

131
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION PROTEICO-CALORICA DE DOS SEMILLAS
DE ERYTHRINA DESTOXIFICADAS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

MA. ESTHER TENORIO JIMENEZ

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	3
GENERALIDADES	4
Descripción del género Erythrina	4
Factores químicos a considerar en la caracterización de una leguminosa como alimento	6
Caracterización química y biológica de la calidad proteica de un alimento	11
PARTE EXPERIMENTAL	23
Destoxificación y obtención de las harinas	23
Análisis proximal	
Humedad	24
Cenizas	25
Proteína cruda	26
Grasa cruda	28
Fibra cruda	30
Carbohidratos asimilables	32
Determinación de tóxicos residuales	
Inhibidores de tripsina	32
Alcaloides	39
Metanol residual	41
Determinación de aminoácidos	44
Triptofano	51
Indices químicos	57
Pruebas biológicas	
Indices de crecimiento corporal	59
Desarrollo de las pruebas biológicas	61
Indices de balance de nitrógeno	67
Indices calóricos	69
Análisis estadístico	75
RESULTADOS Y DISCUSION	76
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUCCION

Durante los últimos años la situación mundial de la alimentación humana ha pasado por una de las peores épocas. Al aumento desmesurado de la población ha correspondido una notoria escasez de alimentos tradicionales, siendo los grupos de población de escasos recursos económicos los más afectados; ya que no tienen acceso a los alimentos de alto valor nutritivo.

Como una solución para aminorar el problema de la escasez de alimentos con alto contenido de proteína, se ha recurrido al estudio y utilización de fuentes no convencionales de alimentos, tal es el caso de las proteínas de origen vegetal, las cuales son de amplia distribución en países en vías de desarrollo. Su costo es relativamente bajo y además se pueden obtener materiales alimenticios con características nutricionales tales que sean utilizables como sustituyentes de la proteína animal.

Una de las familias que podría utilizarse para este fin es la de las leguminosas ya que es muy amplia comprendiendo unos 600 géneros, 13,000 especies, de las cuales en México se han registrado casi 1,500 y de éstas solo se consumen unas 20, ocupa el segundo lugar en orden de importancia entre las familias de las plantas provistas de semillas. (1).

Las semillas de las leguminosas contienen generalmente de 20 a 30 % de proteína (en base seca), que es el doble del que contienen los cereales.

Un problema presente en dichas semillas es que contienen factores antinutricionales que si no son inactivados (la mayoría de estos pueden ser eliminados con un tratamiento térmico adecuado), ejercen efectos indeseables en su valor nutricional. Entre estos factores se encuentran: hemaglutininas, inhibidores de tripsina, glucósidos (productores de cianuro y saponinas) alcaloides, aminoácidos no proteicos, entre otros.

Otro factor que influye en su bajo valor nutritivo es la deficiencia de aminoácidos indispensables azufrados, como metionina y cisteína, sin embargo una suplementación con alimentos ricos en estos aminoácidos mejoran su valor.

OBJETIVO.

Determinar el valor nutritivo de dos semillas de Erythrina destoxificadas con posible uso en la alimentación animal.

GENERALIDADES

La *Erythrina* es un género constituido por 108 especies de amplia distribución en las regiones trópicas del mundo. Como resultado de los estudios realizados por diversos autores, éste género de árboles, arbustos y hierbas es más conocido en muchos aspectos, que en cuanto a distribución y abundancia.

Los estudios más relevantes acerca de *Erythrina* son los referentes a la completa o parcial caracterización de los alcaloides constituyentes de las semillas y de algunas otras partes de las plantas.

Erythrina americana.

Se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En México se cultiva en terrenos tropicales y medianamente fértiles, su desarrollo es menor en tierras relativamente pobres. Se propagan con facilidad por medio de semillas o estacas.

Esta especie alcanza de 4 a 5 metros de altura, su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas; las hojas son trifoliadas, con hojuelas de 10cm. de largo, casi cordiformes o deltoides y en la mayoría de los casos glabras, provistas de estípulas.

Su follaje es frondoso y caduco, verde claro; en ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores, las cuales son de color rojo vivo, y se producen en conjuntos terminales cónicos, y constan de un estambre largo de unos 6cm, y la quilla es pequeña (1cm.), de color blanquecino. El androceo consta de 10 estambres repartidos en dos grupos, uno de nueve y otro aislado. El gineceo está rodeado en su base por un nectario y consta de un ovario alargado, comprimido, con un estilo simple que termina en un estigma pequeño.

El fruto es una legumbre de aproximadamente 20cm de largo y 2cm de ancho, con estrangulamiento que limita los lóculos donde se alojan las semillas, que son de color rojo vivo, escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante.

Se le conoce con los nombres comunes de colorín, chocolín en Hidalgo; chilicote en Baja California, Sonora y otros lugares del Sur.

Las semillas de varias especies son reportadas como muy tóxicas. Se han usado como veneno para pequeños animales en algunas regiones. (2, 3)

Erythrina breviflora

Se encuentra ampliamente distribuida en México; la hay principalmente en Morelos, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Edo. de México.

Tiene flores durante la época de lluvias y es frondosa, en contraste con la floración de muchas otras especies Mexicanas de Erythrina

Presenta grandes semejanzas con Erythrina americana, y las características que la diferencian son el tamaño de las hojas las cuales llegan a medir de 14 a 16 cm. individualmente.

El fruto es color canela, con florecimiento largo y puntiagudo con las puntas alargadas en uno de los extremos, con estrangulamientos que limitan los lóculos donde se alojan las semillas, por cada vaina crecen 1 ó 2. (2, 3)

FACTORES QUIMICOS A CONSIDERAR PARA LA EVALUACION DE UNA LEGUMINOSA COMO ALIMENTO

ANALISIS PROXIMAL.

El análisis proximal o bromatológico se desarrolló en Alemania hace más de cien años por Weende. Este tipo de análisis es de gran importancia, ya que éste es el paso inicial para cualquier estudio analítico realizado en alimentos y en éste caso para las semillas a estudiar en el presente trabajo. Mediante éste se determinan los componenets principales de los alimentos: proteína, grasa, carbohiratos, fibra, cenizas y humedad, los cuales nos dan la pauta para saber hacia donde dirigir un estudio posterior. Las ventajas que proporciona dicho análisis es el empleo de poca cantidad de muestra y las determinaciones son relativamente rápidas. Las técnicas generalmente empleadas en el análisis proximal son las descritas y aprobadas en el AOAC. (4).

Humedad.

El contenido de agua en alimentos naturales se encuentra entre 60-95%. Tanto en tejidos vegetales como animales se distinguen dos formas generales el "agua libre", que es la forma predominante y se pierde con gran facilidad, por lo que es ésta la que se estima en la mayoría de los métodos para determinación de humedad, y el "agua ligada" que se encuentra como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de disacáridos, también se encuentra adsorbida en la superficie de las partículas coloidales.

Los diferentes métodos empleados para la determinación de humedad, se basan en la pérdida de peso por calentamiento, aunque las condiciones de secado varían de acuerdo a la naturaleza de la muestra, esto debido a que algunos componenets de los alimentos y tejidos vegetales se descomponen a

elevadas temperaturas (azúcares y grasas).

La determinación de humedad en una muestra es de gran importancia, porque así se puede dar un valor real a los demás componentes. (5)

Cenizas.

Las cenizas son el residuo inorgánico que queda al incinerar una muestra. La incineración de una muestra destruye la materia orgánica cambiando su naturaleza, las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos o bien raccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. En las cenizas vegetales predominan los derivados del potasio y en las animales las de sodio. (6)

Proteína.

Las proteínas son macromoléculas constituidas por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Estas proporcionan los aminoácidos indispensables requeridos por el organismo, para la síntesis de proteínas estructurales, así como de las biológicamente activas (hormonas, enzimas y anticuerpos).

Son de gran importancia ya que tienen diversas funciones como la de regular el paso de fluidos a través de la membrana celular, mantienen el balance ácido-base del organismo, intervienen en el transporte de nutrientes y son fuente de energía.

Al hablar del aprovechamiento nutritivo de las proteínas se deben distinguir tres aspectos muy importantes: cantidad, calidad y digestibilidad, ya que el hecho de consumir grandes cantidades de proteína no implica necesariamente que se satisfagan las necesidades de aminoácidos del individuo. Por otra parte, la calidad de una proteína se define de acuerdo al contenido de aminoácidos

indispensables, que son utilizados para el crecimiento y mantenimiento del organismo. La digestibilidad se considera como una medida de la capacidad con la que el organismo metaboliza y aprovecha dichos nutrimentos.

De acuerdo a la composición en aminoácidos de las proteínas de la dieta, las fuentes proteicas se clasifican en buenas adecuadas o pobres; las buenas son huevo, carne, pescado, productos lácteos, y legumbres; adecuadas son arroz, maíz y trigo, mientras que las pobres son mandioca, patatas y muchas frutas, aunque estas últimas se consumen como fuente de Vitaminas. (6, 7).

Desde el punto de vista nutricional, la cantidad y calidad de las proteínas de las leguminosas, hacen de éste grupo de vegetales una valiosa fuente de alimentos, pero debido a su deficiencia en aminoácidos azufrados, su valor biológico, no se compara con las proteínas de origen animal, sin embargo se ha observado un incremento cuando estas se suplementan con proteínas provenientes de cereales

Grasa.

Los lípidos son fundamentalmente energéticos, producen 9 Kcal/g y por tanto son la fuente de energía que proporciona más calorías. Sus principales funciones son, las de aportar los ácidos grasos indispensables (linoléico y linolénico) que son precursores del ácido araquidónico, además son precursores del colesterol y el ergocalciferol (vitamina D). El colesterol es necesario para la digestión, absorción y transporte de lípidos en la dieta. Se han asociado algunas enfermedades a las grasas y aceites , ya que un consumo excesivo provoca problemas de salud como obesidad y enfermedades cardiovasculares. (8)

El contenido de grasa en la mayoría de las leguminosas es bajo, y se halla entre el 1-2 %. Sin embargo el cacahuete y la soya son los casos excepcionales en el contenido de éste macronutriente. (8)

Fibra.

Dentro del interés analítico de un alimento los carbohidratos de origen vegetal pueden dividirse en funcionales como son los almidones, azúcares y fructosanas; y por otra parte los estructurales tales como la celulosa, hemicelulosa, lignina y pentosanas, que corresponden a lo que se denomina fibra cruda. La fibra es un elemento importante en la dieta ya que ayuda a formar y transportar el bolo alimenticio a través del tracto digestivo, esto se debe a que tiene una alta capacidad de retención de agua. Algunas enfermedades causadas por dietas bajas en fibra son: constipación, apendicitis, hemorroides, obesidad y diabetes mellitus. (9)

Carbohidratos.

Son elementos dispensables, ya que estos pueden ser sintetizados por el organismo, sin embargo se requiere que sean ingeridos en la dieta. Son compuestos fundamentalmente del reino vegetal. La maltosa y el glucógeno son los únicos de origen animal. En los países de escasos recursos una de las principales fuentes de energía son los carbohidratos, esto debido a que son abundantes y su costo es bajo.

Los almidones y la sacarosa son los carbohidratos más consumidos por el hombre. Se recomienda que un 60-70% de las calorías totales ingeridas provenga de los carbohidratos.

Las leguminosas contienen alrededor de 60 % de carbohidratos que, en general, se absorben y utilizan bien. (8)

Aminoácidos.

Los aminoácidos son compuestos que se caracterizan por tener en su molécula un grupo amino y un grupo carboxilo, de los cuales se conocen más de 140, y de estos sólo 20 funcionan como conjunto básico de las proteínas. Los aminoácidos que intervienen en la síntesis de proteínas son de configuración L, mientras que los de configuración D sólo sirven como fuente energética. Cada sistema biológico contiene un grupo determinado y específico de estos polímeros con una secuencia de aminoácidos establecida genéticamente

Las diversas maneras de clasificar a los aminoácidos se basan en su naturaleza química y las propiedades del grupo R, como puede ser, la solubilidad, la reactividad, la ionización, la polaridad, etc. Desde el punto de vista nutricional se divide a los aminoácidos en dispensables e indispensables.(9)

La composición de los aminoácidos de las proteínas de la dieta es extremadamente importante; existen ocho aminoácidos estrictamente esenciales para la nutrición adecuada del organismo (Treonina, Valina, Metionina, Isoleucina, Leucina, Fenilalanina, Lisina y Triptofano). Aunque algunos de ellos, por ejemplo el Triptofano, se necesitan directamente para la biosíntesis de hormonas y otros compuestos metabólicamente activos. La existencia de distintos tipos de aminoácidos con carga, polaridad y forma diferentes determina también la importancia de la estructura terciaria de los enzimas y de las proteínas estructurales.

La FAO recomienda un consumo mínimo por día de aminoácidos esenciales y además ha establecido la composición de aminoácidos de una proteína patrón con la cual se pueden comparar otras proteínas. (7, 10, 11)

Aminoácidos	Necesidades requeridas (mg a.a./g de proteína)			
	Lactantes	Preescolares (2 - 5 años)	Edad escolar (10 - 12 años)	Adultos
Histidina	26	19	19	16
Isoleucina	46	28	28	13
Leucina	93	66	44	19
Lisina	66	58	44	16
Met. + Cis.	42	25	22	17
Fen + Tir	72	63	22	19
Triptofano	43	34	28	9
Valina	17	11	9	5
Total	55	35	25	13
Incluyendo Histidina	460	339	241	127
Sin incluir Histidina	434	320	222	111

CARACTERIZACION QUIMICA Y BIOLOGICA DE LA CALIDAD PROTEICA DE UN ALIMENTO.

INDICES QUIMICOS.

En la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de métodos o procedimientos matemáticos en base a la composición de aminoácidos de una proteína. Además se establece que una dieta proteínica debe producir el mantenimiento y crecimiento del animal de prueba y que lo anterior está estrechamente relacionado con las cantidades relativas de los aminoácidos

esenciales, que son disponibles para el animal. Algunas de estas pruebas se mencionan a continuación.

SCORE QUIMICO (S.Q.)

Denominado también "calificación química", es un método químico, que nos permite evaluar la calidad de una proteína, es el que más se ha usado y del cual se tiene mayor información, ya que este índice se estableció en 1946 por Block y Mitchell.

El S.Q., se basa en señalar la cantidad de aminoácido esencial que está en mayor deficiencia en la proteína de estudio al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia.(Caseína)

El S.Q. puede considerarse como una primera aproximación de la probable eficiencia de la utilización de una proteína, o mezclas para niños, además de que permite hacer gruesas correcciones de los requerimientos proteicos en una dieta. Sin embargo, el S.Q. puede subestimar la calidad de las proteínas cuando van a ser destinadas a adultos, cuyas necesidades esenciales son menores. (11)

SCORE QUIMICO SIMPLIFICADO. (S.Q.S)

Esta prueba química al igual que el S. Q., nos permite evaluar la calidad proteica, pero en ésta solo se analizan algunos aminoácidos en especial. Es importante aclarar que para realizar éste cálculo, se debe contar con información previa respecto a la proteína en estudio. Por ejemplo si se trata de leguminosas, que se sabe son deficientes en azufrados, para el cálculo solo se usarían la cistina y la metionina. (11)

INDICE DE AMINOACIDOS ESENCIALES (I A.A.E.).

