



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Composición química y tóxicos naturales
presentes en semillas de
Styphnolobium burseroides

T E S I S
para obtener el título de
QUIMICA DE ALIMENTOS
P r e s e n t a :

Ma. Paola Migliaro Holtheuer

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F. 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado :

- Presidente: *Prof. Sotelo López Angela*
- Vocal: *Prof. Lucas Florentino Bernardo*
- Secretario: *Prof. Cornejo Barrera Lucía*
- Primer suplente: *Prof. Gil Vieyra Leticia*
- Segundo suplente: *Prof. Miranda Martínez Inés*

Sitio donde se desarrolló el tema:

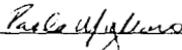
*Laboratorio 111, Departamento de Farmacia,
División de Estudios de Posgrado, Conjunto E.
Facultad de Química , U.N.A.M.*

Asesor del tema:



M.en C. Angela Sotelo López

Sustentante:



Ma. Paola Migliaro Holtheuer

INDICE

1. <i>Introducción</i>	1
2. <i>Objetivo</i>	2
3. <i>Generalidades</i>	3
3.1. <i>Descripción botánica</i>	4
3.2. <i>Datos de las semillas recolectadas</i>	5
3.3. <i>Composición proximal</i>	7
3.4. <i>Contenido de aminoácidos</i>	10
3.5. <i>Factores antinutricionales</i>	11
3.6. <i>Factores tóxicos</i>	13
3.7. <i>Digestibilidad de los rumiantes</i>	17
4. <i>Parte experimental</i>	19
4.1. <i>Análisis Proximal</i>	20
4.2. <i>Proteína verdadera</i>	27
4.3. <i>Determinación de aminoácidos</i>	29
4.4. <i>Determinación de digestibilidad proteínica "In vitro"</i>	39
4.5. <i>Determinación de tóxicos naturales</i>	40
4.6. <i>Determinación de digestibilidad ruminal "In vitro"</i>	55
4.7. <i>Determinación de azúcares reductores y no reductores por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)</i>	57
5. <i>Resultados y discusión</i>	61
6. <i>Conclusiones</i>	69
7. <i>Bibliografía</i>	70



Figura 1 *Styphnolobium bursoroides* - A Rama con inflorescencias - B Detalle de estipula - C Botón floral mostrando bractea floral, bracteolas y caliz giboso, lobulado - D Estandarte - E Ala - F Petalo de la quilla - G, Gineceo y androceo - H Legumbre mostrando las marcas vexillares - I Semilla - J Plantula

INTRODUCCION

México, por su localización, presenta una gran diversidad de climas y suelos como son las zonas selváticas de la región sureste del país, las zonas desérticas en Chihuahua y Sonora, y las regiones altas y frías de la cadena volcánica, por ende posee una flora muy variada y abundante. Las leguminosas son la segunda familia de plantas más extensa con la que cuenta México, representada por 135 géneros y 1724 especies, siendo 896 de estas especies endémicas del país. La familia se encuentra distribuida en todo el país y en todo tipo de hábitats, concentrándose más en las zonas tropicales (1).

De toda esta flora sólo una pequeña parte se cultiva y se aprovecha, como son todas las leguminosas tradicionales. Sin embargo, existen muchos recursos naturales que se encuentran en forma silvestre a los cuales se les da escasa o nula utilización. Las zonas áridas y semiáridas son un ejemplo de lo anterior, en donde, en general se observa un bajo nivel de vida por la baja productividad del sector agropecuario, representando la actividad ganadera una ocupación importante para la población rural.

Las leguminosas por su alto contenido de proteína (17-25 %), además de que son buena fuente de carbohidratos asimilables, vitaminas y minerales se consideran un alimento importante para el consumo humano y animal, ya que no solo es importante su gran cantidad de proteína, sino la calidad de éstas, que aunque no se puedan comparar con las proteínas animales, al consumirse junto con cereales resultan una buena fuente alternativa en la alimentación. Sin embargo, su utilización se ve limitada ya que generalmente contienen sustancias tóxicas y factores antinutricionales que en algunos casos pueden ser eliminados o disminuidos mediante procesos como la cocción y la germinación.

Por ello, se pretende dar a conocer el valor nutritivo de la semilla de *Styphnolobium bursroides*, leguminosa silvestre del Valle de Tehuacán, Puebla. Mediante su análisis químico y toxicológico, se podrá determinar si es posible su uso en la alimentación ya sea animal o en el mejor de los casos en la alimentación humana.

OBJETIVO

Conocer la composición química, tóxicos y valor nutritivo de las semillas de *Styphnolobium burseroides* para su posible uso en la alimentación animal en primera instancia.

GENERALIDADES

Las leguminosas están incluidas dentro de la familia Leguminosae. Esta familia está considerada como la más importante económicamente, ya que provee de importantes recursos como: alimento, colorantes, gomas, resinas, insecticidas, entre otros; además de su importancia para la agricultura, ya que muchas especies dentro de esta familia contribuyen en el proceso de fijación de nitrógeno del suelo en simbiosis con *Rhizobium*. (2)

Las Leguminosae están distribuidas en todo el mundo y comprenden 560-670 géneros, representados por 12000-17000 especies. (3)

La familia está comprendida por 3 subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae. De las 3 subfamilias la Papilionoideae es la más grande y comprende 32 tribus comparadas con 5 de las Caesalpinioideae y 5 de las Mimosoideae. Este grupo incluye todos los granos de leguminosas económicamente importantes, incluyendo además de los mencionados anteriormente semillas oleaginosas. (4)

Las leguminosas difieren de otros vegetales alimenticios en que, gracias a las bacterias simbióticas de los nódulos, tienen la propiedad de obtener el nitrógeno combinado en forma de amonio (NH_4^+) e incorporarlo a los demás alimentos nutritivos, tomándolo de la provisión de nitrógeno libre de la atmósfera. Esto hace que estas plantas puedan sintetizar con cierta facilidad proteínas, lo que las convierte en una buena fuente de este nutriente.

En general, en cuanto a su composición química, las semillas de las leguminosas son una rica fuente de proteínas. En su mayor parte están compuestas por globulinas (80%), pero también por albúminas (8-10%) y son deficientes en aminoácidos azufrados y triptófano, sin embargo son ricos en lisina.

Contienen del 57-65 % de carbohidratos (principalmente almidón) que se absorbe y utiliza bien, sin embargo, también contienen hemicelulosa, celulosa, lignina y pentosanos, los cuales no pueden ser digeridos por el sistema digestivo humano, aunque sí por los rumiantes.

El contenido de grasa de la mayoría de las leguminosas es alrededor del 2 %, a excepción del cacahuete y soya que tienen alrededor del 40 %, sin embargo, las grasas que aportan las leguminosas son ricas en ácidos grasos indispensables.

Las cenizas en las leguminosas varían de 2.5-4.2 %, con cantidades bastante altas de K, P, Ca, Mg y Fe

También son fuente de vitaminas.

La composición química de las semillas de las leguminosas va a depender de los recursos específicos de su ambiente y de la capacidad de la planta para utilizar estos recursos. Así, va a variar su composición de acuerdo a la época del año en la que se recolecte, al tipo de suelo, a el uso de fertilizantes, a la variedad, a la fase de desarrollo en la que se encuentre, entre otros (5)

DESCRIPCION BOTANICA DE LA LEGUMINOSA EN ESTUDIO

Nombre científico:	<i>Styphnolobium bursarioides</i>
Nombre común:	Haba de monte, haba cimarrona
Familia:	Leguminosae
Subfamilia:	Papilionoideae
Tribu:	Sophoreae

Características: Árboles 4 -10 m de alto; hojas con 15 a 21 folíolos ovados a anchamente elípticos, de 1.4 - 2.2 cm de largo por 0.7-1.2 cm de ancho. Flores de 1.4-1.5 cm de largo, de color rosa, dispuestas en cortos racimos axilares. Legumbre indehisciente, torulosa, lisa en el margen vexilar, rugosa en el resto, de 4-10.5 cm de largo por 1.6-1.7 cm de ancho, con 1-3 semillas. Semillas

- de 2.3-2.5 cm de largo por 1.4 cm de ancho de color oliváceo oscuro. Florece entre marzo y junio y fructifica entre junio y marzo
- Distribución:** Arbol endémico del Valle de Tehuacán en Oaxaca y Puebla, así como en la cuenca alta del Río Atoyac Habita en el bosque tropical caducifolio y en matorrales xerófilos sobre suelos negros de origen calizo entre los 1500-2020 msnm (6)
- Propagación:** Se pueden coleccionar semillas de esta planta durante los meses de noviembre a marzo, antes que el ganado consuma las que caen del árbol No se conocen datos acerca de su germinación y desarrollo posterior. Es importante el estudio de esta especie debido a que sus poblaciones se encuentran dispersas en el área de distribución y contienen pocos individuos lo que las hace vulnerables a los cambios en el uso del suelo que se dan en la región

SEMILLAS COLECTADAS Y ESTUDIADAS

- Descripción:** Arbol de 6 m de altura, corteza escamosa, exfoliante, de color gris, follaje verde intenso, caduco durante la estación seca, frutos verdes con abundante jugo azucarado, lisos, pubescentes. Al secarse los frutos (de manera natural) el exocarpo se torna amarillento y rugoso.
- Otros datos:** Los árboles se localizan en grupos dispersos entre sí, cada grupo con 2 a 10 individuos en un área de 0.5 Ha. aproximadamente, por lo que en ocasiones el árbol parece ser abundante de manera local, sin embargo las poblaciones se encuentran distantes entre sí. Los árboles producen una

cantidad variable de frutos, al parecer esto tiene que ver con el éxito en la polinización y con la precipitación pluvial en la localidad durante el tiempo de maduración de los frutos, se han observado árboles con unos 120 frutos y otros individuos que sólo tienen unos 10 o 20 frutos *

El género *Styphnolobium*, hasta el momento, cuenta con nueve especies conocidas, de las cuales ocho se encuentran en América y una en el sureste de Asia. En México se encuentran cinco especies, en el sur de Estados Unidos una y en América Central tres. Sus especies tienden a ser endémicas restringidas que habitan en climas templados a cálidos y de subdesérticos a húmedos (1)

Todas las especies son morfológicamente muy diferentes entre sí y se dan, también, en climas muy diferentes. Hasta el momento sólo se ha estudiado la especie asiática *Styphnolobium japonicum*, en la cual se han encontrado algunos compuestos de interés, como son alcaloides (stizolamina), aminoácidos no proteínicos (γ -metilglutamina, ácido 2-amino-4-metilpentadienoico, los cuales se han encontrado en hojas, raíz y plántula), algunos terpenoides (azukisaponina), entre otras (7)

En cuanto a nódulos bacterianos *Styphnolobium japonicum* es la única especie de este género que se ha estudiado en busca de nódulos, siendo negativo el reporte, sin embargo es probable que las especies no estudiadas sí contengan nódulos ya que otros géneros relacionados de la tribu Sophoreae a la que pertenece *Styphnolobium* contienen nódulos en las raíces.*

Dentro de los factores que hay que evaluar para determinar la calidad nutritiva de la leguminosa en estudio, están: la composición proximal, composición de aminoácidos, digestibilidad, tóxicos y factores antinutricionales presentes.

* Datos proporcionados por el Biólogo José Luis Contreras Jiménez.

COMPOSICION PROXIMAL

El análisis proximal o sistema analítico Weende fue desarrollado en Alemania hace más de cien años y con él es posible la determinación de los componentes principales de los alimentos.

El análisis proximal incluye las determinaciones de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos asimilables por diferencia. Resulta de importancia, ya que con los datos obtenidos podemos saber hacia donde dirigir un estudio posterior.

Humedad.

Todos los alimentos contienen agua, la cual varía en los alimentos naturales entre 60-95%. Existen dos formas generales en las que se encuentra el agua en los alimentos: el agua libre y el agua ligada. La primera, es la forma predominante (constituye aproximadamente el 95 %) y se libera con gran facilidad, siendo la que se determina con los diferentes métodos existentes para la determinación de humedad. El agua ligada se encuentra en los alimentos como agua fuertemente unida o adsorbida a las proteínas y a las distintas moléculas polares que componen el alimento (constituye aproximadamente el 5%), siendo muy difícil su determinación.

El método a usar, así como la temperatura a emplear dependen del material a secar, ya que todos los alimentos tienen una composición diferente y el agua puede encontrarse de diferentes maneras, ya sea adsorbida, ocluida o retenida químicamente, encontrándose con barreras físicas que obstaculicen o impidan su difusión. También puede presentar algunos componentes que se descompongan con relativa facilidad o material volátil que se desprenda junto con el agua. De ahí la importancia en la elección del método y temperatura adecuados.

La mayoría de los métodos empleados para la determinación de humedad en alimentos se basa en la pérdida de peso por calentamiento.

El contenido de humedad de los alimentos es de gran importancia por aspectos económicos, de conservación y nutricionales. (9)

Es indispensable conocer la humedad de la muestra para darle un valor real a la cantidad de otros componentes.

Cenizas.

La ceniza es el residuo inorgánico que procede de la incineración de la materia orgánica. Se determina con el propósito de analizar el mineral, de definir en cantidad la materia orgánica y el total de nutrimentos digeribles y para señalar la presencia de adulterantes minerales.

Los minerales son importantes, ya que intervienen en diferentes ciclos metabólicos del organismo, estando relacionados a nivel celular, principalmente, con la actividad biológica de las enzimas. (9)

Fibra.

La fibra está constituida por carbohidratos estructurales tales como la celulosa, hemicelulosa, lignina y pentosanos, las cuales forman parte de la pared celular de todos los vegetales. El hombre no puede aprovechar nutricionalmente la fuente de energía que representan estos carbohidratos, debido a que los monogástricos no tienen, en su aparato digestivo, las enzimas necesarias para su digestión, en cambio, los rumiantes poseen un sistema bacteriano y enzimático para degradar la celulosa, principalmente.

La extracción de fibra cruda, por digestión con ácido y álcali, es la forma más fácil de digerir los nutrimentos contenidos en los alimentos. (9,10)

Proteína.

