH final del extracto	Proteína soluble (mg/mL)	% de Extracción de proteínas
10	5,89	193,02	1,45 <sup>c</sup>
11	5,93	347,01	2,61 <sup>b</sup>
12	6,53	348,41	2,68 <sup>b</sup>
12,60	9,07	1085,16	8,31 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (P<.05)

relaciones sólido - líquido existe un rango de temperatura entre los 30 y 60°C donde el rendimiento de extracción alcanza los valores máximos. Probablemente a elevadas temperaturas está ocurriendo desnaturalización de las proteínas ocasionando pérdida de su solubilidad por exposición de grupos hidrofóbicos al medio.

Para la relación sólido - líquido 1:10, el máximo rendimiento obtenido fue de 8,31% mientras que para la relación 1:15 fue de 11,68%, este rendimiento bajo es característico de extracciones de proteínas de hojas tanto de gramíneas como de

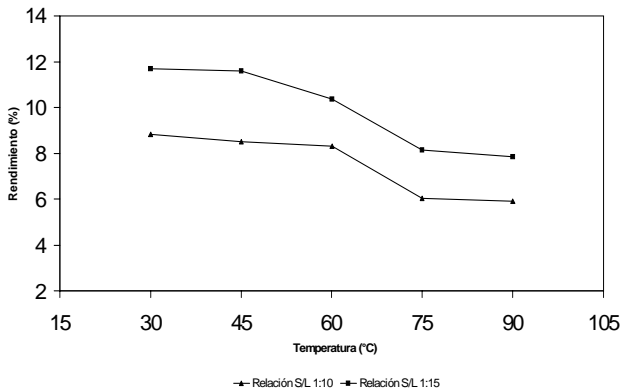
leguminosas que no han sido sometidas a pretratamientos físico-químicos. Díaz y col. (8), reportaron rendimientos entre 10 y 12% de leguminosas típicas de Cuba, mientras que Sentheshanmuganathan y Durán (28), mostraron valores hasta 45% en leguminosas y 18% en gramíneas, pero en este caso utilizando intensos tratamientos físicos como maceración y licuado, los cuales son muy costosos desde el punto de vista energético. Escoda (10) obtuvo rendimientos máximos de proteínas de 18% en pasto guinea con los métodos físicos antes mencionados.

Se puede apreciar que el aumento

**Cuadro 4. Extracción de proteínas con solución de hidróxido de calcio a pH 12,60, 60°C, relación sólido – líquido 1:10 y diferentes tiempos de extracción.**

Tiempo de extracción (min)	pH final del extracto	Concentración de proteína soluble (mg/mL)
5	9,15	1133,93 <sup>a</sup>
10	9,13	1014,27 <sup>b</sup>
20	9,11	1128,54 <sup>a</sup>
30	8,97	1117,93 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (P<.05)



**Figura 1. Efecto de la temperatura y la relación sólido-líquido (S/L) sobre el rendimiento de extracción de las proteínas del pasto elefante enano.**

del porcentaje de extracción en la relación sólido – líquido 1:15 con respecto a la de 1:10 es similar (excepto para 30 y 45°C en donde el efecto de la relación sólido – líquido es ligeramente mayor), lo que implica que existen pocas interacciones con la temperatura ( $P>.05$ ). El porcentaje de extracción puede aumentar si se disminuye dicho cociente, pero los gastos de tratamiento para el efluente producido podrían ser prohibitivos. En los cuadros 5 y 6, se muestran los resultados del análisis estadístico del efecto de la temperatura y relación sólido-líquido sobre el rendimiento de extracción de las proteínas, respectivamente.

El cuadro 5 muestra que no existen diferencias significativas ( $P>.05$ ) entre los tratamientos a 30 y 45°C, y entre 75 y 90°C, confirmando 30°C como la temperatura a utilizar, condición comparable con la considerada óptima para la extracción de las hojas de plátano por Rosas y Díaz (25).

El análisis estadístico reveló diferencias significativas ( $P<.05$ ) entre las relaciones sólido líquido 1:10 y 1:15,

además no existen interacciones entre la temperatura y la relación sólido-líquido ( $P>.05$ ). Se estableció entonces como temperatura óptima 30°C y una relación sólido - líquido 1:15, puesto que a estas condiciones se obtuvo el máximo rendimiento (11,68%).

El bajo rendimiento proteico obtenido sugirió utilizar filtración como método alternativo de separación. No obstante, los rendimientos fueron inferiores a los obtenidos por centrifugación como ocurrió con la extracción de proteínas de las hojas de yuca (21), donde los rendimientos con centrifugación fueron hasta 13% mayores que los obtenidos por filtración.