Es definido como la media geométrica de la relación de cada uno de los aminoácidos esenciales de la proteína en estudio y la proteína de referencia. En el caso de fenilalanina y metionina se reportan como aromáticos y azufrados respectivamente.

Según varios autores han encontrado que el IAAE, correlaciona en forma adecuada ($r = 0.948$) con la prueba biológica denominada Valor Biológico; así diferentes investigadores han podido deducir ecuaciones muy simplificadas, para poder correlacionar éste índice químico con el Valor Biológico (VB). (11)

$$\text{Valor Biológico (VB)} = 1.09 (\text{Índice AAE}) - 11.73$$

Se debe hacer la aclaración, que todo lo anterior es justificable cuando se trabaja con alimentos convencionales, los cuales se sabe son inocuos para el animal en estudio.

INDICES BIOLÓGICOS

Aunque se ha hecho énfasis en la investigación biológica para el desarrollo de métodos químicos y físicos que permitan al investigador trabajar con pocas células individuales, estos métodos no resultan satisfactorios para ser aplicados al hombre o incluso a la especie de la cual fueron inicialmente removidas.

Para poder entender con más claridad los factores involucrados en el funcionamiento de organismos tan complejos, se requiere de estudios en el animal intacto; esto último es aplicable a la investigación nutricional.

Hegsted y Mitchell, reportaron independientemente que el hombre se comportaba de manera semejante a la rata, en su utilización metabólica de

alimentos proteínicos en lo que respecta a su crecimiento, indicando que los resultados de pruebas de crecimiento en ratas, podían ser aplicables para la evaluación de dietas en humanos. Otras razones por las cuales la rata es ampliamente utilizada son:

- a) Es un animal omnívoro y puede ser alimentado con la misma dieta a lo largo de su vida, si dicha dieta es adecuada nutricionalmente.
- b) Son fáciles de manejar y cuidar.
- c) Un gran número de animales puede ser colocado en un área pequeña.
- d) Presentan un período largo después del destete, durante el cual continúan creciendo e incrementando su peso corporal; esto es de bastante interés en estudios nutricionales donde se requiere el uso de animales que continúen ganando peso durante períodos extensos.

Las primeras pruebas de evaluación de la calidad nutricional de una proteína, se hicieron comparando las tasas de crecimiento de ratas alimentadas con las dietas por evaluar, con las ratas alimentadas con fuentes proteicas que se sabía eran de buena calidad (leche, huevo).

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (PER).

En 1919 Osborne, Mendel y Ferry introdujeron el concepto de "PER"(Protein Efficiency Ratio), el cual modificado de varias formas es quizá el método más usado para la evaluación de una fuente de proteína, y corresponde al peso ganado por el animal debido a la proteína consumida, bajo ciertas condiciones bien establecidas, que a continuación se describen.(11, 12, 13, 14, 15)

Dieta.

En la elaboración de la dieta, primeramente se debe contar con el análisis proximal de la fuente proteica, para poder ajustarla, y así compararla con la dieta de referencia (Caseína). Por lo que se sugieren niveles de grasa, cenizas,

humedad y fibra cruda que sean iguales entre las diferentes dietas, hasta donde el análisis proximal lo permita.

Animales de experimentación.

Para esta prueba se recomiendan ratas macho de la misma colonia, recién destetadas (la edad del destete se considera entre los 21-28 días); el rango de peso individual entre las ratas debe ser menor o igual a 10 g.

Los animales se mantendrán bajo dieta y condiciones adecuadas que permitan un desarrollo normal.

Período de ensaye.

Durante el estudio las ratas son mantenidas en jaulas individualmente y se les suministra dieta y agua "ad libitum". Se registra el peso corporal de cada rata al inicio del ensaye y después tanto el peso corporal así como alimento ingerido a intervalos regulares.

Cálculos

Se calcula el promedio del peso ganado y proteína (N x 6.25) ingerida, de cada rata de los diferentes lotes. A continuación se calcula el PER de cada grupo y se determina la relación x 100 de cada uno con respecto al PER de Caseína; finalmente se reporta la calidad proteínica como relación porcentual del PER de la muestra con respecto al de la Caseína.

Lo anteriormente descrito se refiere a las condiciones establecidas en el método oficial propuesto por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC); sin embargo, otros investigadores proponen reportar el valor de PER del alimento de prueba, como un PER corregido, asumiendo que el PER de Caseína será constante (2.5).

RELACION NETA DE PROTEINA (NPR)

Bender y Doell propusieron el uso del NPR (Net Protein Ratio), como una prueba biológica en la cual se toma en cuenta la pérdida de peso de un grupo control negativo, dicho decremento de peso se suma al peso ganado del grupo de prueba y se divide por la proteína consumida. (11, 16)

En ésta prueba se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida de peso de las ratas alimentadas con una dieta libre de nitrógeno (DLN), es equivalente a la proteína necesaria para el mantenimiento de los animales. Sin embargo, una falla de ésta determinación es que frecuentemente sobrestima el valor de las proteínas de baja calidad.

Se ha observado que el valor de NPR correlaciona estrechamente con la determinación de NPU (Net Protein Utilization), incluso Bender y Doell han encontrado un factor experimental de 16 para correlacionar ambas determinaciones en una amplia serie de alimentos. (11, 16)

INDICE DE CRECIMIENTO NITROGENADO (NGI)

Una modificación adicional a los métodos basados en el crecimiento del animal de experimentación, lo constituye el índice de crecimiento nitrogenado (NGI), el cual es obtenido como la pendiente en la región lineal de la relación entre el peso ganado y el nitrógeno ingerido.

En este método se usan altos niveles de proteína, por lo que estas dietas pueden mostrar un indicador de ciertos efectos tóxicos; sin embargo, éste tiene la desventaja de no poderse aplicar como un método rutinario, ya que se deben suministrar varios niveles de cada una de las proteínas en estudio. (11)

DIGESTIBILIDAD (D).

Esta se considera como la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, para ser absorbidos por el organismo de prueba. Debido a que la digestibilidad esta influenciada por la solubilidad y susceptibilidad de la proteína al ataque enzimático, a continuación se mencionan algunos puntos que la afectan. (11)

a) La fracción proteínica puede estar protegida de la actividad enzimática por materiales celulares estructurales (celulosa, hemicelulosa por ejemplo).

b) Algunas plantas contienen algunos factores antinutricionales (inhibidores de enzimas proteolíticas).

c) Daño durante el procesamiento de ciertos alimentos o preparación de concentrados o aislados proteínicos.

En general se sabe que los alimentos de origen animal son más digeribles que los de origen vegetal. (17.)

VALOR BIOLÓGICO (VB aparente).

Es la proporción de nitrógeno que es retenido en el organismo, esto es que se puede considerar como un coeficiente de utilización de la proteína; a la vez se puede decir que el valor biológico bajo condiciones muy bien controladas es función únicamente del perfil de aminoácidos y en especial de los aminoácidos esenciales de la proteína del alimento.

Este índice a diferencia de la digestibilidad, tiene una mayor capacidad para poder discriminar, entre proteínas de diferente origen (animal o vegetal), ya que evalúa la cantidad de aminoácidos que van a ser utilizados en el anabolismo del organismo.(11)

UTILIZACION NETA DE UNA PROTEINA (NPU).

De acuerdo a la metodología propuesta por Thomas y Mitchell, basada en un esquema de balance de nitrógeno, el NPU, se puede definir como la proporción de nitrógeno consumido que queda retenido en el organismo, y está influenciado tanto por la digestibilidad, así como por la calidad de la proteína. Por lo tanto el NPU es el producto de valor biológico por la digestibilidad.

Sin embargo, en 1953 Bender y Miller describieron una fórmula más sencilla y rápida para poder estimar el NPU, la cual se basa en determinar directamente el nitrógeno retenido en el canal, a diferencia del método anterior que se podría considerar como una determinación indirecta del NPU.

Como el NPU es afectado por digestibilidad y la calidad de la proteína, se puede considerar como un indicador de mayor utilidad práctica. (11)

Todas las determinaciones biológicas antes mencionadas (PER, NPU, VB, etc.) tienen la desventaja de que solo se pueden aplicar a simples fuentes de proteína o mezclas bien definidas, además de que los niveles de proteína están abajo de los necesarios para obtener la óptima respuesta nutricional; en la actualidad se han descrito algunos métodos para aplicarlos en dietas consumidas normalmente como tales y donde entran en juego otros parámetros como son:

- La complejidad de las mezclas consumidas.
- La naturaleza e intervalo de alimentación.
- El efecto del procesamiento y cocinado del alimento o dieta.
- Nivel de proteína y otros nutrientes (concentración).
- Balance de la proteína con los demás nutrientes (relación proteína / calorías).

NPU OPERATIVO (NPU op)

Platt y Miller propusieron alimentar a ratas con las dietas o raciones, sin ninguna modificación, exclusivamente liofilizándolas; a la vez Miller y Bander propusieron realizar la determinación del NPU sobre la dieta sin ninguna modificación y así denominaron a este índice como NPU operativo; adicionalmente definieron como VALOR NETO PROTEINICO DE LA DIETA (NDpV), al producto del NPU op por la concentración proteínica de la dieta expresada en terminos arbitrarios como fracción decimal. (11)

PORCENTAJE NETO DE CALORIAS PROTEINICAS EN LA DIETA.

(NDpCal %).

Debido a que la interrelación Proteína-Energía metabolizable es de suma importancia y el índice (NDpV) no considera el contenido calórico de la dieta, fue necesario definir un término que relacionara estos dos factores, estableciéndose así el valor neto de calorías proteínicas en la dieta.

INDICES CALORICOS

Metabolismo energético

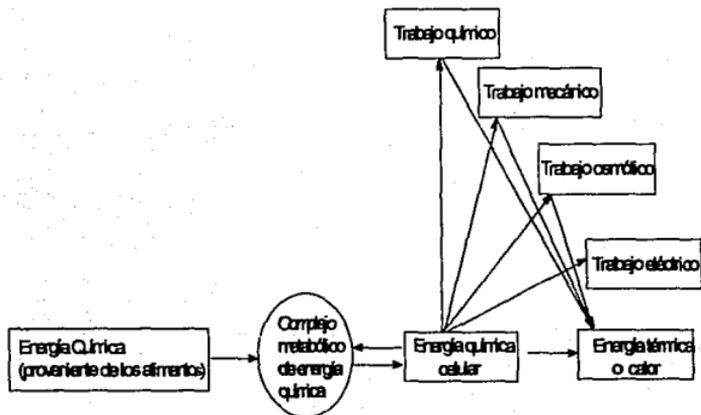
El proceso que experimentan los elementos nutritivos del alimento para liberar la energía que emplean las células, se denomina metabolismo energético.

Los constituyentes orgánicos de la dieta principalmente grasas, carbohidratos y proteínas, representan el potencial químico de energía el cual es transformado a energía química para la síntesis de elementos nutritivos, energía mecánica para la contracción muscular, energía eléctrica para la conducción de los

Impulsos nerviosos, energía osmótica para el transporte de sustancias a través de las membranas.

En el siguiente diagrama se muestran dichas transformaciones. (18)

TRANSFORMACIONES BIOLÓGICAS DE ENERGÍA



Un conocimiento de la utilización o distribución bajo condiciones ordinarias proporciona las bases necesarias para una perspectiva de los estudios que

afectan el metabolismo energético, para ello es necesario entender el significado de los siguientes términos.

Energía gruesa (GE)

Es la cantidad de calor resultante de la oxidación de un alimento, dieta o cualquier otra sustancia. La determinación de ésta se hace en una bomba calorimétrica. Los valores de GE de los diferentes alimentos o nutrientes varían pero los típicos son: carbohidratos: 4.10, proteínas: 5.65 y grasas: 9.45. (19)

Energía digerible (DE)

La GE del alimento consumido menos la energía fecal es llamada Energía digerible aparente. (19)

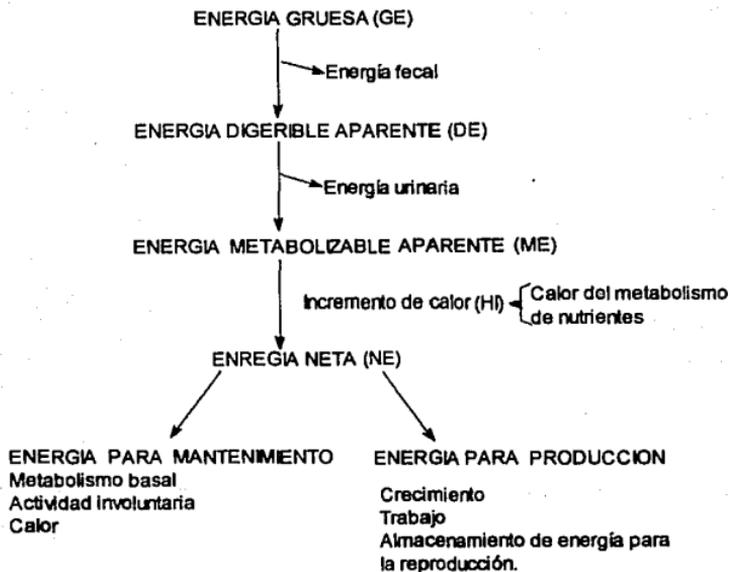
Energía Metabolizable (ME)

Es definida como la GE de la dieta consumida, menos el contenido energético de heces y orina. La ME es comunmente usada para evaluar alimentos y dietas estandarizadas, esto es que se conozca su contenido energético. (19)

Energía Neta (NE)

La NE de un alimento es la proporción disponible de éste, para el mantenimiento del animal (trabajo muscular, reparación de tejidos, regulación de la temperatura corporal.) o varios procesos productivos, como recobrar y retener la energía en los tejidos. Se calcula restando a la ME el incremento de calor (HI), llamado también efecto dinámico específico, y puede ser definido como el calor producido durante la digestión de los nutrientes. (19)

ESQUEMA CONVENCIONAL DE UTILIZACION DE ENERGIA



Fuente : Church,D.C. and Pond,W.G. Basic Animal Nutrition and Feeding.

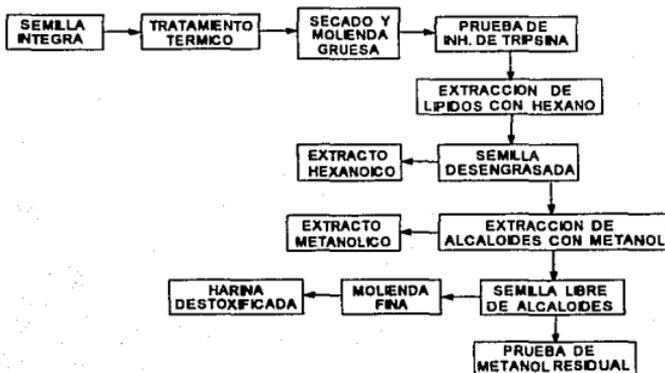
O & B Books. Oregon.1976. p 84 - 88

PARTE EXPERIMENTAL

En el presente estudio se emplearon harinas de las semillas de Erythrina americana (colorín) y Erythrina breviflora (patol), destoxificadas.

DESTOXIFICACION Y OBTENCION DE LAS HARINAS.

Las semillas de colorín y patol se sometieron a un tratamiento térmico (121°C - 5 y 15 min respectivamente), se secaron y molieron (a través de malla de 2mm de diámetro) y se hizo la determinación de inhibidores de tripsina, enseguida se desengrasó y se dió un tratamiento con metanol para la eliminación de alcaloides. Posteriormente se les hizo la prueba de metanol residual (método colorimétrico). Finalmente se molieron a través de malla de 1mm de diámetro, y las harinas obtenidas se utilizaron para los análisis antes mencionados. A continuación se muestra el diagrama del proceso.



