

31  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA  
Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS  
PROTEINICOS, LIBRES Y RAROS POR HPLC EN  
CUATRO ESTADOS DE MADURACION EN EL FRUTO  
ERYTHRINA AMERICANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
MARCELA RAQUEL ZENDEJAS GARCIA



MEXICO, D. F.,

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**JURADO ASIGNADO**

Presidente : Prof. SOTELO LOPEZ ANGELA  
Vocal : Prof. ITURBE CHIÑAS FRANCISCA  
Secretario : Prof. HERNANDEZ INFANTE MIGUEL  
1er. suplente : Prof. CORNEJO BARRERA LUCIA  
2do. suplente : Prof. GARCIA VALDES JOSE DE JESUS

Sitio donde se desarrolló el tema :

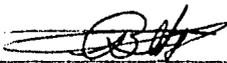
Laboratorio 111, Departamento de Farmacia. Conjunto E, Facultad de Química,

UNAM. Dirección: Cd: Universitaria, Circuito Interior, C.P. 04510.

Asesor del tema :

  
M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ

Supervisor técnico :

  
M. en C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

Sustentante :

  
MARCELA RAQUEL ZENDEJAS GARCIA

## AGRADECIMIENTOS

- ◆ A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución que me brindó una educación como profesionista.
- ◆ A todos los maestros que compartieron sus conocimientos conmigo desde el inicio de mis estudios.
- ◆ A la M. en C. Angela Sotelo, mi más sincero agradecimiento por su excelente dirección. Ha sido un honor trabajar con usted.
- ◆ Al M. en C. Bernardo Lucas, le agradezco su asesoría técnica, el ser un buen amigo y el mejor compañero de trabajo.
- ◆ Al Ing. Carlos Rodríguez le brindo un reconocimiento por ser un gran ejemplo como profesionista. Mil gracias por haber sido mi tutor en formación de profesores y por su amistad.
- ◆ Siempre recordaré con mucho cariño a todos los compañeros y amigos de la Facultad y del laboratorio !!!.

## DEDICATORIAS

- ◆ Dedico especialmente esta tesis a mi mamá. Sin su amor, comprensión y apoyo en todo momento, no sería la persona que soy ahora. Espero que siempre estés a mi lado.
- ◆ Siento que es un buen momento para recordarte papá, que eres para mi el mejor padre del mundo y mi mejor amigo. Te dedico esta tesis con todo mi amor, porque también es tuya.
- ◆ Porque siempre llevo en mi corazón a mis hermanos: Pilar, Carolina, Luis, Tania y José Emiliano.
- ◆ A mis abuelitas Manola y Nico. Para mí han sido todo el tiempo amor y dulzura.
- ◆ No terminaría de nombrar a mis tíos y primos. Les quiero a todos.
- ◆ José Luis Vega Alvarez, tu recuerdo ha sido un ejemplo para seguir adelante.

## INDICE

### **I. INTRODUCCION 1**

### **II. OBJETIVOS 2**

### **III. GENERALIDADES 3**

#### **I. AMINOACIDOS 3**

1.1. Estructura de los aminoácidos 3

1.2. Clasificación 4

1.3. Estereoisomería 7

1.4. Comportamiento de los aminoácidos como electrolitos 8

1.5. Biosíntesis de aminoácidos 8

1.6. Los aminoácidos como precursores de numerosas biomoléculas 10

1.7. Reacciones químicas de aminoácidos y proteínas 11

#### **2. PROTEINAS 20**

2.1. Concepto y papel funcional 20

2.2. Formación del enlace peptídico 21

2.3. Fuerzas que determinan la conformación espacial de las proteínas 22

2.4. Elementos estructurales en la conformación de las proteínas 23

2.5. Desnaturalización 24

2.6. Propiedades funcionales de las proteínas 25

2.7. Propiedades nutritivas de las proteínas 26

2.8. Cuantificación de proteína 28

2.9. Nitrogeno no proteico 29

2.10. Determinación de proteína verdadera	31
<b>3. LEGUMINOSAS</b>	<b>31</b>
3.1. Importancia de las leguminosas en el mundo actual	32
3.2. Especie Erythrina americana	33
3.3. Aspectos relevantes de las proteínas	35
3.4. Desarrollo en semillas de leguminosas	36
3.5. Consideraciones nutricionales	39
3.6. Consideraciones acerca de la utilización de leguminosas en la alimentación	42
3.7. Sustancias tóxicas y antinutricionales de las leguminosas	45
<b>4. AMINOACIDOS RAROS O NO PROTEINICOS</b>	<b>49</b>
4.1. Posibles orígenes de los aminoácidos raros	49
4.2. Valor potencial de aminoácidos raros en estudios comparativos	50
4.3. Posible significado biológico	50
4.4. Su acción como antimetabolitos	52
4.5. Aminoácidos no-proteinicos de interés en la familia de las leguminosas	53
<b>5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION</b>	<b>56</b>
5.1. Aspectos relevantes del análisis de alimentos por HPLC	56
5.2. Determinación de aminoácidos	57
5.3. Proceso cromatográfico	59
5.4. Tipos de cromatografía	60
5.5. Instrumentación básica	65
5.6. Gradientes de elución	68