**Precipitación de las proteínas.** La figura 2 muestra el efecto de la temperatura sobre el rendimiento de precipitación de las proteínas a pH 4 y 4,5 a partir del sobrenadante donde se obtuvo el mayor rendimiento de extracción. Se observa que los rendimientos de precipitación siempre fueron mayores para pH 4, alcanzándose un valor máximo de



**Cuadro 5. Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de extracción de las proteínas del PEE.**

Temperatura(°C)	Rendimiento (%)
30	10,25 <sup>a</sup>
45	10,05 <sup>a</sup>
60	9,33 <sup>b</sup>
75	7,09 <sup>c</sup>
90	6,86 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < .05$ )

62,51% mientras que para pH 4,5 se obtuvo un 38,27% de rendimiento ( $P < .0001$ ). Además, es notorio que la temperatura no tuvo efectos significativos ( $P > .05$ ) sobre el rendimiento de precipitación de las proteínas, pues para cualquiera de los valores de pH, el rendimiento se mantuvo casi invariable.

Era posible que los precipitados a las dos condiciones de pH fueran complementarios, es decir, la proteína pudo precipitar de manera fraccionada. Para investigar esta posibilidad, se repitió la experiencia de manera secuencial. Una vez precipitada la proteína a pH 4, se elevó el pH hasta 4,5 a la temperatura de trabajo y no hubo precipitado adicional. Por lo

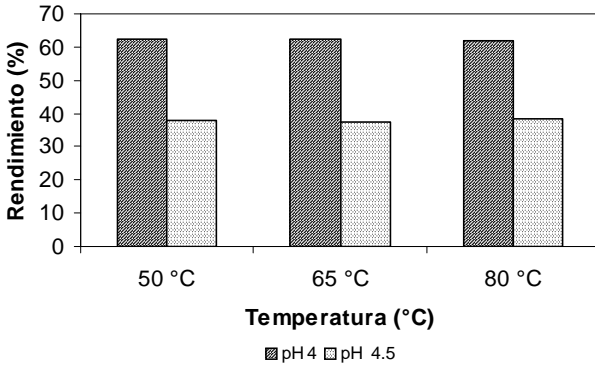
tanto, la hipótesis anterior quedó descartada. En base a estos resultados se estableció entonces como temperatura óptima de precipitación de las proteínas del PEE 50°C y pH 4 como punto isoeléctrico de la proteína foliar. El contenido proteico del concentrado resultante fue de 27,93%.

**Perfil de aminoácidos.** El cuadro 7 muestra la composición de aminoácidos del concentrado proteico del pasto elefante enano. Los valores se expresan en gramos de aminoácido por 16 gramos de nitrógeno (equivalente a 100 gramos de proteína). El perfil es limitante en fenil alanina y metionina para cerdos y aves, y relativamente bajo en lisina, comparable con la proteína del maíz.

**Cuadro 6. Efecto de la relación sólido – líquido sobre el rendimiento de extracción de las proteínas del PEE.**

Rendimiento (%)	Relación sólido - líquido
9,92a	1:15
9,51b	1:10

Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $P < .05$ )



**Figura 2. Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de precipitación a pH 4 y 4,5 de las proteínas a la mejor condición de extracción.**

**Cuadro 7. Perfil de aminoácidos del concentrado proteico del pasto elefante enano.**

Aminoácidos	Concentrado proteico (g/16g N)**
Asp	16,81 ± 0,93
Glu	12,56 ± 0,49
His*	9,55 ± 0,64
Ser	0,88 ± 0,19
Gly	6,33 ± 0,94
Thr*	6,02 ± 0,42
Arg	5,50 ± 0,43
Ala	9,29 ± 0,38
Tyr	4,55 ± 0,25
Met*	1,21 ± 0,43
Val*	6,55 ± 0,44
Phe*	3,42 ± 0,09
Ile*	3,90 ± 0,39
Leu*	5,77 ± 0,30
Lys*	4,93 ± 0,39

\*Aminoácidos esenciales.

\*\*Valor promedio ± desviación estándar

## Conclusiones

Este trabajo demostró que el pasto elefante enano contiene hasta un 11,7% de proteína verdadera muy soluble en medios fuertemente alcalinos a 30°C, desnaturizable con el calor perdiendo apreciablemente su

solubilidad y precipitando a pH 4 a una temperatura de 50°C. El concentrado obtenido tiene un 27,93% de proteína la cual es limitante en fenil alanina y metionina para cerdos y aves.

## Agradecimiento

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Parque Tecnológico Universitario del Zulia por su aporte económico al proyecto, al Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Medicina y a la Unidad de

Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia por la colaboración prestada.