ANALISIS PROXIMAL

El análisis proximal se realizó siguiendo las técnicas descritas en el AOAC (4). Las determinaciones realizadas fueron humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, los carbohidratos asimilables fueron determinados por diferencia. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

HUMEDAD.

Fundamento: La determinación se basa en el material perdido (por evaporación de agua) por la muestra durante el calentamiento a una temperatura no mayor a la de ebullición del agua, o al ponerlo en contacto con un agente deshidratante.

Material.

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

Procedimiento.

Se ponen a peso constante las charolas de aluminio, en una estufa de vacío a una temperatura de 60-65°C, de 2 a 4 hrs. A continuación se pesan de 2-5 g de muestra en cada charola, se colocan en la estufa de vacío, para su secado, se considera que la determinación ha terminado cuando las charolas con la muestra están a peso constante, esto es cuando haya una variación no mayor de 0.001g / g de muestra, entre una pesada y otra.

Cálculos.

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

Donde:

Pi = peso de la charola con muestra antes de secar

Pf = peso de la charola con muestra después de secar

m = peso de muestra

CENIZAS.

Fundamento: La determinación se basa en la incineración de la materia orgánica a una temperatura de 500-550°C, obteniéndose así las cenizas que comprenden el material inorgánico (minerales)

Material.

-Mufia THERMOLYNE MOD. 1500

-Balanza analítica.

-Desecador.

-Crisoles de porcelana.

Procedimiento.

Se ponen a peso constante los crisoles, para lo cual se colocan en la mufia a una temperatura de 500-550°C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine durante el proceso de incineración.

En el crisol tarado se ponen de 2-5 g de muestra, antes de meterlo a la mufia se coloca en la campana y con la ayuda de un mechero se carboniza. El tiempo de permanencia en la mufia es variable, (en éste caso el tiempo fue de 4 a 6 hrs.) ya que éste depende del material que se esté trabajando. Se considera que la determinación ha terminado cuando se observen unas cenizas de color homogéneo (grises o blancas) sin puntos negros, además de estar a peso constante. Si se observan puntos negros es recomendable agregar unas gotas de agua a las cenizas frías y nuevamente meterlas a la mufia hasta observar homogeneidad en el color.

Cálculos.

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

Donde:

Pf = peso del crisol con las cenizas

Po = peso del crisol vacío

m = peso de la muestra en gramos

PROTEINA CRUDA

Fundamento: La determinación se basa en el Método Kjeldahl y consiste en una oxidación de la materia orgánica por la acción del H_2SO_4 , H_3PO_4 y H_2O_2 y como resultado de ésta se forma CO_2 , H_2O y N_2 el cual se transforma en NH_4HSO_4 . La reacción es catalizada por el Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Para liberar el NH_4 se usa álcali fuerte (NaOH al 60%), el NH_4 es recibido en ácido bórico y mediante una titulación con HCl 0.01 N se determina la cantidad que reaccionó con el ácido bórico formando el borato de amonio.

Material / Reactivos.

- Digestor TECATOR MOD. AB-20/40
- Dispositivo para microdestilación LABCONCO
- Tubos para digestión de 75 ml MARCA TECATOR
- Mezcla digestiva (a)
- Sulfato de potasio R.A.
- Peróxido de hidrógeno al 30% R.A.
- Hidróxido de sodio al 60% R.A.
- Ácido bórico con indicadores (b)
- Ácido clorhídrico valorado 0.01

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

(b) Acido bórico con indicadores: pesar 10 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, enseguida adicionar 70 ml de indicador A (100 mg de fenoltaleína disueltos y aforados a 100 ml con etanol) y 20 ml de indicador B(33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con etanol), llevar a un volumen final de 2000 ml con agua destilada. Ajustar el ácido bórico a un color café-rojizo.

Procedimiento.

Digestión: Pesar de 20-60 mg de muestra y colocarlos en el tubo de digestión, agregar 0.5 g de K_2SO_4 y 3 ml de mezcla de digestión, colocar el tubo en el digestor (precalentado a una temperatura inferior a $370^\circ C$), para una predigestión de 15 minutos. Después de éste tiempo sacar el tubo, dejarlo enfriar y adicionar 1.5 ml de H_2O_2 y colocarlo nuevamente en el digestor, durante 30 min. a $370^\circ C$.

Se considera que la digestión ha concluido cuando el contenido del tubo sea translúcido, sin restos de material orgánico. Si se observan restos de material orgánico es recomendable poner nuevamente el tubo en el digestor por unos minutos más. Simultáneamente se deben correr blancos (sustituyendo la muestra por sacarosa o glucosa comercial).

Destilación: La muestra ya digerida y fría se pasa a la copa de adición del aparato de microdestilación, que previamente debe estar en proceso de destilación. Colocar un vaso de precipitados con 50 ml de ácido bórico al final del refrigerante. Vaciar el contenido de la copa al bulbo de reacción lentamente, lavar el tubo y la copa de adición con la mínima cantidad de agua destilada, adicionando esto al bulbo de reacción. En seguida se adicionan 15 ml de NaOH

al 60% a la copa de adición y se agregan muy lentamente al bulbo de reacción, lavar nuevamente con agua destilada. Destilar hasta un volumen de 100-125 ml, retirar el vaso y lavar el aparato.

Titulación: El contenido del vaso de precipitado se titula con HCl 0.01 N hasta un vire a rojo fresa, agitando durante la adición del ácido.

Cálculos.

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

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P = ml de HCl gastados en la titulación de la muestra

B = ml de HCl gastados en la titulación del blanco

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.

Fundamento: La determinación se basa en la solubilidad de la grasa cruda en éter; la cantidad de material extraído de una muestra mediante reflujo con éter se denomina extracto etéreo o grasa cruda.

Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos que se encuentran en el extracto etéreo y solo algunos tienen interés nutricional, como los ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como los carotenoides.

Material / Reactivos.

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

Procedimiento.

Pesar de 2-5 g de muestra (Nota 1) en un cartucho de celulosa, se pone el cartucho en el portadetal de vidrio y se coloca en el compartimiento del extractor. En el vaso de borde esmerilado (previamente puesto a peso constante) se agregan 50 ml de éter de petróleo (Nota 2) y con ayuda de un anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción donde se ha colocado el cartucho. Se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso y se calienta poniendo el control de temperatura de la parrilla en grado bajo, se abre la llave de agua para enfriar los refrigerantes (Nota 3). Es importante mantener un reflujo constante durante 8 hrs.aproximadamente. Después de este tiempo se baja la parrilla de calentamiento, se deja enfriar se quita el vaso y se sustituye el portadetal por un colector de vidrio, y nuevamente se asegura el vaso al aparato de extracción, se sube la parrilla de calentamiento y coloca el control en grado alto, para que así se recupere el éter y en el vaso solo quede el extracto etéreo, se suspende el calentamiento, se quita el vaso y se coloca en la estufa de vacío (60-65°C), para eliminar el éter, cuando el vaso esté a peso constante la determinación habrá concluido.

Cálculos.

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

Donde:

P_f = Peso del vaso con el extracto etéreo

P_o = Peso del vaso a peso constante

m = Peso de la muestra en gramos

*Nota₁ Se utiliza la muestra empleada en la determinación de humedad refiriendo el peso a la muestra inicial, con esto se evitará el arrastre de componentes solubles en agua debido a la humedad de la muestra.

*Nota₂ Se utilizo el éter de petróleo, porque es más barato que el éter etílico, no absorbe humedad durante la extracción y la razón más importante es que se evitan posibles explosiones por la formación de peróxidos en el éter etílico.

*Nota₃ Debido a que el éter de petróleo tiene un rango de punto de ebullición de 30-60°C, se recomienda emplear hielo-agua, para enfriar los refrigerantes.

FIBRA CRUDA.

Fundamento: La determinación se basa en la obtención del residuo no digerible por ácido y base fuertes, de una muestra que ha sido desengrasada y digerida sucesivamente con H₂SO₄ y NaOH al 1.25 %.

Material/Reactivos.

- Aparato de digestión para fibra MARCA LABCONCO
- Estufa de vacío LAB-LINE MOD. 3620
- Mufa THERMOLYNE MOD. 1500
- Vasos de Berzellius de 600 ml Kimax
- Crisoles de porcelana
- H₂SO₄ al 1.25 % (PM)

- NaOH al 1.25 % (P/M)
- Antiespumante (Emulsión Sigma-B)
- Alcohol etílico

Procedimiento.

Se coloca la muestra desengrasada en el vaso Berzelius, se agregan 0.5 g de asbesto (lavado y calcinado) y unas perlas de vidrio. A continuación se adicionan 200 ml de H_2SO_4 al 1.25 % en ebullición y unas gotas de antiespumante, se coloca el vaso en el digestor y se sube la parrilla (previamente calentada), y se deja en ebullición durante 30 min. Transcurrido éste tiempo, se retira el vaso del digestor y se filtra con ayuda de vacío sobre un filtro de lino, el residuo se lava con agua destilada (caliente) hasta eliminar el ácido (aproximadamente con 500 ml). El residuo lavado se transfiere al vaso Berzelius y se adicionan 200 ml de NaOH al 1.25 % en ebullición y unas gotas de antiespumante, (no olvidar las perlas de vidrio) se coloca el vaso en el digestor, se sube la parrilla y se deja en ebullición 30 min. Al término de éste tiempo se retira el vaso del digestor y se procede a filtrar sobre el mismo filtro de lino, se lava con agua destilada (caliente) hasta eliminar el álcali (aproximadamente 500 ml.). Finalmente se adicionan 25 ml de alcohol etílico (ayuda a eliminar humedad). 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 secarlo hasta que esté a peso constante. Una vez que está seco el crisol con el residuo, se carboniza con ayuda de un mechero antes de meterlo a la mufia, la determinación concluye cuando el crisol esté a peso constante.

Cálculos.

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

Donde:

P_s = Peso del crisol con el residuo seco

P_c = Peso del crisol con el residuo calcinado

m = Peso de la muestra (referido al peso de la muestra original)

CARBOHIDRATOS ASIMILABLES.

Se calculan por diferencia, restando al 100% la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

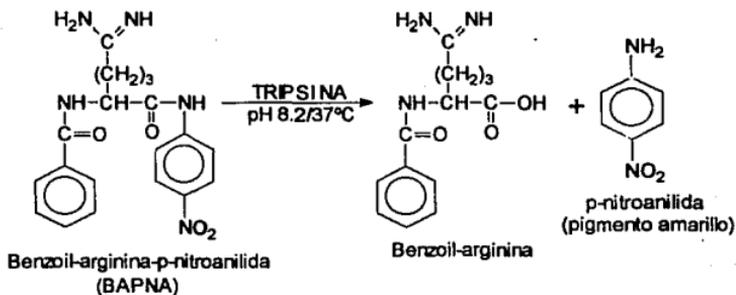
$\% \text{ Carbihidratos} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra cruda})$

DETERMINACION DE TOXICOS RESIDUALES

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso de una muestra con una solución estándar de tripsina (40mg/10 ml), posteriormente se determina si hay actividad proteolítica remanente usando un sustrato sintético (Benzoil-arginina-p-nitroanilida [BAPNA]), el cual producirá una coloración. Dicha coloración será inversamente proporcional al contenido de inhibidores. (20)

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Material y Reactivos:

Potenciómetro CORNING Mod. 10

Parrilla con agitación magnética THERMOLYNE Mod. sp-13025

Baño maría GRANT Mod. SE10

Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER Mod.340

Mezclador de tubos LAB-LINE Mod. Super-mixer

NaOH 0.01N

Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 y 0.05M (a)

Solución BAPNA (b)

Acido acético al 30%

Solución estandar de tripsina (c)

HCl 0.001N

Preparación:

(a) Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano): pesar 6.05 g de tris y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 litro.

(b) Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): disolver 100 mg de BAPNA en 2.5 ml 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 estandar de Tripsina: pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 mg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:**PREPARACION DEL EXTRACTO:**

Pesar 1 gramo de muestra (finamente molida y desengrasada cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) en un vaso de precipitado; adicionar 45 ml de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a 9.6 ± 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 se retira el magneto y se deja reposar el extracto durante media hora. Se decanta el sobrenadante y se elimina el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60%, esto ayuda a reducir la desviación estandar.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD:

Preparar 10 tubos de ensayo como se muestra en el cuadro 1 y agregar la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0 ml con agua destilada. Adicionar a todos los tubos 2 ml de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vortex.

A los blancos se les adiciona además 1 ml de ácido acético para detener la reacción. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar incubar durante 10 min para que entren en contacto inhibitor y enzima.

A continuación se adicionan a cada tubo 5 ml de solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar los tubos en el baño de agua para incubarlos durante 10 min.

Es importante tener un control estricto del tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA para lo cual debe emplearse un cronómetro.

Posteriormente se detiene la reacción enzimática añadiendo 1 ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.

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.

A continuación se muestra el cuadro 1 que permite observar en forma esquemática la serie de tubos para la determinación de actividad inhibitoria.

CUADRO 1

Tubo	ml Ext.	ml H ₂ O	ml Std. Tripsina	<u>5 min</u> →	ml BAPNA	<u>10 min</u> →	ácido acético 30% (Aac)
					37°C		
B1	1.8	0.2	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
1	1.8	0.2	2.0		5.0		1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
2	1.4	0.6	2.0		5.0		1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
3	1.0	1.0	2.0		5.0		1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
4	0.6	1.4	2.0		5.0		1.0
BR	0.0	2.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
R	0.0	2.0	2.0		5.0		1.0

* A los blancos les adiciona enseguida 1 ml de ácido acético 30%.

La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotometro a 410 nm en el espectro visible. Previamente se debe ir ajustando a 100% de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución. Es importante remarcar que el tubo que contiene 0.0 ml de extracto (40 mg tripsina/10 ml) es la referencia y sobre este tubo se basarán los cálculos.

NOTA: Es importante trabajar cada tubo con su blanco porque en ocasiones se arrastran coloraciones del extracto directo provocando interferencias en el momento de leer en el espectrofotómetro, de este modo mediante el blanco se hace una corrección.

Cálculos

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 mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de los inhibidores de Tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.). La lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

$$U.T. = A \times 100$$

Ya que se tiene una serie de alícuotas, se tendrán a su vez una serie de valores de U.T., es conveniente determinar el % de inhibición para lo cual se toma como referencia el tubo 3 que es el que contiene 1 ml de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 al 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{R - A3}{m} \times 100$$

Donde:

R = U.T. de la referencia

A3 = U.T. del tubo 3

m = peso de la muestra en gramos

Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

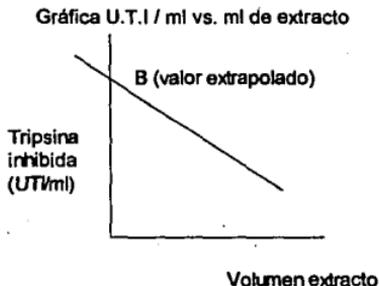
$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se

puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.