Las proteínas se encuentran distribuidas tanto en el reino animal como en el vegetal, siendo de gran importancia en la dieta del hombre, ya que las proteínas forman parte de todas las células que conforman los tejidos del cuerpo y en donde realizan diferentes funciones

La proteína cruda de los alimentos se calcula en base al nitrógeno total, que comúnmente es determinado por el método de Kjeldahl

Las proteínas cambian de acuerdo al producto, debiéndose considerar la cantidad, calidad (contenido de aminoácidos indispensables) y digestibilidad Las proteínas son lo suficientemente constantes dentro de una clase para hacer factible el uso de factores de conversión

El factor que se usa para convertir a proteína el nitrógeno de la mayoría de las plantas es de 6.25 Este valor surge de la observación de que un buen número de proteínas tienen un contenido de nitrógeno del 16 % El contenido en nitrógeno de una proteína varía de acuerdo al peso molecular de ésta y a la proporción de los aminoácidos presentes, es decir, a mayor contenido de aminoácidos básicos, mayor contenido de nitrógeno y, por lo tanto, menor el factor de conversión (9,10)

En la siguiente tabla pueden observarse algunos factores de conversión para algunas leguminosas, propuestos por Jones (11)

Nombre científico	Nombre común	Factor de conversión
<i>Phaseolus vulgaris</i>	frijol común	6.25
<i>Vicia faba</i>	haba	6.25
<i>Arachis hypogea</i>	cacahuete	5.46
<i>Lens culinans</i>	lenteja	6.25
<i>Pisum sativum</i>	chícharo	6.25
<i>Glycine max</i>	soya	5.71

Grasa.

La cantidad de grasa se determina mediante su extracción con disolventes. Las extracciones sobre productos alimenticios pueden hacerse con éter etílico o éter de petróleo.

El material soluble en éter incluye una gran variedad de compuestos orgánicos. ácidos grasos, vitaminas liposolubles o provitaminas como los carotenoides, esteroides y ceras. Los lípidos se encuentran distribuidos tanto en el reino animal como vegetal. Intervienen en importantes funciones biológicas del organismo y proveen de los ácidos grasos indispensables (linoleico y linoléico) (9,10)

CONTENIDO DE AMINOACIDOS

El organismo humano no tiene la capacidad de fijar nitrógeno, por lo que se requiere de otras fuentes que sí puedan incorporar este elemento y sintetizar directamente los aminoácidos que el organismo debe recibir para cubrir sus necesidades.

Existen más de 100 aminoácidos que se encuentran en forma libre o combinada, pero solamente son veinte los aminoácidos que forman parte de la base estructural de las proteínas y ocho son nutricionalmente indispensables para el organismo humano, ya que éste no es capaz de sintetizarlos en las cantidades requeridas y, por lo tanto, deben proveerse en la dieta. Estos son fenilalanina, lisina, isoleucina, leucina, triptofano, valina, metionina y treonina. El resto de los aminoácidos pueden sintetizarse en los tejidos del hombre a partir de los aminoácidos indispensables o de otras fuentes nitrogenadas. (12)

La función de los aminoácidos son formación de proteínas y polipéptidos, formación de moléculas con funciones específicas, entre otros, mientras que los aminoácidos no proteínicos actúan como importantes precursores de otras moléculas o como intermediarios en el metabolismo humano.

El valor biológico o calidad nutritiva de toda proteína depende de su composición en aminoácidos indispensables y de su digestibilidad.

Todos los aminoácidos indispensables deben estar presentes y, para una eficiencia óptima, deben encontrarse en las proporciones adecuadas.

En la actualidad, algunos aminoácidos nutricionalmente importantes además de usarse como suplemento alimenticio se han probado como agentes terapéuticos o farmacológicos y otros como saborizantes o aromatizantes. (9,10,13)

FACTORES TOXICOS Y ANTINUTRICIONALES PRESENTES EN LEGUMINOSAS

Uno de los problemas que presentan las leguminosas y que limitan su consumo es la presencia de factores tóxicos y antinutricionales. Dentro de los factores tóxicos que se encuentran comúnmente en fuentes vegetales, están: los glucósidos cianogénicos, saponinas, alcaloides, factores bociogénicos, factores que producen latrismo, aminoácidos raros, factores anticoagulantes, y dentro de los factores antinutricionales comúnmente encontrados están: hemaglutininas, inhibidores de tripsina, y otros inhibidores de enzimas. (14)

En este trabajo se determinaron los siguientes compuestos tóxicos y factores antinutricionales, por ser los que se encuentran con mayor frecuencia en el reino vegetal y principalmente en las leguminosas. Estos son:

Factores antinutricionales: hemaglutininas e inhibidores de tripsina

Factores tóxicos: glucósidos cianogénicos, saponinas y alcaloides.

FACTORES ANTINUTRICIONALES

Hemaglutininas.

En muchas leguminosas y en otras plantas, existen proteínas capaces de aglutinar los glóbulos rojos de diferentes animales, a estas sustancias se les da el nombre de fitohemaglutininas o lectinas.

La característica común de las lectinas es que todas son proteínas, algunas presentan uniones con azúcares (glicoproteínas) y otras contienen grupos sulfhidrílos. Poseen una actividad específica para ciertas moléculas de azúcar, así la actividad hemaglutinante se debe a una reacción entre las lectinas con ciertos grupos receptores situados en la superficie de las membranas de los glóbulos rojos. (15,16)

Para que se presente toxicidad por lectinas, es necesario que éstas al ser administradas por vía oral, resistan la digestión, y que además presenten especificidad hacia las células del tracto gastrointestinal. Esto es, que se combinen con grupos receptores en la superficie de las células de la mucosa, trayendo como consecuencia la reducción en la absorción de nutrientes, lo que causa retardo en el desarrollo. Se puede presentar daño a este nivel con formación de edema, inflamación y necrosis, provocando, en ocasiones, hasta la muerte.

Como proteínas, las lectinas son termolábiles y generalmente su efecto tóxico puede ser destruido por tratamiento térmico.

Se cree que la función de las lectinas dentro de la planta es que actúan como proteínas de reconocimiento, esto es: como anticuerpos, defendiendo a la planta contra bacterias patógenas y actuando también como agentes de unión con bacterias simbióticas. (17,18)

Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de tripsina son sustancias que tienen la habilidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Los inhibidores de tripsina son probablemente los más ampliamente distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas, encontrándose que la semilla es la parte de la planta que concentra la mayor cantidad de inhibidores. Este tipo de inhibidores interfieren con la digestión normal de las proteínas, ya que bloquean la acción de la tripsina, la cual es una enzima proteolítica que se libera del páncreas al intestino en el hombre y animales superiores.

El mecanismo de inhibición consiste en la competencia entre proteína e inhibidor por los sitios activos de la enzima, siendo más favorable la unión enzima-inhibidor por la formación de complejos más fuertes y estables.

Aunque los inhibidores son resistentes a la proteólisis en la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos. (19)

Su efecto tóxico, se ha visto en animales de experimentación que han sido tratados con extractos purificados de inhibidores de tripsina, a los cuales han provocado hipertrofia pancreática, inhibición en el crecimiento y aumento en la secreción de enzimas pancreáticas. (20)

La mayoría de los inhibidores de tripsina en las leguminosas pueden ser destruidas mediante el tratamiento térmico con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de la proteína.

La presencia de inhibidores de proteasas en las plantas, se dice sirven como un mecanismo de defensa contra organismos invasores, favorecen el catabolismo de las proteínas durante la germinación y previenen la degradación de las proteínas de reserva durante la maduración de la semilla (15)

FACTORES TOXICOS

Glucósidos cianogénicos.

El HCN se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, principalmente en la forma de glucósidos cianogénicos. Estos compuestos producen HCN por tratamiento con un ácido o con enzimas hidrolíticas específicas. Estos glucósidos pueden contener en su molécula un monosacárido, generalmente glucosa o disacáridos como gentobiosa. (15)

Se ha visto que solamente cuatro glucósidos cianogénicos son de importancia práctica con respecto a la toxicidad en humanos por plantas comestibles y son: amigdalina, durrina, lotoaustralina y linamarina.

La liberación espontánea de HCN en la planta depende de la presencia de la enzima específica beta-glucosidasa y agua, las enzimas se encuentran extracelulares y actúan solamente después de la ruptura del tejido.

La toxicidad de los glucósidos cianogénicos, se debe propiamente a la toxicidad del HCN generado que es un potente inhibidor respiratorio, ya que el cianuro tiene una fuerte afinidad por la enzima citocromo oxidasa presente en la cadena respiratoria terminal de organismos aerobios. El cianuro ingerido es rápidamente absorbido por la pared del

tracto gastrointestinal, pasa fácilmente a través de la piel y en forma gaseosa es rápidamente absorbido por los pulmones.

La dosis letal mínima de HCN para un individuo cuando se ingiere por vía oral, se ha estimado entre 0.5-3.5 mg /Kg de peso, una dosis mayor puede causar la muerte en pocos minutos. (21)

Saponinas.

Son glucósidos en los cuales una cadena de azúcares está unida a una aglicona o sapogenina. La aglicona o sapogenina puede ser alcohol o fenol.

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (en hojas, tallos y flores)

Las características más importantes de estos compuestos son: sabor amargo, forman espuma en soluciones acuosas, hemolizan eritrocitos, son muy tóxicos para los peces y anfibios y forman complejos con el colesterol y otros hidroxisteroides.

La membrana celular de los eritrocitos está constituida por esteroides, fosfolípidos y proteínas. Se ha atribuido que el punto de ataque en la hemólisis con saponinas es el colesterol de la membrana de los eritrocitos con el cual interactúa, cambiando drásticamente la permeabilidad de la membrana y provocando finalmente la ruptura de la membrana con una pérdida inmediata del contenido celular.

Schmidt-Thome, estudiando esta reacción encontraron que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para que se produzca la hemólisis.

La velocidad de hemólisis varía marcadamente con diferentes saponinas. A su vez con una saponina dada la velocidad de reacción será diferente dependiendo de la clase de eritrocito a probar.

De acuerdo con lo anterior, el que una saponina sea incapaz de hemolizar, implicará que carece o tiene menos afinidad por el colesterol. (15)

En cuanto al contenido de saponinas en ciertos productos alimenticios, el estatus del Merck Index (1976) indica que prácticamente las saponinas no son tóxicas para el hombre por ingestión oral. (22)

Por otro lado, algunos autores sí reportan cierta toxicidad oral de algunas saponinas, como se puede observar en la siguiente tabla

Toxicidad oral de algunas saponinas

Fuente de saponina	Animal	Dosis	Dosificación	Referencia
Sapindus sapindus	Ratón	DL	3000	(Spector, 1956)
	Ratón	DL	1000	(Spector, 1956)
	Ratón	DL ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
Agrostemma githago (common corn cockle)	Conejo	DL	56-52	(Spector, 1956)
	Perro	DL	20-25	(Spector, 1956)
Saponaria vaccaria	Ratón	DL ₅₀	960	(Abubakirov et al 1960)
Aesculus hippocastanum (horse chestnut)	Rata	DL ₅₀	50	(Abubakirov et al 1960)
	Rata	DL ₅₀	100	(Abubakirov et al 1960)
Hedera helix (ivy)	Rata	DL ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
Gypsophila paniculata	Rata	DL ₅₀	160	(Vogel & Marek, 1962)
Cyclamen europaeum	Rata	DL ₅₀	50	(Vogel & Marek, 1962)
Digitalis purpurea (fox glove)	Ratón	DL	50	(Spector, 1956)

Versión condensada de datos recopilados por George (23)

Las dosis letales varían de 25 a 3000 mg/ Kg de peso corporal. Las saponinas normalmente crean lesiones gastrointestinales, y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. (23)

Se ha observado que las saponinas de alfalfa y soya inhiben a ciertas enzimas, como : la α quimotripsina, las proteasas de Tribolium y la colinesterasa, así como las enzimas concernientes al ciclo del ácido cítrico. la inhibición es no específica y se ve suprimida por la presencia de cualquier otra sustancia proteínica. (24)

Se ha sugerido que la presencia de saponinas en las plantas es un mecanismo de defensa, ya que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y protozoarios

patógenos. También se ha considerado que las saponinas pudieran ser material de reserva.

Alcaloides.

Son compuestos de estructura compleja que contienen nitrógeno. Se encuentran distribuidos en diversas familias de plantas en forma de ácidos orgánicos, también se encuentran en forma de glucósidos de la ramnosa, galactosa y glucosa, otras están en forma de ésteres de ácidos orgánicos

La clasificación de los alcaloides en función a su estructura, es la siguiente:

Derivados de la ornitina y lisina	pirrolidinas, piperidinas, piridinas, indolizidinas, quinozilidinas, tropanos
Derivados del ácido nicotínico	piridinas
Derivados de la fenilalanina y tirosina	isoquinoleína
Derivados del triptofano	indoles, quinoleínas
Derivados de la histidina	imidazoles
Alcaloides terpénicos (y esteroidicos)	
Alcaloides diversos	purinas, macrociclos, etc

Los alcaloides forman un grupo muy heterogéneo de acción farmacológica potente en los animales.

No todos los alcaloides poseen la misma toxicidad, ni su efecto tóxico es el mismo en todos ellos; así, encontramos alcaloides neurotóxicos, hepatotóxicos, teratogénicos, cardiotóxicos, entre otros. Su acción, en general, sobre los humanos se da sobre el sistema nervioso y el endócrino, siendo su acción, principalmente sobre el sistema nervioso.

Su función en la planta, se ha considerado es que los alcaloides son productos terminales del metabolismo del nitrógeno, como protección contra ataques de insectos y

herbívoros, así también se ha sugerido que algunos intervienen estimulando y regulando actividades como el desarrollo, metabolismo y reproducción de la planta, como agentes detoxificantes.

Los alcaloides son sintetizados a partir de los aminoácidos y su degradación biológica da lugar a aminoácidos raros (25.26)

DIGESTIBILIDAD EN LOS RUMIANTES

El aparato digestivo de los rumiantes es muy diferente al de los monogástricos, por lo que sus requerimientos alimenticios también son diferentes.

Los tejidos de las plantas contienen un 75% de carbohidratos, principalmente polisacáridos celulosa, pectinas, hemicelulosa, fructosanos y almidones, siendo la celulosa la que se encuentra en mayor abundancia. Los rumiantes, tienen la capacidad de aprovechar la celulosa como fuente de energía, ya que han desarrollado la capacidad de producir enzimas en el tracto digestivo capaces de hidrolizar los enlaces de la celulosa.

El estómago de los rumiantes está dividido en 4 compartimentos: retículo, rumen, omaso y abomaso, y cada uno tiene una función diferente en el proceso de digestión. En el rumen se desarrolla la mayor actividad microbiana, aquí es en donde se encuentran todos los microorganismos que intervienen en el proceso de digestión y que permiten utilizar la celulosa, el retículo permite la regurgitación. Aunque la función del omaso no ha sido claramente definida, se dice que ayuda a reducir el tamaño de partícula del alimento, absorbe también algunos elementos, el abomaso tiene funciones similares a las del estómago de los monogástricos, como es la secreción de HCl y enzimas.

Debido al proceso de digestión de los rumiantes, éstos requieren de gran cantidad de energía, por lo que los carbohidratos son un componente muy importante en su dieta. Todos los carbohidratos son metabolizados por los microorganismos del rumen a compuestos más sencillos (pentosas, hexosas, disacáridos, etc).