## Literatura citada

1. A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 1990. 13<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. pp.125.
2. Bach-Tuyet, T., K. Liyama, and B. Stone. 1990. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: Taxonomic and structural considerations. Session 2. Plant aspects of lignocellulose utilization. p. 50-54. In: Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants. Alan D., Ljungdahl L., Wilson J., Harris P. (Eds). Georgia, USA.
3. Bickoff, E. M., A. N. Booth, D de Fremery, R. H. Edwards, B. E. Knuckles, R. E. Miller, R. M. Saunders, and G. O. Kohler. 1975. Nutritional evaluation of alfalfa leaf protein concentrate. p. 319-340. In: Protein nutritional evaluation quality of foods and feeds. Part 2. Quality factors-Plant breeding, composition, processing, and antinutrients. M. Friedman (Ed.). USDA. Berkeley, California.
4. Broderick, G. 1994. Quantifying forage protein quality. p. 200-228. In: Forage quality, evaluation, and utilization. G. C. Fahey, Jr. (Ed.). American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin.
5. Clavero, T. y O. Ferrer. 1995. Valor nutritivo del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum.cv.Mott). Rev. Fac. Agron. (LUZ), 12: 365-372.
6. Covenin 1156-79. Alimentos para animales. Determinación de humedad.
7. De la Rosa, L. B., S. Reshamwala, V. Latimer, B. Shawky, B. Dale, and E. Stuart. 1994. Integrated production of ethanol fuel and protein from coastal bermudagrass. Appl. Biochem. Biotechnol., 45/46: 483-497.
8. Díaz, M., A. González, F. Curbelo, A. Cruz y C. Mora. 1997. Evaluación de leguminosas de alto tenor proteico en la obtención de concentrados de proteína foliar (CPF). Rev. Cubana Cienc. Agric. 31: 183-188.
9. Eipeson, W., N. Singh, and S. Manjrekas. 1974. Kinetics of thermal precipitation of leaf protein from Lucerne. J. Food. Sci. Technol., 11: 66-70.

10. Escoda, A. 1982. Obtención de concentrados proteicos a partir de diferentes especies vegetales. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 7: 90-95.
11. Ferrer, A., F. M. Byers, B. Sulbarán de Ferrer, B. E. Dale, and C. Aiello. 2000. Optimizing ammonia pressurization/depressurization processing conditions to enhance enzymatic susceptibility of dwarf elephant grass. Appl. Biochem. Biotechnol. 84/86: 163-179
12. Fiorentini, R., and C. Galoppini. 1981. Pilot plant production of an edible alfalfa protein concentrate. J. Food Sci. 46: 1514-1520.
13. Flores, J., J. Moore, and L. Sollenberger. 1993. Determinants of quality in Pensacola bahiagrass and Mott elephantgrass. J. Anim. Sci. 71: 1606-1617.
14. Free, B. L., and L.D. Satterlee. 1975. Biochemical properties of alfalfa protein concentrates. J. Food Sci. 40: 85-89.
15. Goering, H.K., and P.J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook N° 379. ARS-USDA, Washington, D.C. 8 pp.
16. Hanczakowski, P., B. Szymczyk, and B. Skraba. 1991. Composition and nutritive value of native and modified green fraction of leaf protein from Lucerne. J. Sci. Food Agric. 56: 495-501.
17. Hernández, T., C. Centeno, C. Martínez, and A. Hernández. 1995. Effect of solvent extraction on the nitrogen compounds in alfalfa protein concentrates. J. Agric. Food Chem. 43: 3065-3069.
18. Jansen, W., and B. Carré. 1985. Influence of fiber on digestibility of poultry feeds. p. 71-86. In: W. Haresign and D.J. Cole (Eds). Recent Advances in Animal Nutrition. Butterworths, London.
19. Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall. 1955. Protein measurement with the folin phenol reagent. Anal. Chem. 16: 190-210.
20. Maciejewicz-Rys, J., and P. Hanczakowski. 1990. Improvement of the nutritive value of cereals by leaf protein supplementation. J. Sci. Food Agric. 50: 99-104.
21. Mastrodi, J. y A. Correa. 1986. Estudio do concentrado proteico de folha de mandioca. Obtenção, análises químicas e suplementação com aminoácidos. Arch. Latin. Nutr. 36: 483-494.
22. Ministerio de Agricultura y Tierras. Venezuela. 2002. Anuario Estadístico.
23. Miquilena, E. 1998. Contenido de carbohidratos estructurales, no estructurales y fracciones nitrogenadas en dos ecotipos de *Leucaena leucocephala* bajo diferentes niveles de fertilización con nitrógeno y fósforo y diferentes periodos de evaluación. Trabajo de ascenso. Facultad de Agronomía. LUZ.
24. Quintero, B., T. Clavero, C. Castro de Rincón, A. del Villar y O. Araujo-Febres. 1995. Efecto de los factores climáticos y altura de corte sobre el valor nutritivo y producción de materia seca del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum.cv.Mott). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 12: 81-94.
25. Rosas, A., and A. Díaz. 1983. A leaf protein concentrate from plantain (*Musa paradisiaca* L. subsp. *normalis* O. Kze). Acta Cient. Ven. 34: 74-77.
26. SAS. 1985. SAS User's guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
27. Satterlee L. 1980. The view of a food scientist on promises and problems of leaf protein incorporated into our foods. Trans. ASAE. 23: 237-241.
28. Sentheshanmuganathan, S., and S. Durand. 1969. Isolation and composition of protein from leaves of plants grown in Ceylon. J. Sci. Food. Agric. 20:603-608.