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

Si la correlación lineal no es satisfactoria ($r < 0.9$), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar en U.T.I./ml.

$$\text{U.T.I./ml} = \text{UTI} / \text{ml de extracto}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibida con respecto a 1 mg de muestra:

$$\text{U.T.I./mg muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

Donde:

B = valor extrapolado o promedio en U.T.I./ ml

F = Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilucion(es) realizada(s).

Cuando se tiene el extracto directo $F=1$.

ALCALOIDES

DETERMINACION CUALITATIVA.

Fundamento: La determinación está basada en la extracción de los alcaloides con metanol y la posterior acidificación del extracto para después someterlo a un ensayo con 7 reactivos para alcaloides. El precipitado formado con los reactivos varía en cantidad con los diferentes alcaloides por lo que puede hacerse una estimación aproximada de la concentración de alcaloides. (21)

Material y reactivos

Rotavapor BÜCHI Mod R

Matraces bola de 100 ml PYREX

Papel filtro Whatman No 4

Parrilla de agitación CORNING Mod PC-351

Estufa de vacío LAB-LINE

Acido nítrico 30% o d=1.180

Acido sulfúrico 1%

Acido silicotungsténico ($4\text{H}_2\text{O}\cdot\text{SO}_2\cdot 12\text{WO}_2\cdot 22\text{H}_2\text{O}$)

Metanol R.A.

Sulfato de sodio anhidro

Reactivo de Mayer (a)

Reactivo de Wagener (b)

Reactivo de Dragendorff (c)

Reactivo de Sonnenschein (d)

Reactivo de Hager (e)

Reactivo de Scheibler (f)

Reactivo de Acido Silicotungsténico (g)

Preparación

(a). Reactivo de Mayer: disolver 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua y aparte disolver 5.0 g de KI en 10 ml de agua. Reunir las dos soluciones y aforar 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 HNO_3 al 30% ($d=1.18$) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones y se deja reposar 24 horas. Decantar y aforar a 100 ml con agua destilada.

(d). Reactivo de Sonnenschein: a 100 ml de solución caliente de molibdato de amonio (43g en 100 ml de agua), adicionar 100 ml de una solución caliente de fosfato dibásico de sodio anhidro (10 g en 100 ml de agua); a esta solución clara adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado; se forma un precipitado amarillo, dejar reposar 1 hora. Eliminar el líquido sobrenadante, resuspender el precipitado en 50 ml de agua destilada y calentar. Cuando ya está caliente, se le agregan 100 ml de solución caliente de carbonato de sodio anhidro (28 g en 100 ml de agua), se forma una solución clara que se trasvasa a una cápsula de porcelana y se evapora a sequedad; flamear con un mechero bunsen la superficie del polvo hasta que se encienda para evaporar las sales de amonio. El polvo se pesa en un vaso de precipitados (deben obtenerse aproximadamente 30 g). y disolverlo en 200 ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar 50 ml de ácido nítrico concentrado. Aforar a 300 ml con agua destilada. Se obtiene una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

(e). Reactivo de Hager: preparar una solución saturada de ácido pícrico, esto es: 2.0 g en 100 ml de agua.

(f). Reactivo de Scheibler: disolver 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico en 50 ml de agua. Acidular la solución con ácido nítrico.

(g). Reactivo de Acido Silicotungsténico: disolver 5.0 g de ácido silicotungsténico en la cantidad necesaria de ácido sulfúrico 6N para preparar 100 ml de solución.

Procedimiento

Se colocan de 200-250 g de muestra seca y molida, y se adicionan 1000 ml de metanol, agitar y deja toda la noche en reposo. Al día siguiente calentar durante 2 horas a 65 °C en una parrilla con agitación. Posteriormente se deja enfriar, se filtra y se toman alícuotas del filtrado (10gotas), se evaporan y se resuspende en HCl al 1%, se agregan los reactivos. Se observa si se forman los precipitados característicos de cada reactivo que a continuación se presentan.

REACTIVO	PRECIPITADO
Mayer	pp blanco
Wagner	pp floculento color marrón.
Dragendorff	pp anaranjado-marrón.
Sonnenchein	pp amarillo
Hager	pp amarillo.
Scheibler	pp blanco-grisáceo
Acido Silicotungsténico	pp blanco-grisáceo

Se considera que una muestra contiene alcaloides cuando su extracto da prueba positiva (forman precipitado) con los 7 reactivos de alcaloides. Debe mencionarse que en el reactivo de Hager (ácido pícrico) es de baja sensibilidad, por lo tanto cuando da prueba negativa mientras todas las demás son positivas, puede descartarse y debe considerarse positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

DETERMINACION DE METANOL

Debido a que se empleó metanol en la eliminación de Alcaloides, se realizó ésta determinación con la finalidad de verificar si las harinas de colorín y patol estaban libres de éste, ya que el catabolismo intermediario del metanol produce

la formación de formaldehído hasta ácido fórmico el cual es el principal responsable de las acciones tóxicas del metanol.

Fundamento: Consiste en separar el metanol de los constituyentes no volátiles por destilación simple, para después oxidar el metanol a aldehído fórmico, el cual se hace reaccionar con ácido cromotrópico, para desarrollar una coloración la cual se lee espectrofotométricamente, y se determina en forma indirecta el contenido de este alcohol. (22, 23, 24)

Material / Reactivos

Equipo de destilación simple con capacidad de 500 ml

Probeta

Mechero bunsen con manguera y teja de asbesto

Soporte universal

Pinzas para refrigerante

Perlas de ebullición

Termómetro de 0 - 100°C

Recipiente para baño de hielo

Matraces aforados de 25 y 100 ml

Pipetas volumétricas de 1 ml

Pipeta volumétrica de 5 ml

Pipeta volumétrica de 10 ml

Bureta de 25 ml

Recipiente de baño - maría

Espectrofotómetro

Celdas de vidrio de 1 cm de paso de luz

Acido cromotrópico al 5%

Acido fosfórico

Acido oxálico

Acido sulfúrico

Etanol al 5% en volumen (v/v)

Metanol (R.A.)

Preparación de soluciones

Solución patrón de metanol.

Medir 1.3 ml de metanol y colocarlos en un matraz aforado de 1 lt. Aforar con agua destilada.

Solución de Permanganato de potasio / ácido fosfórico

Disolver 3 g de KMnO_4 en una mezcla de 15 ml de H_3PO_4 y 70 ml de agua y llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Solución de Acido oxálico al 5 % en una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, (1:1)

La mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ debe prepararse con mucho cuidado y trabajarse en frío (baño de hielo), adicionando el ácido al agua lentamente y con mucha precaución.

Procedimiento.

Se pesan 100 g de muestra y se colocan en un matraz bola, adicionar 200 ml de agua, y se procede a destilar. Se colectan los primeros 15-20 ml (recibir el destilado en baño de hielo) y éste destilado se afora a 100ml con agua destilada.

Del destilado se toma una alícuota de 5 ml y se deposita en un matraz de 25 ml, a continuación se adiciona con bureta 2 ml de la solución de KMnO_4 (II) se tapa, se agita y se deja en reposo por 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 2 ml de la mezcla ácido oxálico-ácido sulfúrico (III), tapar y agitar, teniendo cuidado de aflojar el tapón para permitir la salida del CO_2 liberado, se deja en reposo durante 15 min. A continuación adicionar 1 ml de ácido cromotrópico (IV) y con bureta adicionar 5 ml de H_2SO_4 concentrado (el ácido debe estar lo más frío posible y se resbala por la pared del matraz). Luego se pone en un baño maría que este entre 65 - 68 °C durante 20 min. Pasado éste tiempo, se enfría el matraz al chorro de agua y se afora con agua

destilada. Se toma una fracción y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Una alícuota de 5ml del destilado se trabajará en la misma forma que la muestra, pero en lugar de adicionar el ácido cromotrópico, se adicionará agua destilada (BLANCO DE LA MUESTRA).

También se corre un curva estándar, preparada de la siguiente manera.

	B	1	2	3
Solución Patrón	0.0	0.3	0.5	1.0
Etanol al 5% (v/v)	5.0	4.7	4.5	4.0
Solución (I)	2.0	2.0	2.0	2.0
15 minutos / temperatura ambiente				
Solución (II)	2.0	2.0	2.0	2.0
15 minutos / temperatura ambiente				
Solución (IV)	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ SO ₄ (conc.) frío	5.0	5.0	5.0	5.0
20 minutos / 65-68°C				
Enfriar al chorro de agua y aforar a 25 ml con agua destilada, leer absorbancia a 570 nm.				

Cálculos

Considerando que la solución patrón tiene una concentración de metanol de 1mg/ml, interpolar la lectura de la muestra en la curva estándar y reportar el contenido de metanol en la muestra en ppm(mg/L)

AMINOACIDOS.

HIROLISIS ACIDA

Fundamento: La técnica se basa en una hidrólisis ácida de la muestra (HCl 6N a 145 °C), con lo que se logra la ruptura de los enlaces peptídicos de las

proteínas y la liberación los aminoácidos que las componen. La separación de estos ocurre al pasarlos por una columna de intercambio iónico y su reacción con ninhidrina, para formar un complejo colorido, que permita cuantificar colorimétricamente la cantidad de cada aminoácido en la muestra. (25).

Material/Reactivos.

- 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 No. 1290
- Adaptador para filtración con jeringa millipore XX30 01200
- Microjeringa MARCA HAMILTON, MOD. 1001-LTN
- Tubos de cultivo de pared gruesa Pyrex No. 9826 con tapón 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)
- Amortiguador de acetatos para regeneración y elución (f)
- NaOH 0.1 N
- Solución Brij -35 al 20 % (Merck No. 1962)

(a) Amortiguador de acetato de sodio: se pesan 1,312 g de acetato de sodio anhidro (previene la cristalización) y se disuelven en 3 litros de agua desionizada, se puede calentar para solubilizar , si se calento se deja enfriar y se adicionan lentamente 400 ml de ac. acético glacial, se afora a 4 litros con agua desionizada. El pH de esta solución deberá ser de 5.51 ± 0.02 , en caso de no ser así, ajustarlo con un álcali o ácido.

(b) Sulfato de hidracina: Se disuelven en agua destilada y desionizada 1.049 g de sulfato de hidracina, a continuación se adicionan 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20 %, se lleva a un volumen de 4litros; para conservarla se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico como conservador.

(c) Ninhidrina: Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil-celolve, a continuación adicionar 1 litro de amortiguador de acetato de sodio 0.4 N y aforar a 4 litros.

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

(e) Amortiguador de dilución: Se prepara una sol. de ácido clorhídrico 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 1.50 ± 0.05 .

(f) Amortiguador de acetatos para regeneración y elución: la preparación se realiza como se muestra en el siguiente cuadro, se coloca en un recipiente con agitación la mitad del volumen de agua y se disuelven todos los componentes sólidos, después se adicionan los reactivos líquidos, y una vez disueltos se agrega agua hasta un volumen aproximado de 900 ml. Se ajusta el pH de cada amortiguador, empleando un potenciómetro de escala expandida (ya que el pH de los amortiguadores debe ser ajustado a ± 0.02 unidades). Una vez ajustado el pH, se afora en un matraz volumétrico de un litro y se agregan unas gotas de ácido caprílico para romper la espuma.

Finalmente se agrega la cantidad específica de ácido caprílico y se vacía el amortiguador a su recipiente.

CANTIDADES UTILIZADAS PARA PREPARAR SOLUCIONES AMORTIGUADORAS				
REACTIVO	BUFFER 1	BUFFER 2	BUFFER 3	NaOH 0.2 N
Acetato de sodio	4.1 g	5.0 g	87.0 g	—
Ac. acético glacial	20.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	—
Sol.de acetato de Zinc	—	0.6 ml	2.0 ml.	—
Etanol absoluto	78.0 ml	78.0 ml	—	—
Alcohol bencílico	—	—	11.0 ml	—
Hidroquinona	0.11 g	0.11 g	—	—
Sol.BRIJ-35 al 20 %	8.0 ml	8.0 ml	8.9 ml	—
EDTA sal disódica	0.1 g	—	—	1.0 g
NaOH lentejas	—	—	—	8.0
Ac. caprílico	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Agua desionizada < 12 ppm Na	1.01	1.01	1.01	1.01
pH	3.90±0.02	4.10±0.02	5.30±0.02	—

Buffer 1 Regeneración de la resina
 Buffer 2 Elución de a.a. ácidos y neutros
 Buffer 3 Elución de a.a. básicos
 NaOH 0.2 N Para lavar la resina

Procedimiento.

Se pesa en el tubo de hidrólisis la muestra finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor a 5 %). A continuación se adicionan los ml de HCl requeridos, tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo de hidrólisis .

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

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

Donde:

A = Cantidad de muestra (g)

B = ml de HCl 6 N

%P = Porcentaje de proteína en la muestra

Una vez pesada la muestra se le insufla nitrógeno al tubo durante 30 seg., se cierra el tubo con el tapón de rosca y se coloca el tubo en el digestor (previamente calentado a 145°C), durante 4 hrs. Después de éste tiempo, se saca el tubo del digestor, se enfría y se trasvasa cuantitativamente a un matraz de bola 100 ml , dando algunas lavadas al tubo con agua caliente y solución lavadora . Se lleva dos veces a sequedad en el rotavapor para eliminar el exceso de ácido clorhídrico, a continuación se vuelve a lavar y se concentra el hidrolizado a un volumen menor de 25 ml.

El hidrolizado concentrado se filtra con ayuda de vacío a través de un papel filtro (Whatman No. 52), se lava con solución lavadora (5 ml aproximadamente) y se enjuaga el matraz de bola volviendo a filtrar el lavado.

Al hidrolizado se le ajusta el pH a 6.8 ± 0.2 , se filtra y se afora a 25 ml con agua desionizada. Si el hidrolizado no se va a inyectar inmediatamente se debe poner en un recipiente y congelar hasta su uso. Para inyectar el hidrolizado en el autoanalizador, se diluye con el amortiguador de dilución (1:1), se filtra a través del dispositivo Millipore, descartando las primeras cinco gotas del filtrado y finalmente se inyecta en el autoanalizador en una cantidad de 100 a 200 μ l.

El autoanalizador de aminoácidos cuenta con un programa para hacer los cambios automáticos de los amortiguadores y las soluciones para el desarrollo de color, con lo cual se obtiene la separación de los diferentes aminoácidos del hidrolizado.

A continuación se muestran las condiciones físicas y el programa utilizado en el análisis de aminoácidos.

CONDICIONES FISICAS

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

Programa.

PASO	TIEMPO (minutos)	CARACTERIZACION
1	2	Amortiguador # 1, Metil-celolve
2	6	Amortiguador # 2, Metil-celolve
3	110	Amortiguador # 2, ninhidrina, registrador
4	120	Amortiguador # 3, ninhidrina, registrador
5	16	NaOH 0.2 N, ninhidrina registrador
6	2	NaOH 0.2 N, metil-celolve, registrador
7	6	Amortiguador # 1, metil-celolve, registrador
8	10	Amortiguador # 1, metil-celolve
9	16	NaOH 0.2 N, metil-celolve
10	46	Amortiguador # 1, metil-celolve

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

Cálculos.