En cuanto a las proteínas, éstas son degradadas en un alto porcentaje por los microorganismos del rumen, los aminoácidos son poco afectados, ya que los microorganismos del rumen no tienen el sistema enzimático apropiado para utilizar el

carbono de los aminoácidos, prefieren utilizar el de la glucosa. Sin embargo del 40-80 % de la proteína ingerida puede ser convertida a proteína microbiana, aunque no es la única forma en la que es sintetizada la proteína microbiana.

Los lípidos ingeridos sufren transformaciones importantes por los microorganismos del rumen, tales como hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, hidrogenación de lípidos, producción de isómeros trans de ácidos grasos

Los minerales en la dieta son muy importantes, ya que mantienen funciones fisiológicas como el pH, actúan como amortiguadores, el Na y K mantienen el potencial redox y una presión osmótica adecuada, algunos minerales intervienen en el desarrollo y actividad metabólica de la población del rumen. El Ca, K, Mg y Cl entre otros, estimulan a los microorganismos para una mayor digestión de la celulosa (27)

PARTE EXPERIMENTAL

Para este estudio se utilizó el fruto seco maduro y el fruto en madurez fisiológica (fruto maduro con alta humedad)¹ de la leguminosa silvestre *Styphnolobium burseroides*, colectadas y proporcionadas por José Luis Contreras Jiménez, Investigador del Herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (HUAP). El lugar de la colecta fue a 5 Km al norte de San Miguel Atlapulco, por el camino El Aguacate-Huehuetlán, Municipio de Santo Domingo Huehuetlán, Puebla. Latitud 18° 49' 9", Longitud 98° 10' 51", Altitud 1860 msnm.

PREPARACION DE LA MUESTRA

- 1.- Para su estudio, los frutos en madurez fisiológica fueron secados a 50-55° C, ésto con el objeto de no destruir los tóxicos termolábiles presentes
- 2.- Se separó la vaina de la semilla de ambos frutos y se pesaron
- 3.- Se realizó una molienda fina, solamente de la semilla, en un molino Thomas Wiley, con malla de 1 mm de diámetro. La vaina, por sus características mucilaginosas, no se logró moler, ya que el molino con el que se cuenta en el laboratorio no lo permitió, por lo que se cortó en trozos pequeños
- 4.- El estudio incluyó el fruto íntegro (vainas con semillas) únicamente para la prueba de digestibilidad ruminal "in vitro", todas las determinaciones a la semilla y vaina por separado y azúcares reductores y no reductores sólo a la vaina
- 5.- Análisis

¹ El Biólogo José Luis Contreras Jiménez al proporcionarnos los frutos a estudiar, nos informó del grado de madurez (sin embargo, no especifica cómo determinó el grado de madurez, ni indica los días de desarrollo en el que se encontraba el fruto), así como los datos y características de la colecta.
Fruto seco: Aquel que terminó todo su ciclo de desarrollo en la planta, incluyendo desecación natural.
Fruto en madurez fisiológica: Fruto maduro con alta humedad. Este se cortó antes de terminar su ciclo de desarrollo en la planta.

Las determinaciones que se realizaron, son las siguientes:

- 5.1. Análisis proximal
 - 5.1.1. Humedad
 - 5.1.2. Proteína cruda
 - 5.1.3. Grasa cruda
 - 5.1.4. Fibra cruda
 - 5.1.5. Cenizas
 - 5.1.6. Carbohidratos asimilables por diferencia
- 5.2. Proteína verdadera
- 5.3. Determinación de aminoácidos
 - 5.3.1. Hidrólisis ácida (todos los aminoácidos a excepción de triptofano)
 - 5.3.2. Hidrólisis alcalina (para determinación de triptofano)
- 5.4. Determinación de digestibilidad proteínica "in vitro"
- 5.5. Determinación de tóxicos naturales
 - 5.5.1. Hemaglutininas
 - 5.5.2. Inhibidores de tripsina
 - 5.5.3. Glucósidos cianogénicos
 - 5.5.4. Saponinas
 - 5.5.5. Alcaloides
- 5.6. Determinación de digestibilidad ruminal "in vitro" (fruto íntegro)
- 5.7. Determinación de azúcares reductores y no reductores por DNS (vaina)

MÉTODOS

ANÁLISIS PROXIMAL

Se realizó según los métodos descritos en el AOAC (8) y se determinó: humedad, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, cenizas y carbohidratos asimilables por diferencia.

HUMEDAD (8)

Fundamento.

Se denomina humedad a la pérdida de agua de la muestra que se evapora por efecto de la temperatura (60-65 °C) (28).

Material/ Reactivos

- Estufa de vacío MARCA LAB-LINE MOD. 3620
- Desecador
- Balanza analítica
- Charolas de aluminio

Procedimiento

Se pesan 2-5 g de muestra en una charola de aluminio, previamente puesta a peso constante. Se mete la charola a la estufa de vacío a una temperatura de 60-65 °C y se deja hasta que esté a peso constante, es decir, cuando entre las pesadas sucesivas no haya una variación mayor de 0.001 g.

Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

donde:

P_i = peso inicial de la charola con muestra
P_f = peso final de la charola con la muestra seca
m = peso de la muestra en gramos

PROTEINA CRUDA (8)

Fundamento

La determinación se realiza siguiendo el método de Kjeldahl que consiste en la oxidación de la materia orgánica mediante la acción del H₂SO₄, H₃PO₄ y CuSO₄ · 5 H₂O, obteniéndose sulfato ácido de amonio (NH₄HSO₄). Después se realiza una destilación en donde se libera el amoníaco de dicha sal, con una solución concentrada de NaOH (60 %), recibiendo en ácido bórico, con el que forma borato de amonio, el cual se titula con una solución valorada de HCl, determinando así la cantidad que reaccionó con el ácido bórico, lo cual corresponde al porcentaje de nitrógeno de la muestra que al multiplicarse por el factor 6.25 se convierte en porcentaje de proteína cruda (29).

Material/ Reactivos

- Digestor TECATOR MOD AB-20/40
- KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER
- Tubos para digestión de 75 ml MARCA TECATOR
- Balanza analítica
- Mezcla digestiva (a)
- Sulfato de potasio R A
- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Hidróxido de sodio al 60 %
- Acido bórico con indicadores (b)
- Acido clorhídrico valorado 0.01 N

(a) Mezcla digestiva: pesar 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 20 ml de agua destilada, adicionar 50 ml de H_3PO_4 conc. y 430 ml de H_2SO_4 conc. resbalándolo por la pared. Agitar esta mezcla durante 30 min.

(b) Acido bórico con indicadores: pesar 5 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, a continuación adicionar 35 ml de indicador A (100 mg de fenolftaleína disueltos y aforados a 100 ml con alcohol etílico) y 10 ml de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con alcohol etílico), se ajusta el ácido bórico a un color café-rojizo con ácido o alcali según se requiera y se lleva a un volumen final de 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento

Pesar de 20-70 mg de muestra (finamente molida) en un tubo de digestión, agregarle 0.5 g de K_2SO_4 y 3 ml de mezcla digestiva, colocar el tubo en el digestor (previamente calentado a una temperatura de 370 °C) para una predigestión de 15 min. Después de ese tiempo sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar, adicionarle 1.5 ml de H_2O_2 y colocar nuevamente el tubo en el digestor. Se considera que la digestión está completa cuando el contenido del tubo sea traslúcido sin restos de material orgánico, esto es cuando el tubo no muestra manchas o puntos negros, y además la mezcla de digestión sea transparente.

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar y se procede a realizar la destilación y titulación para determinar el contenido de nitrógeno. Una vez fríos los tubos, agregarles 25 ml de agua destilada e inmediatamente después coloque los tubos en la cámara lateral del KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER, colocando primero los blancos y

después las muestras. Al cerrar la puerta del compartimento lateral, la destilación y titulación se efectúan automáticamente. Anote el volumen de HCl gastado, abra la puerta y cambie el tubo

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ N}_2 \times F$$

donde:

P = volumen gastado en la titulación de la muestra (ml)

B = volumen gastado en la titulación del blanco (ml)

N = normalidad del HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra en gramos

F = factor de conversión (6.25)

GRASA CRUDA (8)

Fundamento

Se denomina extracto etéreo o grasa cruda a la cantidad de material extraído de una muestra, extracción que se logra mediante el reflujo con éter, aprovechando la solubilidad de las grasas en éste (29).

Material / Reactivos

- Equipo de extracción Goldfish MARCA LABCONCO
- Balanza analítica
- Desecador
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Vasos de borde esmerilado
- Estufa de vacío LAB-LINE MOD. 3620
- Eter de petróleo R.A.

Procedimiento.

Se pesan de 2-5 g de muestra seca² en un cartucho de celulosa, el cual se introduce en un portadetal de vidrio y se coloca en el compartimento extractor. En el vaso esmerilado se colocan aproximadamente 50 ml de éter de petróleo y se asegura al aparato de extracción con la ayuda del anillo metálico con rosca. Se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso y se calienta poniendo el control de temperatura de la parrilla en low, además se abre la llave del agua para que circule ésta sobre los refrigerantes. Mantener en reflujo durante 8 hrs. Después de este tiempo se baja la parrilla de calentamiento, se deja enfriar un poco, se quita el vaso y se sustituye el portadetal con el cartucho por un colector de vidrio. Se asegura nuevamente el vaso y se calienta para coleccionar el éter. Cuando se haya recuperado el éter y en el vaso quede un residuo, se suspende el calentamiento, se quita el vaso con el extracto etéreo, y se coloca en la estufa de vacío (60-65 °C), aproximadamente por unas dos horas, para eliminar el éter. Se deja enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente, se pesa y por diferencia con el peso del vaso se obtiene la cantidad de grasa cruda, la que se expresa como porcentaje de muestra seca.

Cálculos

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

donde:

Pf = peso del vaso después de la extracción

Po = peso del vaso vacío

m = peso de muestra en gramos

² Es necesario utilizar muestra seca, ya que así se evita el arrastre de componentes solubles en agua debido a la humedad de la muestra, como lo son algunos carbohidratos.

FIBRA CRUDA (8)

Fundamento

La determinación está basada en la obtención de la fracción orgánica indigerible al tratar secuencialmente una muestra desengrasada con ácido sulfúrico y sosa hirviendo al 1.25 %. El compuesto más abundante de este residuo es la celulosa y en menor cantidad hemicelulosas, ligninas y pentosanos

Material / Reactivos

- Aparato de digestión MARCA LABCONCO
- Vasos de Berzelius de 600 ml
- Estufa de vacío LAB-LINE MOD 3620
- Mufla THERMOLYNE MOD 1500
- Crisoles de porcelana
- Filtro californiano (malla de acero inoxidable con poro de 200 mesh)
- Desecador
- Balanza analítica
- H₂SO₄ al 1.25 % (P/V)
- NaOH al 1.25 % (P/V)
- Antiespumante (Emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico R.A

Procedimiento

Se pesan de 3-5 g de muestra desengrasada en un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de asbesto (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. Se adicionan 200 ml de H₂SO₄ al 1.25 % que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante. Se coloca el vaso en el digestor, se sube la parrilla (previamente calentada), y se deja en ebullición durante 30 min. Después de dicho tiempo, se retira el vaso del digestor y se filtra con ayuda de vacío sobre un filtro californiano, el residuo es lavado con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente con 500 ml). Una vez lavado el residuo se transfiere nuevamente al vaso de Berzelius, se le adiciona unas gotas de antiespumante y 200 ml de NaOH al 1.25 % que esté hirviendo, se coloca el vaso en el digestor, se sube la parrilla y se deja en ebullición durante 30 min. Al término de este tiempo se retira el vaso

del digestor y se procede a filtrarlo a través del filtro californiano, se lava el residuo con agua destilada caliente (aproximadamente 500 ml) hasta eliminar el álcali. Por último se adiciona al residuo 25 ml de alcohol etílico. El residuo lavado se pasa a un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante y se coloca en la estufa de vacío (60-65 °C) para ser secado, hasta que esté a peso constante. Una vez secado, el crisol con el residuo es calcinado con ayuda de un mechero antes de meterlo en la mufla. La determinación ha concluido cuando el crisol esté a peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

donde:

- Ps = peso del crisol con el residuo seco
- Pc = peso del crisol con el residuo calcinado
- m = peso de la muestra en gramos

CENIZAS (8)

Fundamento.

Se le llama cenizas al residuo que se obtiene después de la incineración de una muestra. Con ello se logra la destrucción de la materia orgánica y las cenizas comprenden el material inorgánico (minerales), los cuales se pueden cuantificar (28).

Material/ Reactivos

- Mufla THERMOLYNE MOD. 1500
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen
- Desecador
- Crisoles de porcelana

Procedimiento.

Se pesan 2-3 g de muestra en los crisoles previamente puestos a peso constante en una mufla a temperatura entre 500-550 °C. Se calcina la muestra con ayuda de un mechero y se lleva a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500-550 °C. La determinación ha concluido, cuando las cenizas presenten un color blanco o gris homogéneo sin puntos negros y estén a peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

donde:

Pf = peso del crisol con las cenizas

Po = peso del crisol vacío

m = peso de la muestra en gramos

CARBOHIDRATOS ASIMILABLES POR DIFERENCIA

Son los carbohidratos como los azúcares y almidones. Esta determinación es absolutamente teórica, ya que para obtener este dato se procede de la siguiente forma:

$$\% \text{ Carbohidratos asimilables} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ fibra} + \% \text{ grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ cenizas})$$

PROTEINA VERDADERA (30,31,32)

Fundamento.

Se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico y de la proteína soluble con la posterior precipitación de la última con tungstato de sodio. Esto con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno, posteriormente se realiza un microkjeldahl.

Con este método se determina tanto la proteína soluble como la no soluble, ya que en la etapa de filtración ésta es incluida junto con la proteína soluble precipitada.

Material/ Reactivos

- Microdigestor TECATOR MOD. AB-20/40
- Tubos de digestión de 75 ml MARCA TECATOR
- KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER
- Balanza analítica
- Agitador magnético MARCA CORNING
- Papel Whatman Nº 4
- Mezcla digestiva (a)
- H₂O₂ al 30 %
- Ácido bórico con indicadores (b)
- Ácido clorhídrico valorado 0.01 N
- Hidróxido de sodio al 60 %
- Solución precipitante (c)
- Sulfato de potasio R. A.

(a, b) Mezcla digestiva y ácido bórico con indicadores: se preparan de la misma manera que para la determinación de proteína cruda

(c) Solución precipitante: disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de Na₂HPO₄ · 12 H₂O en 20 ml de agua, añadir 22 ml de HCl 2N y mezclar, aforar a 50 ml con agua destilada.

Procedimiento.

Precipitación:

Pesar de 50-100 mg de muestra finamente molida en un vaso de precipitados de 50 ml, agregar 5 ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 min. Agregar 2 ml de la solución precipitante y dejar en reposo por 10 min. Transferir cuantitativamente para su filtración en papel Whatman Nº 4, utilizando 25 ml de agua destilada caliente y ligera succión.

Digestión:

- Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión. Agregar 0.5 g de K₂SO₄, 5 ml de la mezcla digestiva y colocar en el digestor (previamente calentado a 370 °C) por 15 min. Después de ese tiempo, retirar, dejar enfriar y añadir 3 ml de H₂O₂ al 30 %

e introducir nuevamente al digestor. Calentar hasta que la digestión sea completa (aproximadamente 30 min)

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar y se procede a realizar la destilación y titulación para determinar el contenido de nitrógeno. Una vez fríos los tubos, agregarles 25 ml de agua destilada e inmediatamente después coloque los tubos en la cámara lateral del KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER, colocando primero los blancos y después las muestras. Al cerrar la puerta del compartimento lateral, la destilación y titulación se efectúan automáticamente. Anote el volumen de HCl gastado, abra la puerta y cambie el tubo

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(P - B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína verdadera} = \% \text{ N}_2 \times F$$

donde

P = volumen gastado en la titulación de la muestra

B = volumen gastado en la titulación del blanco

N = normalidad

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra en gramos

F = factor de conversión (6.25)

DETERMINACION DE AMINOACIDOS

HIDROLISIS ACIDA

Esta determinación se efectuó en un autoanalizador de aminoácidos TECHNICON MOD. NC-2P, por medio de cromatografía de intercambio iónico, siguiendo la técnica de Lucas, B. y Sotelo, A. (1982) (33).

Fundamento

Se basa en la realización de una hidrólisis ácida (HCl 6 N, t = 4 hrs. , T = 145 °C) de la proteína de la muestra, con la separación de los aminoácidos a través de la cromatografía de intercambio iónico y su cuantificación por medio de una reacción colorimétrica con ninhidrina, con la cual los aminoácidos libres forman un complejo colorido, que es registrado automáticamente

Material/ Reactivos³

- Autoanalizador de aminoácidos MARCA TECHNICON MOD NC-2P
- Digestor MARCA TECATOR MOD AB-20/40
- Potenciómetro MARCA CORNING MOD 10
- Rotavapor MARCA BUCHI MOD R
- Vortex MARCA LAB-LINE INSTRUMENTS, MOD. SUPER MIXER N° 1290
- Adaptador para filtración con jeringa millipore XX30-012-00
- Membrana millipore tipo HATF-02500 (tamaño de poro 0.45 M)
- Microjeringa MARCA HAMILTON MOD 1001-LTN
- Tubos de cultivo de pared gruesa PYREX N° 9826 con tapon de rosca y cubierta interior de teflón
- HCl 6 N
- Metilcelosolve al 50 %
- Amortiguador de acetato de sodio 0.4 N (a)
- Sulfato de hidracina (b)
- Ninhidrina (c)
- Solución lavadora (d)
- Amortiguador de dilución (e)
- Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f)
- NaOH 0.1 N

(a) Amortiguador de acetato de sodio 0.4 N se pesan 1.312 g de acetato de sodio anhidro y se disuelven en 3 litros de agua desionizada, de ser necesario se puede calentar para ayudar a la solubilización. En caso de haber calentado se deja enfriar, y se adicionan lentamente 400 ml de ácido acético glacial, finalmente se afora a 4 litros con agua desionizada. El pH de esta solución deberá ser 5.51 ± 0.02 , ajustar de ser necesario.

(b) Sulfato de hidracina: disolver en agua desionizada 1.049 g de sulfato de hidracina, adicionar 0.4 ml de ácido sulfúrico conc (R A) y 30 ml de solución Brij-35 al 20 %, se lleva

³ Todos los reactivos empleados deben ser reactivos analíticos preparados con agua desionizada

a un volumen final de 4 litros con agua desionizada. A esta solución se le adicionan 0.8 ml de ácido caprílico como conservador.

(c) Ninhidrina: disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metilcelosolve al 50 %, adicionar lentamente 1 litro de amortiguador de acetatos 0.4 N y llevar a un volumen final de 4 litros.

(d) Solución lavadora: se mezclan agua-etanol (3:1 v/v) con hidroquinona al 0.01 % como agente antioxidante.

(e) Amortiguador de dilución: se prepara una solución de HCl 0.2 N (A) y una solución de NaCl 0.2 M (B). Se mezclan 50 ml de A y 33.3 ml de B, se lleva a un volumen final de 200 ml con agua desionizada, se adiciona hidroquinona al 0.01 %. El pH de este amortiguador deberá ser de 1.5 ± 0.05 .

(f) Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución e hidróxido de sodio para lavado de la resina (ver cuadro 1).

Para la preparación de las soluciones amortiguadoras, se realiza lo siguiente en un recipiente se agregan todos los reactivos sólidos, se disuelven con la mitad del volumen de agua a preparar, enseguida se adicionan todos los reactivos líquidos, a excepción del ácido caprílico, se mezclan bien y se adiciona agua hasta un volumen de 900 ml. Se ajusta el pH de cada solución, empleando un potenciómetro de escala expandida. Aforar a un litro con agua desionizada, filtrar a través de papel filtro Whatman N° 52 y adicionar al recipiente final el ácido caprílico correspondiente para su conservación.

Cuadro 1. PREPARACION DE AMORTIGUADORES

Reactivo	Buffer 1 Regeneración de la resina	Buffer 2 Elución de aminoácidos	Buffer 3 Elución de a a básicos	NaOH 0.2 N Lavado de resina
Acetato de sodio (anhidro)	41 g	50 g	870 g	-----
Acido acético (glacial)	200 ml	150 ml	200 ml	-----
Sol. acetato de zinc 0.5 M	-----	0.6 ml	2.0 ml	-----
Alcohol etílico (absoluto)	780 ml	780 ml	-----	-----
Alcohol bencílico	-----	-----	110 ml	-----
Hidrogunona	0.11 g	0.11 g	-----	-----
Sol. Brij-35 al 20 %	80 ml	80 ml	80 ml	-----
EDTA sal disódica	0.1 g	-----	-----	-----
Hidróxido de sodio (lentejas)	-----	-----	-----	-----
Acido caprílico	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	-----
Agua desionizada (< 1 ppm Na)	1.0 l	1.0 l	1.0 l	1.0 l
pH	4.00 ± 0.02	4.10 ± 0.02	5.30 ± 0.02	-----
Conc. Na ⁺	0.05 M	0.05 M	1.06 M	0.2 M
Conc. Zn ⁺⁺	0.00 M	0.0003 M	0.001 M	0.0 M

Buffer 2: Elución de aminoácidos ácidos y neutros

Procedimiento

Pesar en un tubo de cultivo la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada (si presenta un contenido de grasa superior al 5 %) de acuerdo al contenido de proteína determinado (A) Se adicionan los ml de HCl calculados (B), para su hidrólisis completa. Lo anterior puede ser determinado de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$A = \frac{0.05 \times 100}{\% P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\% P}$$

donde:

A = cantidad de muestra en gramos

B = ml de HCl 6 N

% P = porcentaje de proteína en la muestra

Se insufla al tubo nitrógeno durante 30 seg, se cierra bien el tubo con el tapón de rosca, y se coloca el tubo en el digestor (previamente calentado a $145\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) durante 4 horas. Transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo y se transvasa cuantitativamente a un matraz de bola de 100 ml, se enjuaga el tubo con agua desionizada tibia y se incorpora este volumen al hidrolizado, se adicionan 5 ml del estándar interno de β -amino-propionitrilo 5 mM al matraz, se trabaja el matraz en el rotavapor llevándolo a sequedad, se vuelve a lavar el tubo de hidrólisis con agua caliente y los lavados se pasan al matraz, el cual se trabaja nuevamente en el rotavapor hasta sequedad. Se hace un último lavado con solución lavadora (agua-etanol), se concentra el hidrolizado a un volumen menor de 25ml. El concentrado que queda en el matraz se filtra a través de papel filtro (Whatman 52) hasta obtener un volumen de 20 ml aproximadamente, se ajusta el pH del hidrolizado a un pH de 6.8 ± 0.2 , posteriormente se filtra el hidrolizado y se afora a 25ml. con agua desionizada. En caso de que la muestra no sea usada enseguida es conveniente congelarla.

Para inyectar el anterior hidrolizado en el autoanализador, tomar un ml de la muestra y un ml del buffer de dilución pH =1.5, se homogenizan, se toma el volumen con una jeringa eliminando el aire, quitar la aguja y colocar el dispositivo especial para filtrar a través de papel millipore. Con una microjeringa se inyectan de 100-200 μl del filtrado.

Las condiciones físicas y el programa utilizado en el presente análisis de aminoácidos, es el siguiente:

Tamaño de la columna	470 x 4 mm.
Altura de empaque de la columna	420 mm \pm 5
Temperatura de la columna	60°C
Velocidad de flujo de los amortiguadores	0.6 ml / min
Velocidad de flujo de la ninhidrina	0.8 ml / min.
Velocidad de flujo del sulfato de hidracina	0.6 ml / min.
Velocidad de flujo del nitrógeno	0.32 ml / min.
Velocidad de flujo sobre el colorímetro	0.6 ml / min
Temperatura del baño de reacción	89° C \pm 0.5
Sensibilidad del registrador	2.5 U.
Velocidad de la caría	3.0 mm / min.

Programa

Paso	Tiempo (min)	Caracterización
1	2	Buffer N° 1, metilcelosolve
2	6	Buffer N° 2, metilcelosolve
3	70	Buffer N° 2, ninhidrina, registrador
4	80	Buffer N° 3, ninhidrina, registrador
5	8	NaOH 0.2 N, ninhidrina, registrador
6	2	NaOH 0.2 N, metilcelosolve, registrador
7	6	Buffer N° 1, metilcelosolve, registrador
8	2	Buffer N° 1, metilcelosolve, apaga registrador
9	16	NaOH 0.2 N, metilcelosolve
10	30	Buffer N° 1, metilcelosolve

Nota 1: En todos los pasos hay flujo de sulfato de hidracina.

Nota 2: Antes de correr las muestras se debe de correr un estándar de aminoácidos de concentración conocida, ya que sobre éste se basarán los cálculos, mediante el área de cada uno de los aminoácidos.

Cálculos

La solución estándar de aminoácidos contiene, en este caso, 0.025 micromoles de cada uno. Tanto en el estándar como en cada corrida del hidrolizado se debe inyectar una cantidad constante del estándar interno β -amino-propionitrilo, para poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de β -amino-propionitrilo de cada uno de los aminoácidos

$$ENaa = \frac{AN \text{ std}}{AA \text{ std}}$$

donde

EN aa = equivalentes de β -amino-propionitrilo del aminoácido correspondiente

AN std = área de β -amino-propionitrilo del estándar

AA std. = área del aminoácido correspondiente del estándar

Del aminograma del hidrolizado de la muestra se calcula el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos, así como el área de β -amino-propionitrilo. Para lo anterior, es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, para evitar trabajar con la línea base que en algunos casos es muy irregular. A continuación se muestran los cálculos que se deben desarrollar para cada uno de los aminoácidos, en donde se expresa su contenido en mg del aminoácido por gramo de nitrógeno de la muestra.

$$Aaa = Baa \times haa$$

$$g. a.a. / 16gN = \frac{Aaa \times ENaa \times \mu Maa \times PMaa \times A}{ANm \times a \times MGNm} \times F$$

donde:

Aaa = área del aminoácido de la muestra

Baa = base a la mitad del pico

haa = altura del pico desde la línea base

ENaa = equivalentes de β -amino-propionitrilo del aminoácido correspondiente
 μ Maa = micromoles del aminoácido en el estándar
PMaa = peso molecular del aminoácido
A = aforo al que se llevó el hidrolizado (ml)
ANm = área de β -amino-propionitrilo en la muestra
a = alícuota inyectada (ml)
MGNm = mg de nitrógeno en la muestra hidrolizada
F = factor de transformación = 16 / 1000

DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO (34.35)

HIDROLISIS ALCALINA

Fundamento

Esta determinación se basa en la realización de una hidrólisis alcalina de las proteínas con LiOH 4N a 145 °C, ya que la hidrólisis ácida (utilizada comúnmente para la determinación de la mayoría de los aminoácidos de una proteína) destruye al triptofano. De esta manera, una vez liberado el triptofano se somete a una reacción con p-dimetil-amino-benzaldehído (DMAB) en medio ácido, con lo que se producirá un derivado colorido, proporcional al contenido de este aminoácido

Material / Reactivos

- Digestor MARCA TECATOR MOD AB-20/40
- Tubos de cultivo PYREX de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón No. 9826
- Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER MOD 340
- Potenciómetro CORNING MOD 10
- Hidróxido de litio 4N
- Solución lavadora agua / etanol (3:1)
- Ácido orto-fosfórico concentrado
- Solución estándar de triptofano (50 μ g / ml)
- Ácido clorhídrico concentrado
- Solución de p-dimetil-amino-benzaldehído al 0.5% en HCl conc.
- Nitrito de sodio al 0.2%

Procedimiento

Se pesa la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada en un tubo de pared gruesa de acuerdo al contenido de proteína determinado, haciendo la siguiente relación:

$$\text{mg de muestra} = \frac{100 \times 100}{\% \text{ proteína}}$$

Adicionar con mucho cuidado la cantidad de álcali necesaria, teniendo la precaución de no salpicar la muestra en la pared del tubo

$$\text{ml de álcali} = \frac{4 \times 100}{\% \text{ proteína}}$$

Se insufla nitrógeno durante 30 seg aproximadamente, se cierra el tubo perfectamente y se coloca en el digestor que debe estar a 145 °C El tiempo de hidrólisis depende del contenido de proteína

% de Proteína	Tiempo de hidrólisis
< 35	8 horas
35 - 64	6 horas
> 64	4 horas

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se saca el tubo, se deja enfriar y se transvasa el contenido a un vaso de precipitados enjuagando el tubo con 20 ml de sol lavadora Se neutraliza el hidrolizado con ácido ortofosfórico y se filtra sobre papel de filtración rápida en un buchner con ayuda de vacío lavando el residuo con sol. lavadora caliente. Al filtrado se le mide el pH nuevamente, se afora 50ml.

Se toman 3 alícuotas de 2 ml cada una del hidrolizado (uno de los tubos nos servirá como blanco). Adicionar a uno de los tubos 7.5ml de HCl conc , mientras que a los otros 2 se les adiciona 7.5ml p-dimetil-aminobenzaldehído, se agitan y se dejan en

reposito 15 min. en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo se les adiciona 0.5 ml de nitrato de sodio, se agita nuevamente y se deja en la oscuridad por 15 min. más para que desarrolle la coloración. Se lee en el espectrofotómetro a 590 nm., usando el tubo del blanco para ajustar a cero el espectrofotómetro.