Antes de correr la muestra, se debe correr un estándar de aminoácidos que contenga 0.025 micromoles de cada uno. Además tanto en el estándar como en cada corrida se debe de inyectar una cantidad constante del aminoácido sintético norleucina (estándar interno), para poder hacer los cálculos en base a los denominados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

$$EN_{a.a.} = \frac{AN_{std}}{AA_{std}}$$

Donde:

EN_{a.a.} = Equivalente de norleucina del aminoácido en el estándar

AN_{std} = Área de norleucina del estándar

AA_{std} = Área del aminoácido correspondiente en el estándar

En el aminograma del hidrolizado de la muestra así como en el del estándar se calcula el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos, así como el área de norleucina en el correspondiente aminograma. Es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, ya que la línea base a veces es muy irregular.

Los cálculos que se deben desarrollar para cada uno de los aminoácidos expresando su contenido en mg del aminoácido por gramo de nitrógeno en la muestra son los siguientes.

$$A_{aa} = B_{aa} \times h_{aa}$$

$$\text{mg aa/g N} = \frac{A_{aa} \times EN_{aa} \times \mu\text{Mstd} \times PM_{aa} \times A}{AN_m \times a \times \text{mgN}_m}$$

Donde:

A_{aa} = área del aminoácido en el aminograma de la muestra

B_{aa} = base a la mitad del pico

h_{aa} = altura del pico desde la línea base

EN_{aa} = equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente

μMstd = micromoles del aminoácido en el estándar.

PM_{aa} = peso molecular del aminoácido

A = aforo al que se llevó el hidrolizado en ml

AN_m = área de norleucina en el aminograma de la muestra

a = alícuota inyectada en ml

mgN_m = miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

TRIPTOFANO.

Fundamento: Debido a que la hidrólisis ácida usada para la determinación de aminoácidos de una proteína, destruye completamente al triptofano, para la determinación de éste se emplea una hidrólisis alcalina, para liberarlo y aunque

la bibliografía menciona una gran diversidad de reactivos alcalinos, en esta metodología se usará hidróxido de litio. (25)

Material / Reactivos.

- 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 # 1290
- Adaptador para filtración con jeringa millipore XX30 01200
- Membrana millipore tipo HATF 025 00 (tamaño de poro 0.45 μ M)
- Microjeringa MARCA HAMILTON, MOD AB 20 / 40
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón marca PYREX No. 9826
- Hidróxido de litio 4 N
- Ácido orto-fosfórico concentrado (85%)
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Metil-celósolve al 50%
- Solución de BRIJ - 35 al 20%
- Amortiguador de acetato de sodio 0.4 N (a)
- Sulfato de hidracina (b)
- Ninhidrina (c)
- Solución lavadora (d)
- Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (e)

Nota: Los reactivos (a), (b), (c) y (d), se preparan como los empleados en la técnica descrita para determinación de los otros aminoácidos. Los amortiguadores para regeneración y elución (e), se preparan de manera similar a los de la técnica de aminoácidos, pero tomando en cuenta la siguiente tabla para agregar los reactivos que requiere cada amortiguador.

CANTIDADES UTILIZADAS PARA PREPARAR SOLUCIONES AMORTIGUADORAS			
REACTIVO	BUFFER 1	BUFFER 2	NaOH 0.2 N
Acetato de sodio	4.1 g	85.0 g	—
Ac. acético glacial	11.8ml	15.0 ml	—
Sol.de acetato de Zinc		2.0 ml	—
Etanol absoluto	78.0 ml	---	---
Alcohol bencílico	—	11.0 ml	—
Hidroquinona	0.11 g	—	---
Sol.BRIJ-35 al 20 %	8.0 ml	8.0 ml	---
EDTA sal disódica	0.1 g	—	1.0 g
NaOH lentejas	—	—	8.0 g
Ac. caprílico	0.2 ml	0.2 ml	—
Agua desionizada < 12 ppm Na	1.01	1.01	1.01
pH	3.90±0.02	5.50±0.02	—

Buffer 1 Regeneración de la resina

Buffer 2 Elución de aminoácidos del hidrolizado alcalino

NaOH Lavado de la resina

Procedimiento.

Se pesa la muestra finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor al 3 %) en el tubo de hidrolisis, a continuación se adiciona con

mucho cuidado la cantidad de álcali requerido, tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo.

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\% P}$$

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

Donde:

A = cantidad de muestra

B = ml de álcali

%P = porcentaje de proteína en la muestra

Después se insufla nitrógeno y se cierra perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. El tubo se coloca en el digestor TECATOR para que se lleve a cabo la hidrólisis a una temperatura de 145°C, en cuanto al tiempo debe considerarse el contenido de proteína de la muestra y a continuación se muestra dicha relación para la elección del tiempo de hidrólisis.

Contenido de proteína

Tiempo de hidrólisis

9 - 35 %.....8 horas

35 - 64 %.....6 horas

64 - 91 %.....4 horas

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo y se transvasa cuantitativamente el contenido a un vaso de precipitado, y se lava el tubo con agua caliente y solución lavadora, se ajusta el pH cerca de la neutralidad con ácido orto-fosfórico concentrado, empleando el potenciómetro.

Se filtra con la ayuda de vacío usando papel Whatman del No. 2. Se recomienda lavar el vaso con solución lavadora y agua caliente, para que a la vez se lave el residuo que queda en el papel.

El filtrado se pasa a un matraz de bola y con ayuda del rotavapor se elimina el exceso de solvente y se lleva a 40 ml, es recomendable volver a filtrar para eliminar pequeñas partículas que se lleguen a formar cuando se concentra el hidrolizado en el rotavapor y se afora a 50 ml (si no se va a usar enseguida , se vuelve a ajustar el pH y se congela).

Para inyectar el hidrolizado en el autoanalizador, es necesario que primero se diluya con el amortiguador de dilución en relación 1:1, se filtra a través del filtro millipore , descartando las cinco primeras gotas y el resto se utiliza para inyectar de 100 a 200 µl.

CONDICIONES FISICAS

Temperatura de la columna	55 ± 0.5°C
Velocidad de flujo de amortiguadores	0.6 ml / min
Tamaño de la columna	286 X 5 mm
Altura del empaque de la columna	250 ± 5 mm
Velocidad de flujo de ninhidrina	0.8 ml / min
Velocidad de flujo de sulfato de hidracina	0.6 ml / min
Velocidad de flujo de nitrógeno	0.32 ml / min
Velocidad de flujo sobre colorímetro	0.6 ml / min
Temperatura de baño de reacción	89 ± 0.5°C
Sensibilidad del registrador	2.5 U
Velocidad de la carta	3.0 mm / min

PROGRAMA.

PASO	TIEMPO (minutos)	CARACTERIZACION
1	2	Amortiguador # 1, Metil-celolve, INYECCION
2	6	Amortiguador # 2, Metil-celolve
3	30	Amortiguador # 2, Ninhidrina, REGISTRADOR
4	30	Amortiguador # 2, Ninhidrina, REGISTRADOR
5	14	NaOH 0.2 N, Ninhidrina, REGISTRADOR
6	2	NaOH 0.2 N, Metil-celolve, REGISTRADOR
7	6	Amortiguador.# 1, Metil-celolve, REGISTRADOR
8	2	Amortiguador # 1, Metil-celolve, para REGISTRADOR
9	6	NaOH, Metil-celolve, REGISTRADOR
10	16	Amortiguador # 1, Metil-celolve,REGISTRADOR

Con las condiciones anteriores el triptofano eluye aproximadamente a los 45 min, después de inyectar y sale entre los picos de (NH^+_4) y Arginina.

Cálculos.

También debe correrse una solución estándar de aminoácidos que contenga $0.025 \mu M$ de triptofano, que nos servirá de referencia. Los cálculos se realizan de igual manera que para los otros aminoácidos.

INDICES QUIMICOS

SCORE QUIMICO (S.Q.)

Fundamento: Es un método químico que permite evaluar la calidad de una proteína y se basa en señalar la relación del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína de estudio, al compararla con la relación que establece la FAO. (11, 27)

Cálculos.

$$S.Q. = \frac{Ax Ee}{Ae Ex}$$

Donde:

Ax = Relación de cada aminoácido esencial en la proteína de prueba

Ae = Relación de cada aminoácido esencial en la proteína de referencia

Ex = Relación del total de aminoácidos esenciales en la proteína de prueba

Ee = Relación del total de aminoácidos esenciales en la proteína de referencia

El patrón de referencia empleado es el siguiente. (11, 28)

PATRON FAO

AMINOACIDOS INDISPENSABLES	mg A.A. / g de N
ISOLEUCINA	250
LEUCINA	440
LISINA	340
TOTAL DE AZUFRADOS	220
TOTAL DE AROMATICOS	380
TREONINA	250
TRIPTOFANO	60
VALINA	310

INDICE DE AMINOACIDOS ESENCIALES

Fundamento: Es la media geométrica de la relación de cada uno de los aminoácidos esenciales de la proteína en estudio y la proteína de huevo entero.

(11, 29)

Cálculos

$$\sqrt[n]{\frac{\text{Lys}_p}{\text{Lys}_r} \times \frac{\text{Trp}_p}{\text{Trp}_r} \times \dots \times \frac{\text{AA}_{np}}{\text{AA}_{nr}}} \times 100$$

Donde:

p = proteína de prueba.

r = proteína de referencia (huevo entero).

n = número de a.a. que se toman en consideración.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES DE LA PROTEINA DE HUEVO ENTERO

AMINOACIDOS INDISPENSABLES	mg A.A. / g de N
ISOLEUCINA	415
LEUCINA	550
LISINA	400
TOTAL DE AZUFRADOS	342
TOTAL DE AROMATICOS	630
TREONINA	311
TRIPTOFANO	103
VALINA	464

PRUEBAS BIOLÓGICAS

INDICES DE CRECIMIENTO CORPORAL

RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (PER)

Fundamento: El incremento de peso de ratas recién destetadas, alimentadas con una dieta proteica bajo condiciones bien establecidas provee una medida confiable del valor nutricional. (11)

Cálculos

Los datos obtenidos durante el estudio biológico se anotaron en hojas de registro como la siguiente, para cada una de las ratas.

DATOS PARA PRUEBA BIOLÓGICA NUTRICIONAL

Rata _____ Sexo _____ Peso inicial (Pi) _____ Dieta _____ Fecha _____									
Tiempo(días)									Total
Peso animal									Pf=
Incremento acumulativo									Pf-Pi=
Alimento inicial (Ai)									
Alimento final (Af)									
Alimento ingerido (AI=Ai-Af)									
Alimento acumulativo									Σ AI
Observaciones									

Se calculó el PER para cada una de las ratas empleando la siguiente ecuación:

$$PER = \frac{\text{Incremento de peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} = \frac{P_i - P_f}{(\Sigma AI) - (F)}$$

Donde:

F = Factor correspondiente al contenido de proteína en la dieta, expresado en fracción decimal.

Con cada uno de los valores individuales, se procede a calcular el PER promedio de cada lote, para lo cual se manejarán los datos que sean promediabiles (deben dar un $CV \leq 15$).

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Donde.

CV = Coeficiente de variabilidad

σ = Desviación estándar

\bar{x} = Promedio

Quando se presenta una gran variación en los datos, se elimina el valor mayor y el menor, para reducir dicha variación

Se calcula también el PER de la referencia (Caseína)

Con los PER promedio se calcula el PER ajustado, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F = \frac{2.5}{\text{PER experimental de grupo de Caseína}}$$

$$\text{PER}_{\text{ajustado}} = \text{PER}_{\text{exp}} \times \frac{\text{PER caseína (ref.)}}{\text{PER caseína (exp.)}}$$

Donde:

PER caseína (ref) = 2.5

RELACION NETA DE PROTEINA (NPR)

Fundamento: En ésta prueba se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida de peso de las ratas alimentadas con una dieta libre de Nitrógeno (DLN), es equivalente a la proteína necesaria para el mantenimiento de los animales. (11)

Cálculos

Al igual que en el PER, se requiere de un control adecuado del peso del animal, así como del alimento ingerido, ya que al final del estudio se usó la siguiente ecuación:

$$\text{NPR} = \frac{\text{Incremento en peso(g)} + \text{Decremento en peso del grupo con DLN (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

También se calcula el NPR promedio de cada lote, y es recomendable reportar el valor de NPR como NPR ajustado de la siguiente manera:

$$\text{NPR}_{\text{ajustado}} = \text{NPR (prueba)} \times \frac{\text{NPR caseína (Ref.)}}{\text{NPR caseína (exp.)}}$$

Donde:

$$\text{NPR (ref.)} = 4.16$$

DESARROLLO DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS

ELABORACION DE DIETAS

Para llevar a cabo la evaluación nutricional de una fuente de proteína, se necesita elaborar una dieta que sea isoproteínica e isocalórica, con respecto a una dieta de referencia (generalmente CASEINA), y que además la única variable sea precisamente la proteína. Por lo que es de suma importancia contar con el análisis proximal de la fuente de proteína, para poder ajustarla a la dieta de referencia. (30, 31).

Primeramente se realizó un ajuste de los macronutrientes de la fuente de proteína (harinas destoxificadas de colorín y patol), respecto a los ingredientes

de la dieta de referencia. Es importante hacer notar que en la elaboración de las dietas, se maneja un 9.5 % de proteína, en cada una de estas (en la bibliografía se recomienda un 10 %, pero debido a los resultados obtenidos en el análisis proximal, se tuvo que ajustar a 9.5 % de proteína), además se asume que no hay restricción en cuanto a minerales y vitaminas en la dieta de referencia.

(32, 33)

Tanto la dieta de referencia (caseína), como las de las harinas de semillas de colorín y patol destoxificadas, e incluso la DLN (Dieta Libre de Nitrógeno) se elaboraron en base a la siguiente dieta ideal.

DIETA IDEAL

Componente	g / 100 g de dieta
Proteína	9.50
Sacarosa	20.00
Glucosa	20.00
Dextrina	19.00
Manteca vegetal	8.00
Aceite de maíz	6.00
Mezcla de minerales	4.00
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	11.50

Debido a que se empleó para elaborar la dieta de referencia **CASEINA (SIGMA # C-3400)**, la cual tiene la siguiente composición:

Componente	g / 100 g de dieta
Proteína	89.19
Cenizas	0.58
Grasa	0.23

Se hicieron los ajustes correspondientes para tener un 9.5 % de proteína y se obtuvo lo siguiente:

Componente	g / 100 g de dieta
Proteína	10.65
Cenizas	0.062
Grasa	0.024

Quedando de la siguiente manera las dietas:

**DIETA DE CASEINA
(REFERENCIA)**

Componente	g / 100 g de dieta
Proteína (caseína)	10.65
Sacarosa	20.00
Glucosa	20.00
Dextrina	19.00
Manteca vegetal	7.49
Aceite de maíz	5.49
Mezcla de minerales	3.94
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	10.43

DIETA COLORIN DESTOXIFICADO

Componente	g / 100 de dieta
Harina de colorín destox.	29.30
Sacarosa	17.86
Glucosa	17.86
Dextrina	16.99
Manteca vegetal	7.96
Aceite de maíz	5.97
Mezcla de minerales	2.60
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	-----

DIETA PATOL DESTOXIFICADO

Componente	g / 100 g de dieta
Harina de patol destox.	30.64
Sacarosa	17.45
Glucosa	17.45
Dextrina	16.58
Manteca vegetal	7.90
Aceite de maíz	5.93
Mezcla de minerales	2.88
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	-----

**DIETA LIBRE DE NITROGENO
(DLN)**

Componente	g / 100 de dieta
Sacarosa	20.00
Glucosa	29.50
Dextrina	19.00
Manteca vegetal	8.00
Aceite de maíz	6.00
Mezcla de minerales	4.00
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	11.50

Material

Balanza granataria

Mezcladora MARCA HOBART MOD. N-50

Componentes empleados para la elaboración de las dietas.