Al mismo tiempo se corre una curva estándar de triptofano de 0 a 100 µg. que se prepara de la siguiente manera

ml. sol. estándar de triptofano 50 µg/ ml	ml de agua	µg de triptofano
0.0	2.0	0.0
0.4	1.6	20.0
0.8	1.2	40.0
1.0	1.0	50.0
1.6	0.4	80.0
2.0	0.0	100.0

Cálculos

Se traza la curva estándar de absorbancia vs. µg de triptofano y se lee en ésta los valores de µg de triptofano de cada muestra. El valor que se tenga se expresa en gramos de triptofano por 100 gramos de muestra, para lo cual se tiene la siguiente fórmula:

$$\text{g. triptofano} / 100 \text{ g muestra} = \frac{t \times A \times 10}{a \times m \times \%P}$$

donde:

t = µg de triptofano obtenido por interpolación

A = aforo

a = alicuota

m = miligramos de muestra

%P = porcentaje de proteína en la muestra

DETERMINACION DE DIGESTIBILIDAD PROTEÍNICA "IN VITRO"

Fundamento.

La técnica está basada en la simulación de la digestión. Para ello se pone en contacto la muestra con pepsina en medio ácido y posteriormente con pancreatina, realizándose así una digestión enzimática semejante a la que es llevada a cabo en los monogástricos. (36)

Material/ Reactivos

- Baño de agua con agitación y control térmico LAB-LINE INSTRUMENTS
- Tubos de cultivo N° 9826
- Digestor TECATOR MOD. AB-20/40
- KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER
- Tubos para digestión de 75 ml MARCA TECATOR
- Balanza analítica
- Pepsina 0.3 % en HCl 0.1 N
- Pancreatina al 4 % en buffer de fosfatos pH= 8 ± 0.1
- NaOH 0.2 N
- Papel Whatman N° 542
- Mezcla digestiva (a)
- Sulfato de potasio R A
- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Hidróxido de sodio al 60 %
- Acido bórico con indicadores (b)
- Acido clorhídrico valorado 0.001 N
- Buffer de fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 (c)

(a) Mezcla digestiva. pesar 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 20 ml de agua destilada, adicionar 50 ml de H_3PO_4 conc. y 430 ml de H_2SO_4 conc. resbalándolo por la pared. Agitar esta mezcla durante 30 min.

(b) Acido bórico con indicadores: pesar 5 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, a continuación adicionar 35 ml de indicador A (100 mg de fenolftaleína disueltos y aforados a 100 ml con alcohol etílico) y 10 ml de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con alcohol etílico), se ajusta el ácido bórico a un color café-rojizo con ácido ó álcali según se requiera y se lleva a un volumen final de 2000 ml con agua destilada.

(c) Buffer de fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 : se preparan 2 soluciones:

A: Pesar 27.8 g de fosfato monobásico y disolver en un litro, la solución resultante es 0.2 M.

B: Pesar 53.65 g de fosfato dibásico heptahidratado y llevar a un litro, la solución resultante es 0.2 M.
Tomar 5.3 ml de A + 94.7 ml de B, llevar a 190 ml, ajustar el pH y aforar.

Procedimiento

Pesar aproximadamente 0.750 g de proteína (máximo 2g de muestra) Agregar 20 ml de pepsina al 0.3 % en HCl 0.1 N Dejar en agitación a 37° C por 3 horas Adicionar 10 ml. de NaOH 0.2 N (para neutralizar) Agregar 20 ml de pancreatina al 4 % en buffer de fosfatos pH = 8 ± 0.1 Dejar a 37° C por 24 hrs con agitación Por último filtrar cuantitativamente a través de papel Whatman 542, utilizando 25 ml de agua destilada caliente y con ayuda de un ligero vacío Determinar las proteínas del residuo por el método de Kjeldahl (como se realizó para la determinación de proteína cruda, solamente que aquí es necesario agregar 9 ml de mezcla digestiva) De manera simultánea se corren blancos (todos los reactivos excepto la muestra)

Cálculos

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\% \text{ P.T. muestra} - \% \text{ P.T. residuo}}{\% \text{ P.T. muestra}} \times 100$$

donde:

P.T. muestra = proteína total de la muestra

P.T. residuo = proteína total del residuo

COMPONENTES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS

HEMAGLUTININAS

Se realizó de acuerdo al método descrito por Jaffé y colaboradores (1974) (37), con ciertas modificaciones y usando eritrocitos de Hamster sensibilizados con pronasa (Lucas, B; Sotelo, A.) (38).

Fundamento.

Esta es una prueba semicuantitativa que se basa en la capacidad aglutinante de las hemaglutininas hacia los eritrocitos. Se utiliza una técnica de microtitulación que se basa en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se observa visualmente

Material/ Reactivos

- Centrifuga MARCA DYNAC
- Tubos de centrifuga de 15 ml graduados
- Agitador magnético con tacómetro MARCA THERMOLINE
- Incubadora MARCA BLUE-M
- Espectrofotómetro COLEMAN JUNIOR II-A
- Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Placas para aglutinación tipo "V"
- Sangre de Hamster sensibilizada
- Solución salina al 1 %
- Solución salina al 0.9 %
- Solución de pronasa al 0.2 % en solución salina (pronasa de S. grisens SIGMA P-5005)
- Solución anticoagulante (heparina)
- Tripsina de páncreas porcina (SIGMA T-8128)

Procedimiento

Preparación del extracto: Pesar 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (si presenta un contenido de grasa mayor al 5 % y suspenderla en 10 ml de solución salina al 1 %. Agitar mecánicamente por 2 horas a 300 rpm. Transcurrido este tiempo el extracto se transvasa a un tubo de centrifuga y se centrifuga a 1400 rpm durante 15 min., el sobrenadante se filtra a través de papel filtro con vacío. Por último, aforar a 10 ml. con solución salina al 1 %.

Preparación de la sangre

Lavado La sangre de Hamster ⁴se transvasa a tubos de centrifuga para su lavado con solución salina al 0.9 %. La relación sangre sol salina es aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos. Realizar el lavado 3 veces. Después del último lavado diluir al 4 % el paquete de glóbulos rojos, para lo cual se agregan por cada ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9 %.

Sensibilización Agregar 1 ml de pronasa al 0.2 %, por cada 10 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 4 % y colocarlos en la incubadora por espacio de una hora a 37 ° C. Después centrifugar para eliminar la enzima, dando 3 lavados con sol salina al 0.9 % (en una relación de 1:5) durante 10 min a 1500 rpm. Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se diluyen adicionando 19 ml de sol salina por cada ml de eritrocitos sensibilizados. Se toman 0.5 ml de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y se agregan 2 ml de sol salina al 0.9 %. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando como blanco sol salina. El % de transmitancia al que se deberá de ajustar la sangre es de 25 % \pm 2, en caso de no obtener el % de transmitancia indicado, se harán diluciones según sea conveniente.

Preparación de las placas En una placa tipo "V" se coloca con un pipeteador de gota, una gota (50 μ l) de solución salina al 0.9 % en cada pozo, evitando tocar las paredes del pozo. Agregar con un microdilutor 50 microlitros del extracto problema en el primer pozo, agitar, tomar de este pozo una alícuota y diluir, agitando sucesivamente en los pozos siguientes. Por último con un pipeteador de gota colocar en cada pozo 50 microlitros de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Rotar la placa en forma circular y llevar a la incubadora a 37 °C por espacio de una hora. Una vez transcurrido el tiempo se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura, observando a simple vista si se produce aglutinación. Si se presenta aglutinación, la prueba se considera positiva y se reporta la máxima dilución donde presenta aglutinación (título).

⁴ Se trabajó con sangre de Hamster, ya que es la más sensible para la detección de hemaglutininas.

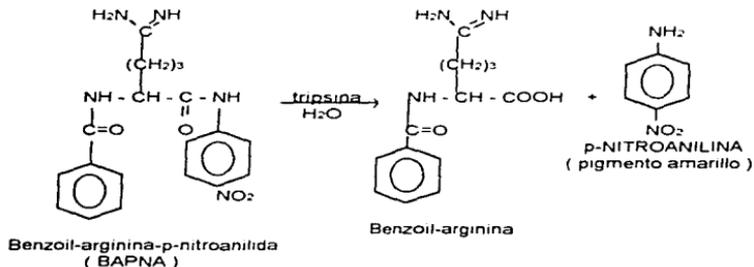
INHIBIDORES DE TRIPSINA

La determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Kakade y colaboradores (39)

Fundamento

La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estándar de tripsina (40 mg/ ml) Posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente, usando un sustrato sintético benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual producirá una coloración amarilla que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina en la muestra.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente



Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de la mezcla de reacción descritas por

Kakade y colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina es expresada en términos de unidades de tripsina inhibida (U T I)

Material / Reactivos

Potenciómetro CORNING MOD 10
Parrilla con agitación magnética THERMOLYNE MOD SP-13025
Baño maría GRANT MOD SE-10
Mezclador de tubos LAB-LINE MOD SUPER-MIXER
Espectrofotómetro SEQUOIA-TUNER MOD 340
NaOH 0 01N
Solución amortiguadora de TRIS pH 8 2 y 0 05M (a)
Solución BAPNA (b)
Ácido acético al 30%
Solución estándar de tripsina (c)
HCl 0 001N

- (a) Solución amortiguadora de TRIS pH 8 2 y 0 05M pesar 6 05g de Tris (hidroximetil-amino-metano) y 2 94g CaCl₂ · 2 H₂O, disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 2 y aforar a 1 litro
- (b) Solución BAPNA disolver 100 mg de BAPNA (benzoiL-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl) en 2 5ml de dimetil-sulfóxido, la disolución es más rápida si se calienta en baño de agua a 37°C, se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado a 37°C Esta solución se prepara el mismo día de su uso y se mantiene a 37°C
- (c) Solución estándar de tripsina pesar con mucha exactitud 4mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200ml de HCl 0 001N Esta solución contiene 20µg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad

Procedimiento

Preparación del extracto Pesar 1 gramo de muestra finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) en un vaso de precipitados y adicionar 45ml de NaOH 0 01N, ajustar el pH de la suspensión a $9 6 \pm 0 2$ y aforar a 50 ml con NaOH 0 01N. Transferir a un vaso de precipitados y agitar mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 horas y media a 300 r p m. Después de dicho tiempo retirar el magneto y dejar reposar el extracto durante media hora. Decantar el sobrenadante y

eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60 %, esto es indispensable para reducir nuestra desviación estándar relativa.

Determinación de la actividad La siguiente tabla nos muestra en forma esquemática la serie de tubos que se deben preparar para poder determinar la actividad inhibitoria de nuestra muestra.

Tubo	ml ext	ml agua	ml Tripsina		ml BAPNA		ml Ac
B1	1.8	0.2	2.0 + 1.0 Ac	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{37^\circ \text{ C}}$	5.0	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{\text{cronómetro}}$	-
1	1.8	0.2	2.0		5.0		1.0
B2	1.4	0.6	2.0 + 1.0 Ac	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{37^\circ \text{ C}}$	5.0	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{\text{cronómetro}}$	-
2	1.4	0.6	2.0		5.0		1.0
B3	1.0	1.0	2.0 + 1.0 Ac	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{37^\circ \text{ C}}$	5.0	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{\text{cronómetro}}$	-
3	1.0	1.0	2.0		5.0		1.0
B4	0.6	1.4	2.0 + 1.0 Ac	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{37^\circ \text{ C}}$	5.0	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{\text{cronómetro}}$	-
4	0.6	1.4	2.0		5.0		1.0
BR	0.0	2.0	2.0 + 1.0 Ac	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{37^\circ \text{ C}}$	5.0	$\xrightarrow[10 \text{ min}]{\text{cronómetro}}$	-
R	0.0	2.0	2.0		5.0		1.0

Ac = ácido acético al 30 %.

Nota: La solución de tripsina y el BAPNA deben estar a 37°C antes de usarse.

Agregar la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0ml con agua destilada. Al adicionar a los tubos cada reactivo, agitar con el vortex. La adición del ácido acético es para detener la reacción.

Debe controlarse estrictamente el tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA para lo cual puede emplearse un cronómetro.

Es frecuente la formación de precipitado o el enturbiamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min y después se filtra primero el sobrenadante y posteriormente la porción residual a través de papel Whatman #1. El filtrado deberá estar translúcido.

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto ajustar el aparato a 100 % de transmitancia con su respectivo blanco.

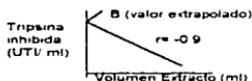
Cálculos

La lectura en absorbancia (A), la podemos pasar directamente a unidades de tripsina (UT)

$$UT = A \times 100$$

Ya que tenemos una serie de alícuotas del extracto, tendremos a su vez una serie de valores UT, los cuales al restar este valor al dato de referencia, obtendremos los valores de tripsina inhibida (UTI) y por consiguiente se puede calcular el valor de tripsina inhibida por mililitro (UTI/ ml) de cada una de las alícuotas

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (UTI/ ml) como función de la alícuota del extracto se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria



Este dato extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real (si se refiere uno al inhibidor de soya de tipo Kunitz)

Cuando no se obtiene una correlación lineal satisfactoria se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas, reportado en términos de UTI/ ml

Se reportan unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra.

$$UT/mg \text{ muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

donde:

B = valor extrapolado o promedio en UT/ml

F = factor de dilución, lo cual depende de las diluciones realizadas. Cuando se trabaja extracto directo F = 1

$$F = \frac{A1}{a1} \times \frac{A2}{a2}$$

Ai = aforo (s)

ai = alícuota (s)

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS (40)

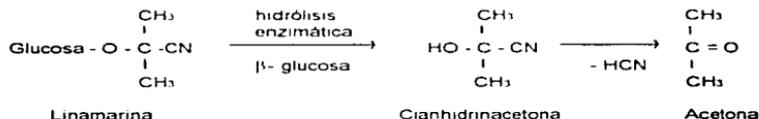
Fundamento

Este método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio ácido cianhídrico



Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática adicional (por medio de la adición de β-glucosidasa)

del correspondiente glucósido cianogénico. Para poder cuantificar el HCN liberado es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. Con el método anterior, se pueden detectar hasta cantidades del orden de 5 microgramos de HCN que equivalen a 46 microgramos de glucósido cianogénico (referido a linamarina) (11).



Material /Reactivos

- Baño de agua con agitación MARCA LAB-LINE INSTRUMENTS
- Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX No 9825
- Incubadora MARCA BLUE-M
- Congelador
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER MOD 340
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (a)
- Papel indicador HCN (b)
- Solución de β -glucosidasa con activador (c)
- Solución de KCN equivalente a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24.1 mg KCN/100 ml)
- HCl 0.5 N
- Buffer de fosfatos pH = 7.00
- Fécula de maíz comercial

(a) Solución de picrato de sodio alcalinizada: disolver en 400 ml de agua destilada 2.5 g de ácido picrico y a continuación 12.5 g de carbonato de sodio, llevar a un volumen de 500 ml.

(b) Papel indicador HCN: empapar en la solución de picrato de sodio papel Whatman del No. 2, dejar escurrir y colocar en una estufa a 55-60° C a secar por espacio de 30 minutos. A continuación se cortan tiras bien medidas de 2 x 10 cm.

(c) Solución de β -glucosidasa con activador: disolver en buffer de fosfatos pH = 7.00, 0.25 g de β -glucosidasa, agitando suavemente. Una vez disuelta la enzima adicionar 1.7 g de

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

nitrato de sodio que actúa como activador de dicha enzima. Llevar a un volumen de 250 ml. con el mismo buffer

Procedimiento

Determinación cualitativa Colocar en el tubo de cultivo 200-500 mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos. A continuación adicionar 5 ml de la solución de β -glucosidasa (fría) se homogeniza y se procede a colocar la tira de papel humedecida (aproximadamente con 9 gotas de agua) en la boca del tubo y se cierra herméticamente con el tapón de rosca. Colocar en el baño maría que debe estar a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas. Al final de dicho tiempo, se saca el tubo y se coloca en el congelador por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se saca el tubo y se destapa para adicionarle 1 ml de HCl 0.5 N (frío), se vuelve a cerrar y se homogeniza, teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador. Colocar en la incubadora durante 15 min a 60°C . Pasando este tiempo sacar el tubo de la incubadora y realizar visualmente la detección cualitativa. Aquellos tubos que muestren coloración café-rojiza se consideran positivos y se continúa con su detección cuantitativa.

Determinación cuantitativa Se procede a recuperar el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo, se le adicionan 20 ml de agua destilada, se tapa y se agita vigorosamente de 2-5 minutos, con el fin de extraer el pigmento de isopropurina del papel indicador en el agua; se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos del papel, por una simple filtración con papel de filtración rápida.

Cuando sea necesario se puede hacer otra adición de agua, para extraer por completo el pigmento. La solución filtrada se lee en el espectrofotómetro a 520 nm, previamente ajustado a 100 % de transmitancia con el blanco correspondiente (todos los reactivos excepto la muestra).

Curva estándar. Para su elaboración, se usa una solución de KCN cuya concentración equivale a 100 microgramos HCN/ ml., además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberado, se introduce en la curva estándar la llamada matriz alimenticia, en este caso es fécula de maíz comercial

ml. sol. estándar	matriz alimenticia (mg.)	beta glucosidasa (ml.)	$\xrightarrow[4 \text{ hrs}]{40^{\circ} \text{ C}}$	HCl (0.5 N) (frío) (ml.)
0.0	500	5.0		1.0
0.05	500	5.0		1.0
0.1	500	5.0		1.0
0.2	500	5.0		1.0
0.4	500	5.0		1.0
0.6	500	5.0		1.0

La curva estándar va de 5 a 60 microgramos de HCN, ya que fue el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs D O. ($r = 0.99$), en donde se cumple la Ley de Lambert Beer.

Cálculos

Una vez que se tiene elaborada la curva estándar, el valor obtenido de absorbancia de la muestra se puede interpolar o calcular de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal para obtener el contenido de HCN (x) en la muestra

Para tener el resultado en mg de HCN/ 100 g de muestra se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{mg. HCN/ 100 g muestra} = \frac{X \times D \times 100}{M}$$

donde:

X = microgramos de HCN

D = No. de veces de adición de 20 ml. de agua

M = mg. de muestra

DETERMINACION DE SAPONINAS (41)

Fundamento

Se realizó una prueba semicuantitativa, basada en la propiedad que tienen las saponinas de hemolizar eritrocitos de conejo.

Se realiza mediante un método de microtitulación que consiste en hacer una serie de diluciones seriadas de un extracto metanólico de la muestra que se pone en contacto con los eritrocitos sensibilizados, en el cual se determina el punto final por medio de una estimación visual de hemólisis de los globulos rojos en estudio. Se reporta con respecto a una mezcla estándar de referencia de saponinas

Material/ Reactivos

- Equipo para extracción de grasas Goldfish MARCA LABCONCO
- Rotavapor MARCA BUCHI MOD R
- Incubadora BLUE-M
- Placas para hemólisis tipo "U"
- Microdilutores de 50 μ l MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Pipeteadores de gota de 50 μ l
- Eter de petróleo R A
- Metanol al 85 % R A
- Solución salina al 0.9 %
- Eritrocitos de conejo sensibilizados (a)
- Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina al 0.9 % (b)
- Tripsina de páncreas porcino (Sigma T-8128) al 0.1 % en solución salina al 0.9 %

(a) Eritrocitos de conejo sensibilizados: la preparación de la sangre de conejo se hace de manera similar a la realizada en la determinación de hemaglutininas. Con la excepción de que ahora la enzima empleada para la sensibilización es la tripsina al 1 % en sol. salina al 0.9 %.

(b) Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina al 0.9 %: el estándar es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina de tipo esteroideal) de la casa SIGMA y un extracto de quillaja (saponina de tipo triterpenoide) de la casa BDH.

Procedimiento.

Preparación del extracto: Se pesan 7 g de muestra desengrasada en un cartucho de celulosa y se coloca en el extractor de grasas Goldfish. Se realiza una extracción metanólica con 50 ml al 85 %, durante 2 hrs., colocando el control de temperatura en high. El extracto metanólico se transvasa a un matraz de bola de 100 ml y con ayuda de un rotavapor se elimina el metanol hasta sequedad. El residuo se resuspende en solución salina al 0.9 %, se filtra a través de papel Whatman N° 4 y el filtrado se afora a 100 ml con solución salina al 0.9 %.

Preparación de las placas: Se hace en forma similar a la realizada en la determinación de hemaglutininas, sólo que en esta ocasión se utilizan placas tipo "U" para hemólisis.

Se consideran positivos aquellos pozos que se observen traslúcidos (hemólisis) y negativos aquellos pozos donde se presente sedimentación de eritrocitos en el centro del pozo.

Cálculos

Se reporta con respecto a una mezcla estándar de referencia de saponinas, tomando la máxima dilución donde se presente hemólisis (título).

Dado a que se realiza una dilución seriada, se tiene la siguiente fórmula:

$$\text{mg de muestra} = \frac{\text{concentración del extracto}}{2^t}$$

t = título de hemólisis

Se reportan unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./ mg de muestra). Por definición, un microgramo del estándar de saponinas es equivalente a 10 unidades hemolíticas (U.H).

DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

Esta determinación se realizó en base a los métodos de Abisch, E. y Reichstein, T (42).

Fundamento.

Consiste en el ensayo de dos fracciones extraídas. una con cloroformo y otra con cloroformo-etanol, de un extracto metanólico de la muestra problema, con siete reactivos para alcaloides: Mayer, Wagner, Dragendorff, Sonnenschein, Hager, Scheibler y ácido silicotungsténico.

La reacción se determina por la formación de precipitado que puede ser abundante o nulo, de acuerdo a la cantidad de alcaloides presentes en la muestra.

Material/ Reactivos

- Parrilla de agitación CORNING MOD PC-351
- Embudo de separación de 125 ml.
- Rotavapor MARCA BUCHI MOD. R
- Papel filtro Whatman No. 1
- HNO_3 al 30 %
- H_2SO_4 al 1 %
- HCl al 1 %
- Metanol (RA)
- Cloroformo (RA)
- Etanol (RA)
- Amoniaco concentrado (aproximadamente 25 %)
- Sulfato de sodio anhidro (RA)
- Reactivo de Mayer (a)
- Reactivo de Wagner (b)
- Reactivo de Dragendorff (c)
- Reactivo de Sonnenschein (d)
- Reactivo de Hager (e)
- Reactivo de Scheibler (f)
- Reactivo ácido silicotungsténico (g)

(a) Reactivo de Mayer: disolver 1,36 g de HgCl_2 en 60 ml. de agua y 5 g. de KI en 10 ml. de agua. Se mezclan las dos soluciones y se añoran a 100 ml. con agua destilada.

- (b) Reactivo de Wagner: disolver 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 ml de agua, aforar a 100 ml con agua destilada.
- (c) Reactivo de Dragendorff: disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 hrs. Se decanta la solución y se afora con agua destilada a 100 ml.
- (d) Reactivo de Sonnenschein: a 100 ml de solución caliente de molibdato de amonio (43 g / 100 ml), agregar 100 ml de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g / 100 ml). A esta solución clara se le adicionan 10 ml de HNO_3 concentrado. El precipitado amarillo que se forma se deja reposar durante una hora. Decantar el líquido sobrenadante y desecharlo, suspender el precipitado amarillo en 50 ml de agua destilada y calentar. A la suspensión caliente adicionar 100 ml de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g / 100 ml). Debe formarse una solución clara, evaporar esta solución en una cápsula de porcelana a sequedad, flamear la superficie del polvo con el mechero hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Pesar el polvo, que debe ser aproximadamente 30 g. Disolverlo con 200 ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar 50 ml de HNO_3 concentrado, agregar agua destilada aforando a 300 ml. De esta manera, la solución resultante debe ser amarilla, clara de ácido fosfomolibdico.
- (e) Reactivo de Hager: preparar una solución acuosa saturada de ácido picrico (2 g / 100 ml).
- (f) Reactivo de Scheibler: disolver 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico en 50 ml de agua. La solución se acidula con HNO_3 .
- (g) Reactivo ácido silicotungsténico: disolver 5 g de ácido silicotungstico en H_2SO_4 6 N, necesario para preparar 100 ml de solución.

Procedimiento

Se colocan de 2-4 g de muestra seca y molida en un vaso de precipitados, agregar 40 ml de metanol y dejar en reposo toda la noche. Calentar 4 horas a 50° C (agitando intermurmientemente). Filtrar la mezcla y lavar el residuo con 20 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1 %, agitar la mezcla y filtrar. Lavar el residuo con 8 ml de HCl al 1 %, combinar los extractos filtrados y alcalinizar con amoníaco concentrado. Extraer con 3 porciones de 20 ml cada una de cloroformo, dando la fracción A.

A la solución acuosa residual de la extracción anterior se procede a extraerla con una mezcla de cloroformo-etanol (3.3 v/v) con tres porciones de 20 ml cada una, con lo que se obtiene la fracción B. Agregar sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, las dos fracciones A y B, son evaporadas en un rotavapor por separado, y el residuo es resuspendido con 1.5 ml de HCl al 1 % y 1.5 ml de cloroformo, se agita vigorosamente y

la fase acuosa de cada fracción es pipeteada y filtrada a través de algodón y dividido en 7 porciones; estas alícuotas son ensayadas con los 7 reactivos para alcaloides

1.- MAYER	precipitado blanco
2.- WAGNER	precipitado color marrón
3.- DRAGENDORFF	precipitado anaranjado
4.- SONNENSCHNEIN	precipitado color amarillo
5.- HAGER	precipitado color amarillo
6.- SCHEIBLER	precipitado blanco-grisáceo
7.- ACIDO SILICOTUNGSTENICO	precipitado blanco-grisáceo

Nota: El reactivo sólo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl ó H₂SO₄ diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol porque disuelven el precipitado. Solamente deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

Interpretación de resultados: Debido a la frecuencia de reacciones falsas-positivas con los reactivos comunes de alcaloides, sólo se considera como positiva la presencia de este tipo de compuestos, cuando cualquiera de las fracciones A y B den reacción positiva con los 7 reactivos antes mencionados. Hay que mencionar, que para el caso del reactivo de Hager, debido a su baja sensibilidad, cuando da reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar, considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

DIGESTIBILIDAD RUMINAL "IN VITRO"

Fundamento

La técnica está basada en la simulación de la digestión de los rumiantes. Para ello se pone en contacto la muestra con líquido ruminal, de esta forma se desarrolla una

digestión bacteriana y posteriormente con pepsina en medio ácido se realiza una digestión enzimática (43).

Materia/Reactivos

- Baño de agua con agitación y control térmico LAB-LINE INSTRUMENTS
- Tubos de cultivo N° 9826
- Solución amortiguadora de McDougall (a)
- Solución de pepsina ácida (pepsina con actividad 1 10 000) (b)
- Solución amortiguadora-líquido ruminal (c)
- HCl 6N
- Solución de MgCl₂ al 4 %
- Solución de HCl 3N

(a) Solución amortiguadora de McDougall se preparan las siguientes soluciones:

Solución 1: Na₂HPO₄ 3 7g, NaHCO₃ 9 8 g, agua desionizada 40° C y aforar a 1000 ml

Solución 2: NaCl 4 7 g, KCl 5 7 g, CaCl₂ 0 4 g, MgCl₂ 0 6 g, agua desionizada 100 ml.

La solución amortiguadora se prepara adicionando 10 ml de la solución 2 a 1 litro de la solución 1, se agita durante 15 min. Las soluciones deben prepararse el mismo día de su uso.

(b) Solución de pepsina ácida se pesan 0 2 g de pepsina y se disuelven en 1 ml de HCl 6 N. Esta relación es por tubo

(c) Solución amortiguadora-líquido ruminal se obtiene el líquido ruminal de una vaca fistulada, filtrando el líquido a través de una gasa. Es importante mantener la temperatura del líquido ruminal a 38° C para conservar las condiciones del rumen. Se ajusta el pH de la solución amortiguadora a 7 (cada tubo requiere de 5 ml de sol. amortiguadora ajustada), se adiciona 1 ml de la solución de MgCl₂ al 4 % por cada litro de solución amortiguadora a utilizar. Se toman 5 ml de esta solución ajustada y se mezclan con 15 ml de líquido ruminal (relación por tubo). Introducir en un baño de agua a 38° C la solución amortiguadora-líquido ruminal y burbujearle CO₂ de 5-8 min.