Caseína (SIGMA # C - 3400)

Sacarosa (comercial)

Glucosa (SIGMA # G - 500)

Dextrina (SIGMA # D - 2131)

Manteca vegetal (comercial)

Aceite de maíz (comercial)

Mezcla de minerales (ICN # 902842)

Mezcla de vitaminas (ICN # 904654)

Celulosa (SIGMA # C - 8002)

Procedimiento.

Las dietas se elaboraron de la siguiente manera, se pesaron los componentes de cada una de las dietas en la balanza granataria, posteriormente la fuente de proteína se homogeniza, junto con todos los ingredientes sólidos, excepto las vitaminas, a continuación se adicionan los lípidos (aceite y manteca vegetal

(fundida)), finalmente se agregan la vitaminas y se mezcla hasta perfecta homogenización. Se coloca la dieta en un recipiente, se tapa y se mantiene en refrigeración hasta su uso.

PERIODO DE ENSAYE

Se utilizaron ratas macho recién destetadas (21-23 días de nacidas), de la raza WISTAR, con un peso promedio de 56.92 ± 3.21 . Las ratas se pesaron al azar y de acuerdo a su peso inicial (Po) la distribución de los animales por lote se hizo de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (34), quedando de la siguiente manera los 4 lotes empleados para este estudio.

Rata	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
1	50.50	52.00	52.20	53.00
2	55.50	55.50	55.10	54.80
3	55.80	56.50	56.50	56.60
4	58.00	57.50	57.20	57.00
5	58.10	58.10	58.30	59.90
6	62.60	62.50	62.40	60.50

El día de inicio del estudio, las ratas de cada lote se colocaron en jaulas metabólicas individuales y se puso en cada jaula un comedero con la dieta respectiva (las dietas se designaron al azar) y agua "ad libitum". Posteriormente cada tercer día se registraba el peso de cada rata y el alimento ingerido, además de que se colectaba el alimento que desperdiciaban, esto se hizo durante los 21 días que duró el estudio. Es importante hacer notar que al doceavo día se inició la recolección de orina y heces, cada tercer día hasta el final del estudio.

Las heces de cada rata se recibían en una charola, limpiando perfectamente la malla, luego se pasaba por dos tamices, con el fin de separar las heces del alimento desperdiciado, ya separadas se colectaban en frascos de vidrio, y se metían en una estufa de secado a una temperatura de $50 \pm 5 \text{ C}^\circ$ (para evitar el crecimiento de hongos en las heces).

Una vez colectadas todas las heces se secaron, pesaron, molieron en mortero y se pusieron en congelación hasta su uso para hacerles las determinaciones de nitrógeno y contenido calórico.

Para la recolección de orina se puso papel filtro (impregnado de solución de HCl 0.001 N), en los embudos de cada jaula metabólica y al final de estos se colocaron matraces de 25 ml. Una vez colectada la orina, se filtró y se aforó con solución de HCl 0.001 N, se colocó en recipientes de plástico y al igual que las heces se puso en congelación. Posteriormente se realizaron las determinaciones de nitrógeno y contenido calórico a heces y orina por duplicado.

INDICES DE BALANCE DE NITROGENO

VALOR BIOLÓGICO (VB)

Fundamento: La proporción de nitrógeno absorbido, que es retenido por el organismo, se puede considerar como un coeficiente de utilización de la proteína. Por lo que se puede decir que el VB bajo condiciones bien controladas es solo función del perfil de aminoácidos. (11)

Cálculos

$$VB = \frac{N \text{ retenido}}{N \text{ absorbido}} \times 100$$

$$VB = \frac{I - (F - FM) - (U - UE)}{I - (F - FM)} \times 100$$

Donde:

- I = Nitrógeno ingerido
- F = Nitrógeno fecal
- U = Nitrógeno urinario
- FM = Nitrógeno fecal endógeno
- UE = Nitrógeno urinario endógeno

DIGESTIBILIDAD (D)

Fundamento: Es la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, para ser absorbidos por el organismo de prueba. (11)

Cálculos

$$D = \frac{N \text{ absorbido}}{N \text{ ingerido}}$$

$$D = \frac{I - (F - FM)}{I}$$

Donde:

- D = Digestibilidad
- I = Nitrógeno ingerido
- F = Nitrógeno fecal
- FM = Nitrógeno fecal endógeno

UTILIZACION NETA DE PROTEINA (NPU)

Fundamento: Es la proporción de nitrógeno consumido que queda retenido en el organismo y está influenciado por la digestibilidad y el valor biológico. (11)

Cálculos

$$\text{NPU} = \frac{\text{N retenido}}{\text{N ingerido}} \times 100$$

$$\text{NPU} = \frac{I - (F - FM) - (U - UE)}{I} \times 100$$

$$D \times \text{VB} = \frac{\text{N absorbido}}{\text{N ingerido}} \times \frac{\text{N retenido}}{\text{N absorbido}} \times 100 = \frac{\text{N retenido}}{\text{N ingerido}} \times 100 = \text{NPU}$$

Donde:

D = Digestibilidad

VB = Valor biológico

I = Nitrógeno ingerido

F = Nitrógeno fecal

U = Nitrógeno urinario

FM = Nitrógeno fecal endógeno

UE = Nitrógeno urinario endógeno

INDICES CALORICOS

ENERGIA GRUESA(GE)

Fundamento.

La Energía gruesa, denominada también densidad calórica, de un alimento o dieta, es la cantidad de energía en términos de kilocalorías que proporciona un gramo de alimento o dieta. (19)

Para obtener la Energía gruesa se somete una muestra a combustión total, dentro de un recipiente cerrado en presencia de un exceso de oxígeno que asegure la completa combustión.

En el caso específico de la bomba GALLENKAMP, el aumento de temperatura por efecto de la combustión es detectado por un galvanómetro de alta sensibilidad, produciéndose una deflexión, que se traduce en una lectura, la cual se interpola en una curva patrón (previamente establecida de un material de densidad energética conocida), y así se obtendrá el valor calórico de la muestra. (35, 36)

Material / Reactivos.

Bomba calorimétrica GALLENKAMP, MOD. CBB-330-010L

Balanza analítica

Estufa de vacío

Crisoles de acero inoxidable de 2.54 cm de Ø

Mecha de algodón de 7 cm de longitud

Mango metálico prensador

Acido benzoico (Usado como estándar termoquímico, de la British Chemical Standards, cuyo valor calórico es de 26, 454.3 Joules / gramo).

Celulosa micronizada (Degussa)

Procedimiento.

Es importante que las muestras a emplear en ésta determinación esten finamente molidas y secas (el secado es conveniente, pero éste depende de las características propias de la muestra). La cantidad de muestra estará determinada por el tipo de material y como referencia se debe pesar una cantidad de muestra que proporcione aproximadamente 4.0 Kcal. Así se tiene que para materiales con alto contenido calórico con 0.4 g será suficiente, mientras que para muestras como la urea se requerirá hasta 1.5 g como máximo.

La muestra se coloca en el crisol junto con la mecha de algodón y se le toma un peso preliminar (PP), después se compacta con el mango prensador y se toma

el peso final (PF). El crisol, se coloca en la parte superior del pilar central de la bomba y el extremo de la mecha se coloca se introduce en el alambre de ignición.

Para el caso de muestras líquidas, primero se hace una matriz, pesando 0.500 g de celulosa (aproximadamente) junto con la mecha de algodón, se toma peso preliminar, se compacta con el mango prensador y se toma el peso final, posteriormente se adiciona la muestra líquida (cuidando que se absorba bien) y se mete a una estufa de vacío a una temperatura de 50 ± 5 °C, de 1 a 2 hrs, hasta que esté completamente seca.

Montaje de la bomba.

Revisar que el anillo sellador de la bomba esté en perfectas condiciones y se encuentre en su lugar (canal circular), después con la mano izquierda se levanta el anillo metálico estriado tan alto como se pueda, y con la mano derecha se baja el cilindro de la bomba sobre el anillo asegurador, girando hasta que coincidan ambas roscas, girar el cilindro hasta que esté completamente cerrado, por último se gira en sentido contrario el anillo hasta su ajuste hermético. A continuación se introduce la terminal del termopar en el orificio superior del cilindro de la bomba

Oxígeno.

Se abre el tanque de oxígeno, se ajusta la válvula de reducción, y se gira de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ la perilla de oxígeno, (que se encuentra frente al panel de la caja de control), de manera que se obtenga una presión de 25 Atms. en aproximadamente 20-30 seg, en caso contrario será necesario ajustar la válvula de reducción.

Una vez alcanzada la presión adecuada, se cierra la perilla respectiva (Si la presión llega a bajar esto puede ser indicio de una fuga en el sistema).

A continuación se procede a ajustar el galvanómetro a cero, con el dispositivo que se encuentra en la parte inferior del mismo (ajuste grueso), de ser necesario se ajusta con la perilla central (ajuste fino), se espera aproximadamente 30 seg para cerciorarse de que la temperatura se ha estabilizado.

Ignición.

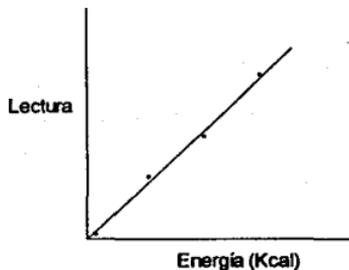
Se presiona el botón de ignición, y aproximadamente tarda de 10-15 seg en llevarse a cabo la combustión, notándose una notable deflexión de la aguja del manómetro, se toma la lectura (máxima deflexión), e inmediatamente se abre la válvula del lado derecho de la base, para que se liberen los gases de combustión, se quita el termopar y el cilindro de la bomba se quita de manera inversa a como se realizó el cierre.

Finalmente se cierra la válvula de liberación de gases de combustión y el cilindro de la bomba se enfría por inmersión en un baño de agua-hielo y se enjuaga con agua destilada, y se seca, para utilizarlo nuevamente.

Cálculos.

Se debe contar con una curva estándar, la cual se elabora realizando la combustión de diferentes cantidades de ácido benzoico (valor calórico certificado). Es recomendable pesar cantidades de ácido en el rango de 150 a 700 mg, además es necesario hacer una combustión exclusivamente de la mecha, para tomar ésta lectura como la correspondiente a cero del valor energético.

Se elabora la gráfica colocando en la abcisas el contenido energético y en las ordenadas la lectura.



Es necesario realizar la determinación por duplicado (mínimo), una vez obtenida la lectura se convierte en términos calóricos, de acuerdo a los siguientes factores:

1 g de ácido benzoico = 26,254.3 Joules.

1 g de ácido benzoico = 6,270.7 Calorías

1 Kcal = 4.1868 K joules.

Para obtener los demás índices calóricos, se determinaron los contenidos energéticos del alimento ingerido, orina y heces en la Bomba Calorimétrica (Gallenkamp) y los datos obtenidos se emplearon en las siguientes ecuaciones.

(19)

Energía digerible (DE) aparente

$$DE = \frac{E_i - E_f}{E_i} \times 100$$

Donde:

E_i = Energía ingerida

E_f = Energía fecal

Energía Metabolizable (ME) aparente

$$ME = \frac{\text{Energía retenida}}{\text{Energía ingerida}}$$

$$ME = \frac{Ei - Ef - Eu - HI}{Ei} \times 100$$

Donde:

Ei = Energía ingerida

Ef = Energía fecal

Eu = Energía urinaria

Energía Neta (NE) aparente

$$NE = \frac{\text{Energía neta retenida}}{\text{Energía ingerida}}$$

$$NE = \frac{Ei - Ef - Eu - HI}{Ei}$$

Donde:

Ei = Energía ingerida

Ef = Energía fecal

Eu = Energía urinaria

El HI (efecto dinámico específico, producido durante la digestión de los nutrientes), se calcula tomando en cuenta los valores de ME de cada uno de los nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas).

Los valores de ME experimental de cada nutriente, se obtienen a partir del valor de ME de cada rata (esto se considera el 100%) y del análisis proximal de cada dieta se obtiene el % de cada nutriente, para obtener su correspondiente ME, luego se relacionan con los ME de la bibliografía, para obtener el HI de cada nutriente.

Finalmente se suman los HI individuales para obtener el HI total que se utilizará en la ecuación de NE. (19)

Valores de ME *

Nutriente	Kcal/100Kcal
Grasa	17
CHO'S	23
Proteína	31

* Church,D.C. and Pond,W.G. Basic Animal Nutrition and Feeding. O & B Books.Oregon.1976. p 84 - 88

ANALISIS ESTADISTICO

Debido a que los resultados de las pruebas biológicas presentan una gran variabilidad, se realizó el análisis de varianza de una variable (ANOVA), y la prueba de rango multiple (Método de Duncan), ambas con un nivel de significancia de 95 %. También se hicieron correlaciones entre las pruebas biológicas, los índices químicos y los índices calóricos. (37)

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis proximal (base seca), de las harinas destoxificadas, empleadas en el presente estudio. Se observa que las dos *Erythras* (colorín y patol), presentan un contenido de proteína mayor al rango de proteína para las leguminosas establecido en la bibliografía (18 - 25%) lo que implica que estas leguminosas tienen un gran potencial para ser empleadas en alimentación animal. En cuanto a los demás componentes, no se observan diferencias significativas entre las dos muestras. Lo anterior también se muestra en la fig. 1.

Los resultados del análisis de aminoácidos se muestran en las tablas 2 (aminoácidos dispensables) y 3 (aminoácidos indispensables). En la tabla 2 se observa que el colorín presenta mayor contenido de todos los aminoácidos dispensables, que el patol.

En cuanto a los aminoácidos indispensables (tabla 3) se observa que al comparar los resultados obtenidos, con el patrón FAO (1973), el colorín supera al patrón FAO en todos los aminoácidos indispensables y el patol solo presenta valores inferiores al patrón FAO en Isoleucina y total de azufrados (Metionina y Cisteína). En la fig. 2 se comparan los contenidos de los tres aminoácidos más escasos (Lisina, Triptofano y Metionina) en colorín y patol con el patrón FAO y se observa que solo el patol presenta deficiencia en Metionina, mientras que ambos superan al patrón FAO en Lisina y Triptofano.

El contenido de aminoácidos esenciales de cada semilla se relaciona con el patrón FAO, para obtener su score químico, y en la tabla 4 se observa que hay

valores mayores a 100, como es el caso de Lisina y Triptofano, que junto con Metionina son los más escasos en alimentos.

Para ambas semillas los aminoácidos azufrados (Metionina y Cisteína), son los limitantes, pero colorín es el que presenta una mayor calificación química, lo cual implica que tiene una proteína de mejor calidad.

En cuanto al Índice de Aminoácidos Esenciales (IAAE), en la tabla 5 se puede corroborar que el colorín tiene una mejor calidad proteica, ya que también presenta el IAAE más alto, incluso el valor es mayor al de caseína (usada para la elaboración de la dieta de referencia en las pruebas biológicas). En la fig. 3, lo anterior se muestra de manera gráfica.