Procedimiento

Pesar 0 25 g de muestra finamente molida en cada tubo (la determinación se realiza por triplicado) y adicionarle a cada tubo 20 ml de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38° C, burbujear CO₂ al tubo y cerrarlo. Introducirlos en un baño de agua previamente calentado a una temperatura de 38° C. Tapar el baño en donde están los tubos para mantener las condiciones de oscuridad que prevalecen en el rumen, conectar la

digestión bacteriana y posteriormente con pepsina en medio ácido se realiza una digestión enzimática (43)

Materia/Reactivos

- Baño de agua con agitación y control térmico LAB-LINE INSTRUMENTS
- Tubos de cultivo N° 9826
- Solución amortiguadora de McDougall (a)
- Solución de pepsina ácida (pepsina con actividad 1 10 000) (b)
- Solución amortiguadora-líquido ruminal (c)
- HCl 6N
- Solución de MgCl₂ al 4 %
- Solución de HCl 3N

(a) Solución amortiguadora de McDougall. se preparan las siguientes soluciones:

Solución 1: Na₂HPO₄ 3.7g, NaHCO₃ 9.8 g, agua desionizada 40° C y aforar a 1000 ml

Solución 2: NaCl 4.7 g, KCl 5.7 g, CaCl₂ 0.4 g, MgCl₂ 0.6 g, agua desionizada 100 ml.

La solución amortiguadora se prepara adicionando 10 ml de la solución 2 a 1 litro de la solución 1, se agita durante 15 min. Las soluciones deben prepararse el mismo día de su uso.

(b) Solución de pepsina ácida se pesan 0.2 g de pepsina y se disuelven en 1 ml de HCl 6 N. Esta relación es por tubo

(c) Solución amortiguadora-líquido ruminal. se obtiene el líquido ruminal de una vaca fistulada, filtrando el líquido a través de una gasa. Es importante mantener la temperatura del líquido ruminal a 38° C para conservar las condiciones del rumen. Se ajusta el pH de la solución amortiguadora a 7 (cada tubo requiere de 5 ml de sol. amortiguadora ajustada), se adiciona 1 ml de la solución de MgCl₂ al 4 % por cada litro de solución amortiguadora a utilizar. Se toman 5 ml de esta solución ajustada y se mezclan con 15 ml de líquido ruminal (relación por tubo). Introducir en un baño de agua a 38° C la solución amortiguadora-líquido ruminal y burbujearle CO₂ de 5-8 min

Procedimiento

Pesar 0.25 g de muestra finamente molida en cada tubo (la determinación se realiza por triplicado) y adicionarle a cada tubo 20 ml de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38° C, burbujear CO₂ al tubo y cerrarlo. Introducirlos en un baño de agua previamente calentado a una temperatura de 38° C. Tapar el baño en donde están los tubos para mantener las condiciones de oscuridad que prevalecen en el rumen, conectar la

agitación y dejarlos durante 48 hrs. Transcurrido este tiempo sacar los tubos del baño y adicionarles unas gotas de HCl 3 N con la finalidad de detener la digestión bacteriana, enseguida adicionarle a cada tubo 1 ml de la solución de pepsina ácida, agitar suavemente los tubos para mezclar la pepsina, taparlos e introducirlos al baño de agua, poner la agitación, tapar el baño y dejarlos en esas condiciones durante otras 48 hrs. Al término de este tiempo sacar los tubos del baño y filtrar con ayuda de vacío su contenido sobre papel filtro Whatman N° 541(previamente puesto a peso constante a una temperatura de 100° C), lavar el residuo con agua destilada y finalmente introducir el papel con el residuo a la estufa para la eliminación de la humedad a 100° C y hasta que esté a peso constante. De manera simultánea se corren blancos (todos los reactivos, excepto la muestra)

Cálculos

Se reporta el % de digestibilidad de las muestras

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{M.S. - (M.S._{\text{residuo}} - M.S._{\text{blanco}})}{M.S.} \times 100$$

$$M.S. = \text{Gramos de muestra seca} = \frac{\text{muestra} - (\text{muestra} \times \% \text{ humedad})}{100}$$

M.S. *residuo* = peso del residuo seco de la muestra en gramos

M.S. *blanco* = peso del residuo seco del blanco en gramos

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES Y NO REDUCTORES POR DNS

Fundamento.

Se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por azúcares reductores dando lugar a la formación de un complejo colorido, el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico,

cuya intensidad de color se mide espectrofotométricamente a 540 nm. Detección 0.2-2 mg/ml. (44)

Material/ Reactivos

- Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER MOD 340
- Solución saturada de acetato de plomo
- Oxalato de sodio R A
- Solución estándar glucosa (a)
- Solución estándar de azúcar invertido (b)
- NaOH 5 N
- HCl conc
- Solución de DNS (c)

(a) Solución estándar glucosa: disolver 1 g de glucosa anhidra G.R. en solución de ácido benzoico al 2 %, aforando a 500 ml
1 ml de esta solución = 0.002 g de glucosa.

(b) Solución estándar de azúcar invertido: pesar 1.90 g de sacarosa G.R., disolver en un matraz aforado de 100 ml con 60 ml de agua, calentar a 65° C en baño maría y adicionar 5 ml de HCl conc., dejar en reposo por 72 horas. Tomar 25 ml de esta solución y neutralizar con NaOH 0.5 N, enfriar y aforar a 500 ml
1 ml de esta solución = 0.001 g de azúcar invertido

(c) Solución de DNS: disolver 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 50 ml de agua a los que se les ha adicionado 20 ml de una solución de NaOH 2 N. Después de que todo el material se ha disuelto, se adicionan 30 g de tartrato doble de sodio y potasio y una vez disueltos, se lleva la mezcla a 100 ml. Esta solución debe ser almacenada en un frasco ambar protegida del bióxido de carbono y luz

Procedimiento

Determinación de azúcares reductores directos. Pesar de 5 a 10 g de muestra en un vaso de precipitados y pasar cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 125 ml de agua destilada y agitar lo suficiente para que todo el material soluble se disuelva. Agregar 1 ml de solución saturada de acetato de plomo neutro, agitar y dejar sedimentar, si el líquido sobrenadante aún está muy turbio o colorido adicionar un poco más de sol. de acetato de plomo, agitar, aforar y mezclar perfectamente. Vaciar a un vaso de precipitados y agregar oxalato de sodio o potasio sólido, agitar, dejar sedimentar, filtrar y comprobar en los primeros mililitros del filtrado si se eliminó todo el exceso de

plomo, adicionándole una pequeña cantidad de oxalato (no debe precipitar) Esta es la solución 1.

Determinación de azúcares reductores totales. Tomar 50 ml de la solución 1, ponerlos en un matraz aforado de 250 ml, adicionar 100 ml de agua, calentar a 65° C en baño maría, sacarlo del baño y agregar 10 ml de HCl conc., dejar en reposo 72 horas y neutralizar usando NaOH 5 N, enfriar y aforar (Solución 2)

Cuantificación Tomar 1 ml de la solución, adicionar 1 ml de DNS y calentar en baño maría por 5 min, enfriar y diluir con 10 ml de agua destilada. Ajustar el espectro con un blanco de reactivos y agua igualmente tratado que en la muestra a 540 nm

Cuantificar los azúcares reductores directos y totales, interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva estándar de glucosa en concentraciones de 0-2 mg/ ml, para el caso de los azúcares reductores directos y en la curva de azúcar invertido (sacarosa) en concentraciones de 0-1mg/ml, igualmente tratada como en la muestra, los azúcares reductores totales

Preparación de las curvas patrón:

Curva patrón de glucosa solución 2.0 mg/ ml

Tubo	mg/ ml	ml solución de glucosa	ml de agua
blanco	0	0	1.0
1	0.4	0.2	0.8
2	0.8	0.4	0.6
3	1.2	0.6	0.4
4	1.6	0.8	0.2
5	2.0	1.0	0.0

Curva patrón de azúcar invertido solución 1mg/ ml

Tubo	mg/ ml	ml solución sacarosa hidrolizada	ml de agua
blanco	0	0	2.0
1	0.2	0.2	1.6
2	0.4	0.4	1.2
3	0.6	0.6	0.8
4	0.8	0.8	0.2
5	1.0	1.0	0.0

Cálculos

Determinación de azúcares reductores:

$$\% \text{ az. red.} = \frac{\text{mg de glucosa x aforo x 0.1}}{\text{g de muestra}}$$

Determinación de azúcares no reductores:

$$\% \text{ az. no reductores} = \% \text{ Az. red. totales (azúcar invertido)} - \% \text{ Az. red. directos (azúcar invertido)}$$

$$\% \text{ az. red. totales} = \frac{\text{mg de azúcar invertido x aforo 1 x aforo 2 x 0.1}}{\text{alícuota x g de muestra}}$$

$$\% \text{ sacarosa} = \% \text{ az. no reductores (azúcar invertido)} \times 0.95$$

$$\% \text{ azúcares totales} = \% \text{ sacarosa} + \% \text{ azúcares red.}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Todas las pruebas se realizaron tanto en el fruto seco como en el que estaba en madurez fisiológica (fruto maduro con alta humedad) por triplicado, ya que se quería observar si a grandes rasgos se tenía alguna ventaja en cuanto al contenido nutricional de una sobre la otra. Sin embargo, no se proporcionaron los datos del mes de fructificación y recolección de cada una de las semillas, ni los días aproximados de desarrollo en el que se encontraba el fruto en "madurez fisiológica", por lo que éste podía encontrarse en un estado anterior al de madurez fisiológica o posterior y cercano al de madurez. Consideramos que debe haber diferencias, ya que el contenido de compuestos en el fruto que termina completamente todo el proceso de desarrollo en la planta varía de aquella, que aunque madura, se corta antes de terminar su ciclo que es la desecación del fruto en la misma planta. En madurez fisiológica los frutos son verdes, con abundante jugo azucarado y lisos, que al secarse en la planta el exocarpo se torna amarillento y rugoso. En cambio, aquél que se cortó al alcanzarse la madurez fisiológica y que se secó en una estufa con corriente forzada a 55-60° C por 24 hrs, el exocarpo no cambió de color, sino que se quedó verde y rugoso.

En el cuadro 1 y 2 se presentan los resultados del análisis proximal. En éste se puede observar que en la semilla el contenido de proteína es bajo en comparación con el que presentan generalmente las leguminosas (17-30 %). El bajo contenido de proteína de esta leguminosa, podría ser atribuido a la inexistencia de nódulos en la raíz, sin embargo, no se sabe si *Styphnolobium bursarioides* los tiene o no, pero la especie que se ha estudiado dentro del género *Styphnolobium*, no posee nódulos. El contenido de grasa y fibra de esta semilla es alta en comparación con el de las leguminosas de consumo común, el cual varía del 1-3 % en cuanto al contenido de grasa, a excepción del cacahuate (43 %) y la soya (18 %), y del 3-5 % en contenido de fibra. El alto contenido de fibra, que no es usual en la semilla, se debe a que la cubierta o testa es muy gruesa y dura en esta leguminosa, tal vez como un medio de protección contra depredadores, ya que como veremos más adelante, esta leguminosa tiene un bajo contenido de tóxicos. En cuanto al

contenido de carbohidratos asimilables y cenizas, los valores son muy semejantes al de las leguminosas de consumo común

Cuadro 1. Análisis Proximal de *Styphnolobium bursarioides*
g/ 100 g muestra (Base húmeda)

Determinaciones	Fruto seco (%)		Fruto en madurez fisiológica (%)		
	Semilla	Vaina	Semilla	Vaina	
Humedad	6.75	8.61		69.54	
Proteína	11.59	1.85	4.36	1.06	
Grasa	7.86	0.65	2.20	0.18	
Fibra	17.64	27.92	5.83	7.09	
Cenizas	3.07	2.75	1.06	0.66	
Carbohidratos asimilables*	52.89	58.22	17.26	21.24	
		Azúcares red	Azúcares no red	Azúcares red	Azúcares no red
		46.62	16.70	57.57	8.22

*Carbohidratos asimilables por diferencia

Humedad de la harina de la semilla del fruto en madurez fisiológica = 10.73 %.

Humedad de la vaina en trozos del fruto en madurez fisiológica = 11.56 %.

Cuadro 2 Análisis Proximal de *Styphnolobium bursarioides*
g/ 100 g muestra (Base seca)

Determinaciones	Fruto seco (%)		Fruto en madurez fisiológica (%)		
	Semilla	Vaina	Semilla	Vaina	
Proteína	12.43	2.02	14.30	3.53	
Grasa	8.43	0.71	7.22	0.60	
Fibra	19.13	30.55	18.47	23.21	
Cenizas	3.23	3.00	3.32	2.81	
Carbohidratos asimilables	56.75	63.71	56.69	69.43	
		Azúcares red	Azúcares no red	Azúcares red	Azúcares no red
		52.22	18.71	65.39	9.34

El contenido de grasa y proteína es más alto en la semilla que en la vaina, ya que es en la semilla en donde se concentran más estos nutrientes. Las vainas presentan

mayor contenido de fibra cruda que las semillas, ésto se debe a que las vainas están constituidas de mayor cantidad de carbohidratos estructurales que las semillas. En cuanto al contenido de carbohidratos, las leguminosas son una buena fuente de energía, y ésto resulta interesante en este fruto, ya que no solamente la semilla tiene grandes cantidades de carbohidratos, sino que también la vaina, solamente que a diferencia de la semilla, en la vaina se encuentran una gran cantidad de azúcares, por lo que la vaina resulta ser dulce y pegajosa, de ahí que este fruto sea especialmente una buena fuente de energía.

En cuanto a la composición proximal de ambos frutos se puede observar que casi no hay diferencia entre ellos. De ahí, que se piense que aquél que se consideró como en madurez fisiológica, realmente se encuentre en un estado de desarrollo mucho más cercano al de madurez y que la diferencia entre los valores de los nutrientes estén dentro de la variabilidad que presenta esta especie.

Cuadro 3. Contenido de aminoácidos no indispensables en *Styphnolobium bursiferoides* g aminoácido/ 16 g N

a a	Proteína Cruda		Proteína Verdadera	
	Fruto seco (%)	Fruto madurez fisiológica (%)	Fruto seco (%)	Fruto madurez fisiológica (%)
Asp	9.17	12.04	13.81	18.59
Glu	15.73	24.64	23.68	38.05
Ser	9.28	6.50	13.97	10.65
Pro	7.52	3.93	11.32	6.07
Ala + Gli	11.9	13.09	17.91	20.22
Tir	4.95	4.73	7.44	6.75
His	2.89	2.70	4.36	4.2
Arg	12.63	9.34	19.00	14.42

Cuadro 4. Contenido de aminoácidos indispensables en *Styphnolobium bursarioides*
g aminoácido/ 16 g N

a a	Proteína Cruda		Proteína Verdadera		Patrón FAO *
	Fruto seco (%)	Fruto madurez fisiológica (%)	Fruto seco (%)	Fruto madurez fisiológica (%)	
Ile	5.37	5.10	8.10	7.87	4.0
Leu	8.47	8.17	12.76	12.62	7.04
Lis	5.66	5.78	8.52	8.93	5.44
Tre	4.96	4.31	7.47	6.6	4.0
Tri	0.56	0.69	0.84	0.91	0.96
Val	7.99	6.51	12.03	10.06	4.96
Met	0.75	1.00	1.12	1.54	
Tot	1.45	1.49	2.17	2.29	4.72
azufrados					
Fen	3.91	5.42	5.88	8.3	
Tot arom	8.86	9.79	13.32	15.05	6.08

* Patrón FAO (45)

Tot azufrados = metionina + cistina

Tot arom = fenilalanina + tirosina

En el cuadro 3 y 4 podemos ver el perfil aminoacídico de ambas muestras. En éstas podemos observar que la calidad de la proteína es buena si se suplementa con cereales, ya que es deficiente en aminoácidos azufrados y triptofano, pero rico en lisina y en los demás aminoácidos esenciales. Esto se puede observar mejor en el cuadro 5, en donde se muestra la calificación química de ambas muestras.

Cuadro 5. Calificación química de la proteína de *Styphnolobium burseroides*

aminoácidos	Proteína Cruda		Proteína Verdadera	
	Fruto seco	Fruto madurez fisiológica	Fruto seco	Fruto madurez fisiológica
Ile	> 100	> 100	> 100	> 100
Leu	> 100	> 100	> 100	> 100
Lis	> 100	> 100	> 100	> 100
Tre	> 100	> 100	> 100	> 100
Trn	58.33	61.45	87.5	94.79
Val	> 100	> 100	> 100	> 100
Tot.	30.72	31.57	45.97	48.52
azufrados				
Tot arom	> 100	> 100	> 100	> 100
Calificación química	30.72	31.57	45.97	48.52
aminoácido limitante	azufrados	azufrados	azufrados	azufrados

$$\text{Calificación química} = \frac{\text{g de a.a. muestra problema}}{\text{g de a.a. patrón}} \times 100$$

En éste se puede ver que los aminoácidos más escasos son los azufrados, siguiéndole el triptofano. El contenido de aminoácidos, en general, están por encima de lo recomendado por la FAO (45). El cálculo se realizó tanto con la proteína cruda como con la verdadera, ya que en la bibliografía el dato que generalmente se reporta es el de proteína cruda. Sin embargo, como esta muestra contiene una proporción considerable de nitrógeno no proteínico (cuadro 6), los cálculos también se realizaron a partir de la proteína verdadera.

Cuadro 6. Contenido de proteína cruda, verdadera y nitrógeno no proteínico en las muestras de *Styphnolobium bursseroides* (base húmeda)

Fruto seco			Fruto en madurez fisiológica		
Proteína cruda (%)	Proteína verdadera (%)	Nitrógeno no proteínico (%)	Proteína cruda (%)	Proteína verdadera (%)	Nitrógeno no proteínico (%)
11.59	7.7	33.56	12.77	8.77	31.32

A pesar de ello, siguen siendo limitantes los aminoácidos azufrados y triptofano. El nitrógeno no proteínico se puede deber, a la presencia de aminoácidos raros en la muestra. Se cree que pueden existir en la muestra, dado a que en el aminograma salieron picos que no correspondían a aminoácidos proteínicos. Además, como se puede ver más adelante, la muestra no presentó ni alcaloides, ni glucosidos cianogénicos, sustancias que también aportan nitrógeno.

La calidad de esta proteína es comparable con el de la lenteja (C Q 31), y el del frijol común (C Q 34).

En cuanto al contenido de aminoácidos y calidad de la proteína se observa una situación semejante a lo expuesto anteriormente.

Cuadro 7. Contenido de Factores antinutricionales y tóxicos en *Styphnolobium bursseroides*

Estado	Inhibidores de Tripsina (U/I/mg muestra)		Hemaglutinina s (título)		Saponinas U H./mg muestra		Alcaloides		Glucosidos Cianogénicos	
	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V
Fruto seco	54.35	0.63	4	0	10.66	85.33	-	-	-	-
Fruto en madurez fisiológica	36.02	0.42	6	0	10.66	42.62	-	-	-	-

S = semilla
V = vaina

En la determinación de saponinas, el estándar presentó un título de 8, lo que corresponde a 684.9 U H./mg

En el cuadro 7, podemos observar el contenido de tóxicos en ambos estadíos. En cuanto al contenido de hemaglutininas, observamos títulos en la semilla, pero no en la vaina. En la vaina se observó hemólisis en los primeros pozos y no aglutinación, por lo que no se puede asegurar si hay o no presencia de hemaglutininas en la vaina, ya que pudieron ser enmascarados por la hemólisis

El contenido de inhibidores de tripsina fue mayor en la semilla que en la vaina, lo cual es lógico, ya que el contenido de proteína en la vaina es muy pequeño.

En cuanto al contenido de saponinas, la vaina del fruto seco presentó el contenido más alto (85.33 UH / mg de muestra), el cual es un valor alto si lo comparamos con los datos reportados para la alfalfa (21.3 UH / mg de muestra) y haba (42.7 UH / mg de muestra)⁵. La presencia de saponinas era evidente, ya que en soluciones acuosas la vaina formaba espuma y también presentaba sabor amargo.

Se realizó la determinación de alcaloides y glucósidos cianogénicos tanto en la vaina como en la semilla, resultando negativa su presencia.

Cuadro 8. Digestibilidad proteínica "in vitro" (simulando la digestibilidad de los monogástricos) y digestibilidad ruminal "in vitro" de *Styphnolobium bursarioides*

Estadio	En monogástricos (%)	Con líquido ruminal (%)
	Semilla	Fruto entero
Fruto seco	54.87	69.79
Fruto en madurez fisiológica	56.5	74.6

⁵ Datos tomados de Girón (41)

Se realizó la prueba de digestibilidad "in vitro" para ver qué tan digerible era la proteína de esta leguminosa para los monogástricos, aunque de antemano se supuso que el porcentaje de digestibilidad sería bajo, dado el contenido tan alto de fibra. Con esto, se corroboró que esta leguminosa no es recomendable en la alimentación humana por su baja digestibilidad, la cual podemos observar en el cuadro 8, sin embargo, podría resultar buena para la alimentación animal, especialmente de rumiantes, ya que ellos sí pueden aprovechar los carbohidratos estructurales. De ahí, que se realizara una prueba de digestibilidad ruminal "in vitro". En el cuadro 8, se presentan los resultados obtenidos en esta prueba, realizándose en el fruto íntegro, ya que los rumiantes consumirían de esta manera la leguminosa. Se considera que a partir de un 45 % de digestibilidad ya es un buen forraje. Aquí, nos podemos dar cuenta que el % de digestibilidad de esta leguminosa es alta para el caso de los rumiantes, por lo que resulta una buena fuente alternativa en su alimentación.

Dado a los resultados obtenidos, podemos considerar que el estado de desarrollo de los dos frutos analizados es el mismo o muy cercano, por lo que las pequeñas diferencias encontradas pueden deberse a la variabilidad de la especie. Sin embargo, resultaría de interés estudiar a la especie tomando lotes de diferentes regiones y en diferentes épocas para poder establecer la variabilidad de esta especie, así como estudiar a la leguminosa en distintas fases de desarrollo, bien controladas, para poder, de esta manera, determinar en qué estado de desarrollo conviene consumirla, por las ventajas nutricionales que pueda ofrecer. Esto, sobretodo, por la región en la que crece esta leguminosa silvestre, en donde la actividad ganadera es primordial y aunque pobre en cuanto a rendimiento, resulta una excelente fuente de alimento para los rumiantes.

CONCLUSIONES

Por su alto contenido en fibra, carbohidratos asimilables y grasa, esta leguminosa resulta una excelente fuente energética en la alimentación animal, especialmente de los rumiantes.

La proteína, aunque baja en contenido (semejante al de los cereales) es de buena calidad si se suplementa con cereales

La semilla de esta leguminosa es limitante en aminoácidos azufrados y triptofano, pero con elevado contenido de lisina

La suplementación que deberá hacerse es una mezcla en que la proporción de proteína sea 1:1 de la leguminosa-cereal

El contenido de tóxicos encontrados es bajo para el caso de inhibidores de tripsina y hemaglutininas, y nulo en el caso de alcaloides y glucósidos cianogénicos

El contenido de saponinas es alto en comparación con el de leguminosas de consumo común; sin embargo, la toxicidad de este tipo de compuestos todavía está en discusión.

El alto porcentaje de digestibilidad de la leguminosa sugiere el uso del fruto íntegro en la alimentación de rumiantes

El valor nutritivo de esta leguminosa es adecuado para la alimentación animal, especialmente de rumiantes

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sousa, M, Delgado, A (1991) Mexican Leguminosae Phytogeography endemism and origin. In: Biological Diversity of Mexico Origin and Distribution. Oxford University Press, New York pp 459-469
- 2.- Harborne, J B (1990) Phytochemistry of the Leguminosae Academic Press, London pp XX
- 3.- Heywood, V H (1971) The leguminosae A systematic purview In Chemotaxonomy of the leguminosae Harborne, J Boulter, D Turner, B L eds Academic Press, London pp 1-23
- 4.- Smartt, J (1990) Grain Legumes Evolution and genetic resources Cambridge University Press, G B pp 3-8
- 5.- Arora, S K (1983) Chemistry and Biochemistry of Legumes Edited by Arora, S K. London. pp 287-314
- 6.- Sousa, M., Rudd, V (1993) Revisión del Género *Styphnolobium* Leguminosae Papilionoideae Sophoreae Ann Mo Bot Gard 80 270-283
- 7.- Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. Plants and their constituents (1995) Bisby, F A, Buckingham, J, Harborne, J B Volume I Chapman and Hall pp 640-641
- 8.- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990) Published by AOAC, Inc Heirich K (editor), 15th edition, Arlington, vol I y II, 17-18, 40-62, 69-83, 1012
- 9.- Hart, F L. (1971) Análisis Moderno de los Alimentos Acriba Zaragoza, España pp 1-9, 13-14
- 10.- Badui, S (1981) Química de Alimentos Alhambra México pp 41-44, 108-114, 364-367
- 11.- Jones, D B (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins Washington, D.C., U.S. Department of Agriculture Circular N° 183.

- 12.- Schottelius, B A. (1975) *Fisiología Editorial Interamericana*, 17a edición. México pp 314, 488-492
- 13.- Harper, A E (1973) Aminoacids of nutritional importance In *Toxicants Occurring Naturally in Foods* Committee on Food Protection (ed) Nat Academy of Science 2 edition Washington, D.C. pp 130-152
- 14.- Lidner, E (1980) *Toxicología de los Alimentos* Acribia Zaragoza, España pp 1-4, 15
- 15.- Liener, Irvin E (1980) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs* Academic Press 2a edición New York pp 7-57, 73-98, 143-160, 161-181
- 16.- Jaffé, W G (1968) Factores Tóxicos en Leguminosas Arch Latinoamericanos de Nutrición 18, 205-218
- 17.- Jaffé, W G (1973) Toxic proteins and peptides In *Toxicants Occurring Naturally in Foods* Committee on Food Protection National Academy of Science 2a edición Washington, D C pp 106-123
- 18.- Liener, I E (1975) Effects of antinutritional toxic factor on utilization of legume proteins In *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds* Friedman, M. Marcel Dekker, Inc New York vol 2 pp 523-550
- 19.- Whitaker, J R, Feeney, R E (1973) Enzyme inhibitors in foods In *Toxicants Occurring Naturally in Foods* Committee on Food Protection National Academy of Science 2a edición Washington, D C pp 276-279
- 20.- Feeney, R E., Means, G E., Bigler, J C (1969) Inhibition of human trypsin, plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes J Biol Chem 244: 1957-1960
- 21.- Conn, E (1973) Cyanogenetic glycosides. In *Toxicants Occurring Naturally in Foods*. Committee on Food Protection National Academy of Science 2a edición Washington, D.C. pp 299-308
- 22.- Merk, R. (1976). *The Merk Index*. 9th. edition pp 8120
- 23.- George, A J. (1965). Legal status and toxicity of saponins *Food Cosmet. Toxicol.* 38: 85-91.

- 24.- Ishaaya, I., Birk, Y. (1965) Soybean Saponins IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes J Food Sci 30 118-120
- 25.- Dominguez, X A (1979) Métodos de Investigación Fitoquímica Limusa, México pp 42-43, 211-228
- 26 - Pelletier, S W (1970) Chemistry of the Alkaloids Reinhold Book Corporation New York. pp 1-9
- 27 - Church, D C (1974) Fisiología Digestiva y Nutrición de Rumiantes Acribia Zaragoza, España pp 1-8, 215-224 227-248,253-263 266-277
- 28 - Winton, A.L., Winton, K B (1957) Análisis de Alimentos Continental, S A México, D F pp 63-81
- 29 - Pearson, D (1976) The Chemical Analysis of Foods 7th edition Churchill Livingtone New York pp 13-15
- 30 - Guerrero, J A, Sigales, M L (1982) Determinación de proteína verdadera y aminoácidos raros en leguminosas TESIS Facultad de Química UNAM México pp 21-24
- 31 - Association of Official Agricultural Chemists Official Methods of Analysis (1975) 12a. edition. Washington, D C
- 32 - Henry, R J, Winkelman, M D (1974) Clonical Chemistry (Principles and technics) Harper Rau Publisher New York pp 389-404
- 33 - Lucas, B., Sotelo, A (1982) Aminoacid determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods Anal Biochem 123 349-356
- 34 - Lucas, B ; Sotelo, A (1980) Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and foods Anal Biochem 109 192-197.
- 35.- Rama Dao, M V , Krishnan, C K. (1974) Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. J. Food Science and Technology 11 213-216
- 36.- Akbson, W.B ; Stahman, M. (1964) A pepsin-pancreating digestidex of protein quality. J. Nutr. 83: 257-261

- 37.- Jaffé, W.G.; Leney, A.; González, D I. (1974). Isolation and partial characterization of beans phytohaemagglutinins. *Phytochemistry* 13: 2685-2693
- 38.-Lucas, B.; Sotelo, A. (1993) A useful modification of the haemagglutination method for the screening of lectins in legume seeds. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Wageningen Pers. EAAP Publication 70 71-74.
- 39.- Kakade, M.L. (1974) Determination of trypsin inhibitor activity of soy products cereal. *Chemistry* 51: 376-382
- 40.- Lucas, B.; Sotelo, A. (1984) A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nutr Rep Int* 29 711-719
- 41.- Girón, M.C (1992) Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis. Facultad de Química. UNAM. pp 92-93.
- 42.- Abisch, E., Reichstein, T. (1960) Alkaloid-screening (micromethod) *Helv Chem. Acta* 43, 1844-1861.
- 43.- Tejada, I. (1985) Manual de laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. pp 311-313
- 44.- Sumner, J.B. ; Howell, S.T. (1934). A method for determination of saccharasa activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54.
- 45.- Food Agricultural Organization/ World Health Organization: Energy and Protein Requirements. (1973), WHO, Technical Report Series N° 522, Génova