Los resultados de inhibidores de tripsina, son los siguientes: 18.20 UTI/mg de muestra para colorín y 1.42 UTI/mg de muestra, para patol, y se observa que estos se encuentran en cantidades significativas en el colorín, si se considera que a partir de 10 UTI/mg de muestra, la actividad de tóxico es de importancia. Cabe aclarar que estos resultados son los obtenidos después de haber sometido a las semillas a un tratamiento térmico (121°C - 5 min para colorín y 121°C - 15 min para patol), el cual se eligió de un estudio previo en el que se manejaron diferentes condiciones de tiempo, temperatura y relación agua semilla, todo esto con la finalidad de encontrar las condiciones en las cuales se eliminara la mayor cantidad de dichos tóxicos. (38)

La pruebas de alcaloides y metanol residual fueron negativas en ambas semillas.

Los resultados obtenidos en la prueba biológica de PER, se muestran en la tabla 6, donde se observa que la dieta elaborada con colorín presenta el valor más alto, lo que implica que el colorín tiene la mejor calidad proteica, después la caseína (referencia) y finalmente la de patol. Estadísticamente se encontró diferencia significativa entre caseína-patol y colorín-patol, pero no entre caseína-colorín.

Los resultados de NPR se muestran en la tabla 7, donde se observa que una vez más el colorín presenta la mejor calidad proteica. Estadísticamente no se encontró diferencia significativa.

Tanto los resultados de PER como de NPR se muestran de manera gráfica en la figura 4

Los resultados de los índices de balance de nitrógeno (NPU, Digestibilidad y Valor biológico) se muestran en la tabla 8 y en la fig. 5 y se observa que en cuanto a la digestibilidad el valor de caseína es mayor a los del patol y el colorín, lo cual era de esperarse, ya que se sabe que la proteína de origen animal tiene una mayor digestibilidad que la de origen vegetal. Estadísticamente, se encontró diferencia significativa entre caseína-colorín y caseína-patol, pero no entre colorín-patol.

Respecto al valor biológico, se observa que tanto el patol como el colorín tienen un buen perfil de aminoácidos esenciales, lo cual coincide con los resultados del análisis de aminoácidos. Estadísticamente solo se encontró diferencia significativa entre patol-caseína.

En cuanto a los resultados de NPU, se observa que el valor de NPU para la dieta de caseína es mayor, lo que indica una mayor cantidad de nitrógeno proveniente de esta dieta queda retenido en el organismo. Estadísticamente se encontró diferencia significativa entre caseína-colorín y caseína-patol.

Los resultados de los índices calóricos se muestran en la tabla 9 y fig. 6, se observa que los valores de Energía digerible y Energía metabolizable en las tres dietas son mayores respecto a los de Energía neta, y esto es congruente ya que este último además de considerar la energía empleada en la digestibilidad, también considera la energía utilizada para el mantenimiento. Estadísticamente se encontró diferencia significativa entre caseína-patol y colorín-patol.

En cuanto a las correlaciones realizadas entre las pruebas biológicas y los índices químicos y los índices calóricos, y solo se encontró una buena correlación (0.9850) entre el IAAE (Índice de aminoácidos esenciales) y el PER (Relación de eficiencia proteica), lo que implica que el IAAE es una prueba química que nos da la pauta para realizar la prueba de PER.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 1
ANALISIS PROXIMAL
(base seca)

	Proteina	Cenizas	Grasa	Fibra	CHO'S
Colorin	34.36	5.10	0.25	37.60	22.70
Patol	31.83	3.76	0.59	38.68	25.14

Humedad: colorin = 5.65% patol = 2.58%

CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia

ANALISIS PROXIMAL
(base seca)

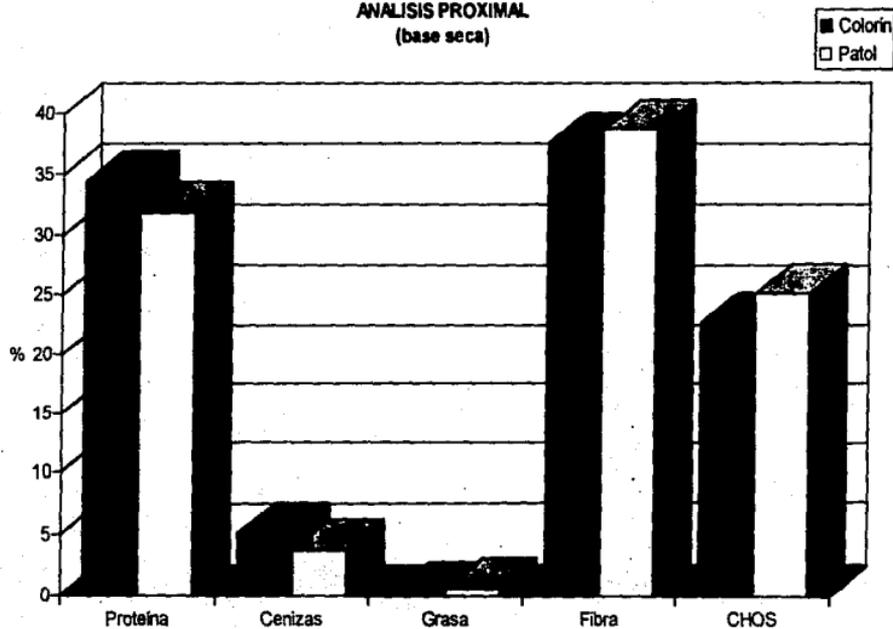


Fig. 1

Tabla 2
CONTENIDO DE AMINOACIDOS DISPENSABLES
 (mg a.a. / g N)

Muestra	ASP	GLU	SER	PRO	ALA	GLI	TIR	ARG	HIS
Colorín	662.76	1094.75	342.26	303.78	357.54	353.50	321.22	433.27	256.51
Patol	449.07	844.28	286.86	301.96	303.34	306.65	230.36	347.19	197.41

Tabla 3
CONTENIDO DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES
 (g a.a / g N)

Muestra	ILE	LEU	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT.AZUF ^a	TOT.AROM ^b
Colorín	307.86	674.36	568.66	260.59	85.08	415.37	256.23	622.27
Patol	207.19	543.42	468.43	268.58	71.13	312.46	206.76	480.59
Patrón FAO*	250.00	440.00	340.00	250.00	60.00	310.00	220.00	380.00

a. Total de azufrados (Met + Cis)

b. Total de aromáticos (Fen + Tir)

* Patrón FAO 1973

**CONTENIDO DE AMINOACIDOS
INDISPENSABLES**

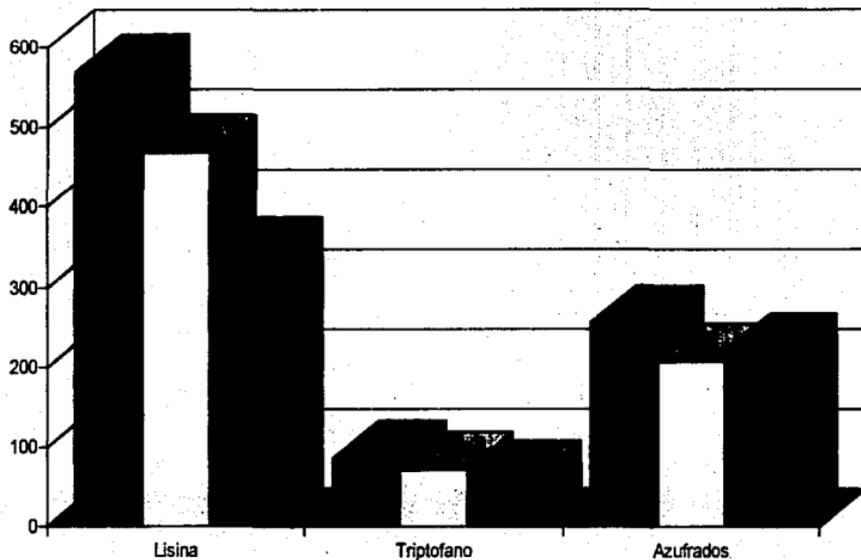
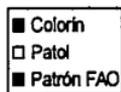


Fig. 2

Tabla 4
SCORE QUIMICO*

Muestra	ILE	LEU	LIS	TRE	TRY	VAL	TOT. AZUF. ^a	TOT. AROM. ^b
Colorín	85.97	>100	>100	82.69	>100	93.95	81.85*	>100
Patol	95.52	>100	>100	91.89	>100	86.66	80.92*	>100

$$S.Q. = \frac{Ax \ Ee}{Ae \ Ex}$$

Donde:

Ax = Relación de cada aminoácido esencial en la proteína de prueba

Ae = Relación de cada aminoácido esencial en la proteína de referencia

Ex = Relación del total de aminoácidos esenciales en la proteína de prueba

Ee = Relación del total de aminoácidos esenciales en la proteína de referencia

a. TOTAL AZUFRADOS = met + cis

b. TOTAL AROMATICOS = fen + tir

Tabla 5.
INDICE DE AMINOACIDOS ESENCIALES

MUESTRA	IAAE
Caseína	95.44
Colorín	99.04
Patol	80.94

$$\sqrt[n]{\frac{\text{Lys}_p}{\text{Lys}_r} \times \frac{\text{Trp}_p}{\text{Trp}_r} \times \dots \times \frac{\text{AA}_{np}}{\text{AA}_{nr}}} \times 100$$

Donde:

p = proteína de prueba.

r = proteína de referencia (huevo entero).

n = número de a.a. que se toman en consideración.

PRUEBAS QUIMICAS

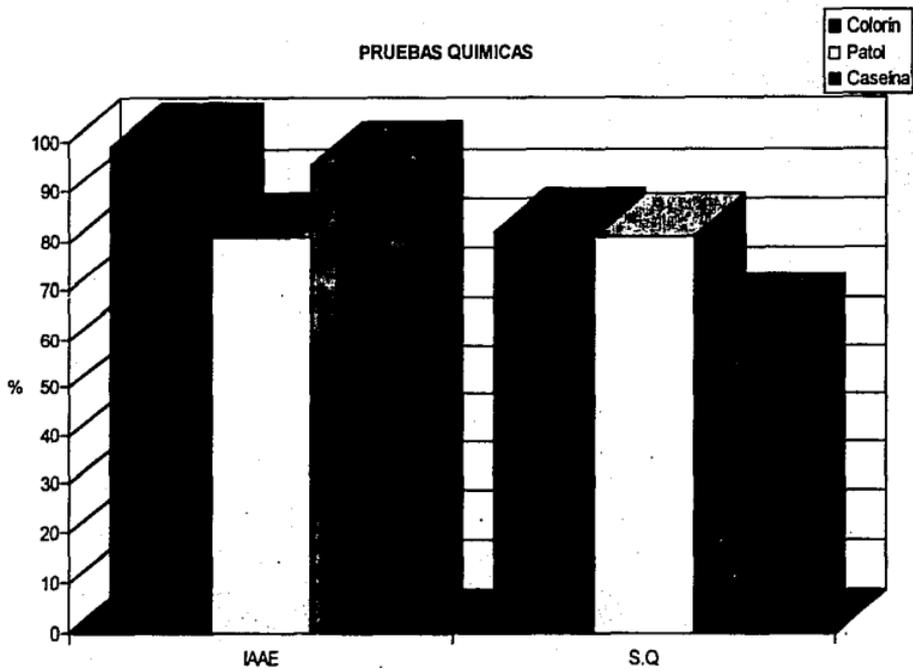


Fig.3

Tabla 6
RELACION DE EFICIENCIA PROTEICA (PER)

	PER			PER(ajustado)		
	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol
Rata 1	3.21	3.41	3.68	2.51	2.67	2.87
Rata 2	3.26	3.47	2.37	2.55	2.71	1.85
Rata 3	3.18	3.58	3.18	2.49	2.80	2.48
Rata 4	3.27	3.65	2.32	2.55	2.85	1.81
Rata 5	3.39	2.94	2.39	2.65	2.30	1.86
Rata 6	2.89	3.73	2.71	2.26	2.91	2.12
Promedio	3.20	3.46	2.66	2.50	2.71	2.07
Desv.Std.	0.167	0.281	0.548	0.130	0.219	0.428

Nota: Debido a que los datos para patol, presentaron un CV>15, el promedio se calculo, eliminando los valores mayor y menor.

Tabla 7
RELACION NETA DE PROTEINA (NPR)

	NPR			NPR (ajustado)		
	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol
Rata 1	4.01	3.38	3.78	4.32	3.68	4.07
Rata 2	4.03	4.12	3.73	4.35	4.49	4.03
Rata 3	4.17	3.80	4.01	4.49	4.14	4.32
Rata 4	3.84	3.66	3.13	4.13	3.99	3.38
Rata 5	3.79	3.55	3.42	4.08	3.87	3.68
Rata 6	3.86	3.82	3.42	4.16	4.17	3.86
Promedio	3.86	3.82	3.58	4.16	4.17	3.86
Desv.Std.	0.295	0.388	0.314	0.318	0.422	0.339

PRUEBAS BIOLÓGICAS

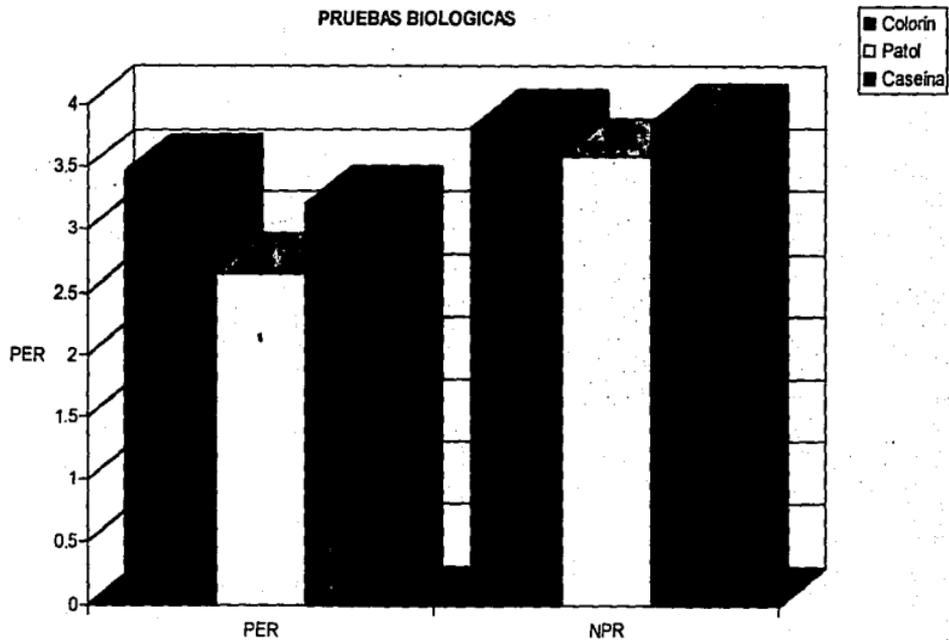


Fig. 4

Tabla 8
INDICES DE BALANCE DE NITROGENO

	NPU			DIGESTIBILIDAD (aparente)			VALOR BIOLÓGICO (aparente)		
	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol
Rata 1	85.92	78.95	73.01	93.98	82.16	77.28	91.42	96.10	94.48
Rata 2	87.90	83.66	76.48	94.05	84.90	81.12	93.47	98.54	94.28
Rata 3	84.99	80.44	81.82	92.71	84.63	85.19	91.68	95.05	96.04
Rata 4	86.55	78.06	77.15	94.51	84.93	81.86	91.58	91.92	94.25
Rata 5	88.00	75.69	79.66	92.86	82.89	82.34	94.77	91.31	96.74
Rata 6	87.88	67.46	81.23	93.44	72.25	83.30	94.05	93.37	97.52
Promedio	86.87	77.38	78.22	93.59	81.96	81.85	92.83	94.38	95.55
Desv. Std.	1.256	5.531	3.329	0.712	4.896	2.645	1.451	2.729	1.413

INDICES DE BALANCE DE NITROGENO

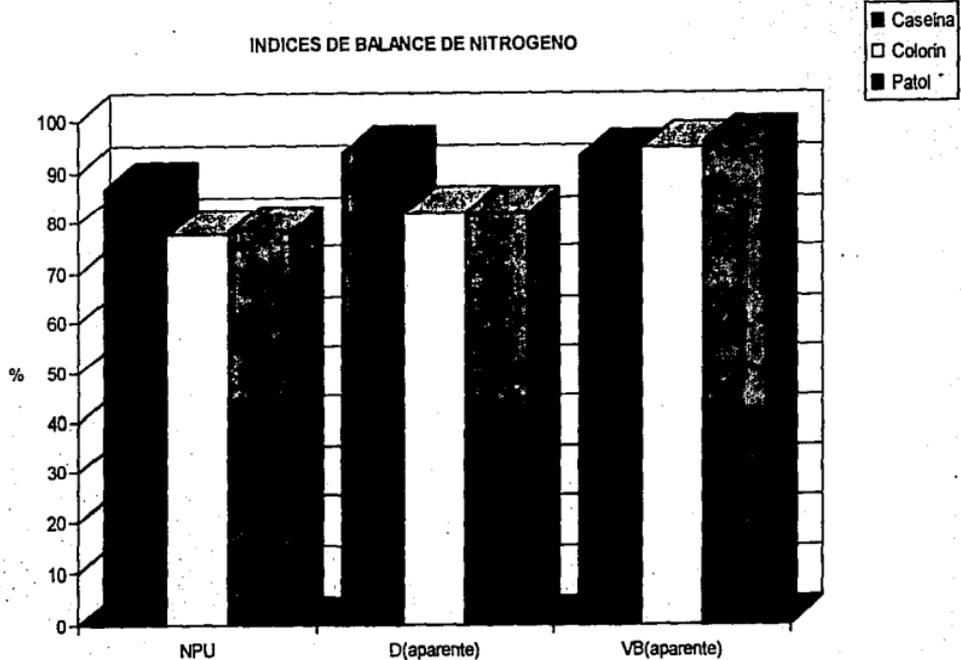


Fig. 5

Tabla 9
INDICES CALORICOS

	ENERGIA DIGERIBLE (aparente)			ENERGIA METABOLIZABLE (aparente)			ENERGIA NETA (aparente)		
	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol	Caseína	Colorín	Patol
Rata 1	91.04	88.32	82.61	90.48	88.31	82.42	69.75	67.23	63.54
Rata 2	91.67	90.59	85.84	91.21	90.58	85.23	70.32	69.82	65.72
Rata 3	89.10	90.34	86.62	89.08	89.93	86.49	68.68	69.34	66.68
Rata 4	90.44	89.29	86.08	90.07	88.68	85.69	69.44	68.36	66.07
Rata 5	89.28	90.60	85.68	89.26	89.83	85.16	68.81	69.25	65.67
Rata 6	89.42	90.20	86.81	89.23	89.74	86.42	68.79	69.19	66.62
Promedio	90.16	89.89	85.61	89.89	89.51	85.24	69.30	68.67	65.54
Desv.Std.	1.055	0.908	1.532	0.850	0.848	1.489	0.655	0.879	1.186

INDICES CALORICOS

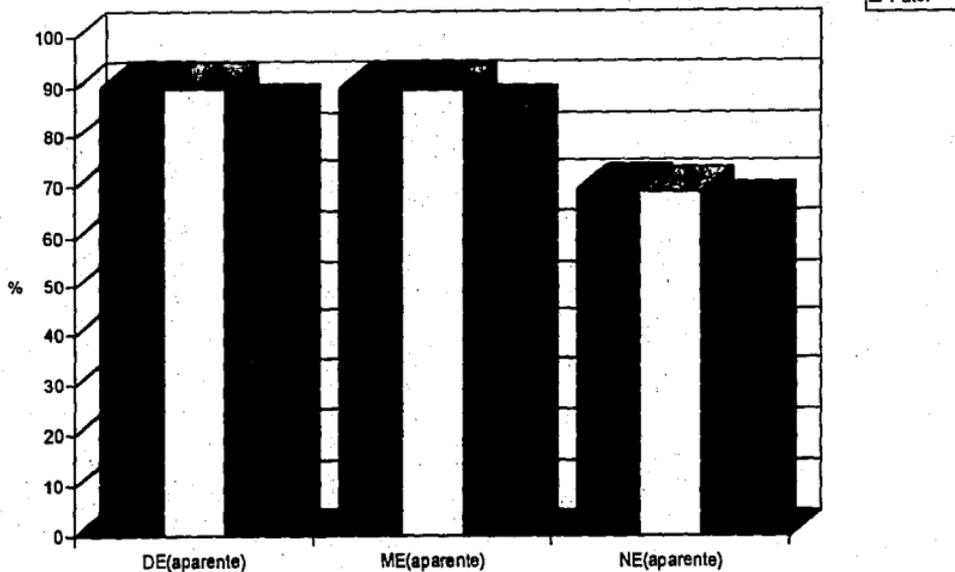


Fig. 6

Tabla 10
DATOS PARA CORRELACION IAAE - PER

	Caseína	Colorín (88)*	Colorín (90)	Patol (88)*	Patol (90)
IAAE	95.44	86.54	99.04	76.17	80.94
PER	2.50	2.34	2.71	2.09	2.07

* Datos obtenidos en un estudio anterior. (39)

ANALISIS ESTADISTICO
CORRELACION IAAE - PER

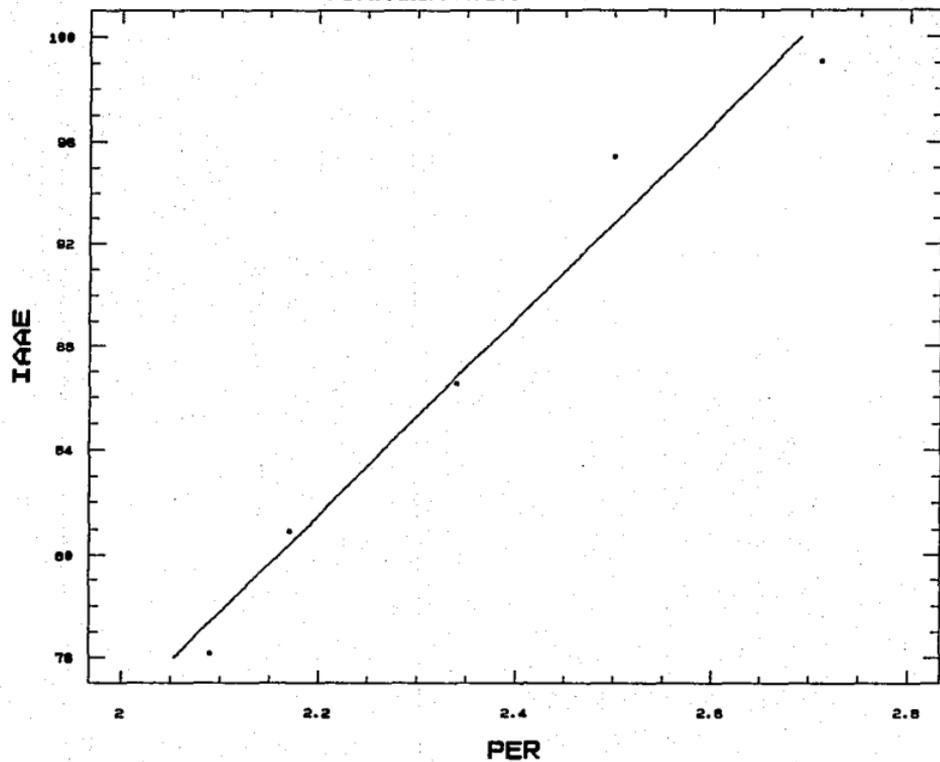


Fig.7

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que tanto la semilla de colorín como la de patol tienen un alto contenido de proteína y de acuerdo al análisis de aminoácidos, el colorín es el que presenta un mejor perfil de aminoácidos y ambos superan al patrón FAO (el patol excepto en azufrados), por lo que las dos semillas destoxificadas se pueden considerar como una fuente adecuada para alimentación animal.

En cuanto al contenido de tóxicos residuales solo se observó una cantidad significativa de inhibidores de tripsina en la semilla de colorín

Con los resultados de las pruebas biológicas, también se puede corroborar que el colorín tiene una mejor calidad proteica, a reserva del contenido de inhibidores de tripsina que presentó.

El IAAE es una prueba química que nos predice un buen resultado en la prueba de PER, debido a que existe una buena correlación entre ambos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sotelo, A. Leguminosas silvestres, reserva de proteínas para la alimentación del fururo .ICYT. Información Científica y Tecnológica. 3 (54) : 28-32. (1981).
- 2.- Raven, P. Erythrina (Fabaceae): Achievements and oportunitites. Lloydia. Vol 37, No. 3. 1974.
- 3.- Krukoff, B. A. and Barneby, R.C. Conspectus of species of the genus Erytrina. Lloydia. Vol.37, No.3. Sep. 1974.
- 4.- Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists published by AOAC, Inc. Herlich, K. (Editor). 15th edition vol. I & II. Arlington 1990. p 17-18, 40-62, 69-83, 1012.
- 5.- Hart, F.L. Análisis moderno de los alimentos. Acribia . Zaragoza. 1971. p. 1 - 9, 13 - 14.
- 6.- Acevedo, R. Elementos metálicos de la vida. ICYT. Información Científica y Tecnológica. 10 (136). 1988. p. 36 - 40.
- 7.- Robinson, D. S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. 1991. p.109 - 193
- 8.- Lucas, F. B. Estudio químico y toxicológico de la semilla de cacahuano(Gliricidia sepium). Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México 1985.
- 9.- Baduí, D. S. Química de los alimentos, 2^{da} edición. Ed. Alhambra Universidad, México 1990. p .108 - 114, 364 - 367.
- 10.-Comejo, B. L. Desarrollo de una fórmula no láctea para niños con intolerancia a la Lactosa. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México 1989. p. 22.
- 11.-Pellett, P.L. and Young, V.R. Nutritional Evaluation of Protein Foods. The United Nations University. Tokio. 1980. p. 1 - 6, 27 - 54.
- 12.-Cambell, J.A. Methodology of protein evaluation. In: the PAG Compendium, Sach, M.Y. Ed. John Wiley & Sons. Vol. D. N.Y. 1975.
- 13.-De Maeyer, E.M. Collaborative study on protein evaluation. In: The PAG Compendium, Sach, M. Y. Ed. John Wiley & Sons. Vol. D. N.Y. 1975.
- 14.-Hurt, H.D.; Forsythe, R.H. and Krieger, C.M. Factor which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method. In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman,M. Ed. Marcel Dekker. Vol. 1. N.Y. 1975.

- 15.-Yang, M.G. and Mickelsen, O. Laboratory animal in nutrition research, In: Methods of Animal Experimentation. Gay, W.I. Ed. Academic Press. N.Y. 1974.
- 16.-Bender, A.E. and Doell, B.M. Biological evaluation of protein a new aspect. Brit J. Nutr. 11. p. 140 - 158. 1975.
- 17.-Sarwar, G. and Mc.Langhian, J.M. Relative net protein ratio method for evaluating protein quality. Nutr. Rep. Int. 23 (6). 1157 - 1166. 1981.
- 18.-Selkurt, E. Fisiología. 3a. edición. Ed. Aleneo, España 1981. cap. 27
- 19.-Church,D.C. and Pond,W.G. Basic Animal Nutrition and Feeding. O & B Books.Oregon.1976. p 84 - 88
- 20.-Kakade, M.L, Rackis, J.J., Meghee, J.E., and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem., 51, 376-382. 1974.
- 21.-Abisch, E. and Reichstein, T. Alkaloid screening (Micromethod). Helv. chem. Acta, 43, 1844-1861. 1960.
- 22.-Fabre, R. y Truhaut, R. Tratado de toxicología. Ed. Paraninfo. Madrid 1976. p. 241-248.
- 23.- Pearson, D. The Chemical Analysis of Foods. Churchill Livingstone. London 1976. p. 330-331.
- 24.-Goldstein, A., Aronow, L and Kalman, S. Principles of Drug Action (the basis of Pharmacology). Harper & Row, Publishers. N.Y. 1969. p. 402-404.
- 25.-Lucas, B. and Sotelo, A. Aminoacid determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hydrolisis methods. Anal. Biochem. 1980. p. 109, 192 - 197.
- 26.-Lucas, B. and Sotelo, A. Effect of different alkalies; temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. Anal. Biochem., 109, 192 - 197. 1980.
- 27.-Mc. Laughlam, J.M. and Kerth, M.O. Broassays for protein quality In: Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman, M. Ed. Marcel Dekker. Vol. 1. N.Y 1975.
- 28.-Food Agricultural Organization. World Healt Organization. Energy and protein requeriments. WHO technical Report Series No. 522. FAO Nutrition Meeting Report Series No. 52. WHO. Geneve, Rome. 1973.
- 29.-Oser, B.L. In protein and aminoacid nutrition (Albanese, A.A. Editor). Academic Press, N.Y. p. 281-295. 1959

- 30.-Helrich, K.(Editor). Official Methods of Analysis of the AOAC. 15th Edition. Published by AOAC. Inc. Vol. II. Arlington 1990. p. 1095 - 1098.
- 31.-Irnegas, A.E. determinación de la calidad proteínica de algunas leguminosas por diferentes métodos biológicos. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Guatemala, C.A.1973.
- 32.-Hurt, H.D., Forsythe, R.M. and Krieger, C.H. Factors which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method. In: Protein Nutritional Quality of Food and Feeds. Friedman, M (Ed) . Vol. I, Marcel Dekker. Inc. N.Y. 1975.
- 33.-Cobin, J. Laboratory nutrition. In: Handbook of Laboratory Animal Science. Melby, E.C. and Altman N.M. (Ed). CRC. Press. Cleveland 1976. p. 3 - 21.
- 34.- Molinar, M. G. Valor energético de diversos alimentos determinado por medio de una bomba calorimétrica y métodos biológicos. Tesis. Universidad La Salle. México 1988. p 44 - 45
- 35.-Hajiev, S., Kerimou, K., Hajieva, F. and Ignat'yeu, V. Advances in experimental thermochemistry (A modern bomb calorimeter). J. Chem. thermodynamics 12, 509-519 (1980).
- 36.- Manual for the Gallenkamp ballistic bomb calorimeter. Gallenkamp & Co. Ltd., p. 1- 11, U.K. (1982).
- 37.-Paquete estadístico "STATGRAPHICS". Versión 5.0. Statistical Graphics System. 2115 East Jefferson Street, Rockville, MD 20852. 1991.
- 38.-Jiménez, V. L. Eliminación de los componentes toxicos de dos semillas del género Erythrina y su evaluación bromatológica. Tesis. UNAM . México 1993.
39. Lucas, B. y Sotelo, A. Evaluación de la calidad proteínica de semillas de Erythrina. XII Congreso Mexicano de Botánica. Merida, Yucatán. 1993.