5.7. Análisis cualitativo	68
5.8. Análisis cuantitativo	69
5.9. Precisión en el análisis de aminoácidos	70
<b>IV. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>72</b>
1. PREPARACION DE MUESTRA Y ANALISIS PRELIMINARES	72
2. DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA	73
3. ANALISIS DE AMINOACIDOS POR HPLC	75
3.1. Cuantificación de aminoácidos por hidrólisis ácida	75
3.2. Extracción de aminoácidos libres por HPLC	79
3.3. Condiciones para el análisis de aminoácidos por HPLC	81
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>86</b>
1. Humedad, grasa cruda, proteína total y proteína verdadera	86
2. Aminoácidos	95
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>105</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>106</b>

## I. INTRODUCCION

En los países pobres localizados principalmente en las zonas tropicales del planeta, se observa escasez de alimentos, por lo que, con la finalidad de disminuir este problema podrían incluir en su dieta algunas leguminosas silvestres, por las siguientes razones: son de distribución universal, de las 13, 000 especies reconocidas en la familia *Leguminosae* solamente un número limitado de ellas son de importancia comercial, en el reino vegetal presentan un mayor porcentaje de proteína, son un suplemento natural de los cereales y son fácilmente almacenables.

En México la flora silvestre ofrece gran potencial en la alimentación, debido a que existe un número considerable de especies posiblemente útiles que no han sido estudiadas. Una leguminosa silvestre mexicana es la *Erythrina americana* conocida comúnmente como colorín, crece en regiones tropicales y semitropicales, sobre terrenos medianamente fértiles y se propaga fácilmente.

La flor de *E. americana* se utiliza como alimento en algunas regiones de la República mexicana. Las semillas podrían ser una nueva fuente de proteína debido a que el porcentaje mayoritario de sus compuestos nutricionales corresponde a la proteína verdadera. Sin embargo, actualmente no se utiliza como alimento, porque además de los factores tóxicos que normalmente se encuentran en las leguminosas de consumo universal, contienen alcaloides y aminoácidos raros. Los alcaloides son peligrosos para la salud, por lo que es necesario implementar una tecnología efectiva de destoxificación para una utilización futura. De los aminoácidos raros poco se sabe en cuanto al papel que desempeñan. Se piensa que en

el caso de *E. americana* pueden ser parte de la poza metabólicamente activa.

Debido a que se ha encontrado un patrón de desarrollo similar en todas las leguminosas que han sido examinadas, en el presente trabajo se estudiaron los cambios de concentración de nitrógeno proteínico, nitrógeno no proteínico, aminoácidos hidrolizados y libres a través de cuatro estados de maduración del fruto *E. americana*. Esto con el objeto de conocer más sobre la biogénesis de estos compuestos y la movilización de los mismos.

Pensando a futuro, es importante el estudio de la calidad de proteína en este tipo de especies, ya que la ingeniería genética puede permitir en algunos años, la transferencia de genes estructurales de una especie a otra que codifiquen para las proteínas de almacenaje.

## II. OBJETIVO

Conocer los cambios en concentración de proteína verdadera, aminoácidos proteínico, libres y raros, durante cuatro diferentes estados de maduración del fruto *E. americana* a partir de la flor, que proporcionarán información sobre la movilización de estos compuestos durante el proceso fisiológico del fruto en esta leguminosa.

### III. GENERALIDADES

#### I. AMINOACIDOS

##### 1.1. ESTRUCTURA DE LOS AMINOACIDOS

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas. Por lo tanto, para lograr un conocimiento adecuado de las propiedades de éstas, es preciso saber el comportamiento y estructura de los mismos.

*Tabla 1*

#### DENOMINACION TRIVIAL, ABREVIADA Y SISTEMÁTICA DE LOS

##### $\alpha$ - AMINOACIDOS

Trivial	3 letras	1 letra	Sistemática
Alanina	Ala	A	ác. 2-aminopropanoico
Arginina	Arg	R	ác. 2-amino-5-guanidinopropanoico
Asparagina	Asn	N	ác. 2-amino-3-carbamilpropanoico
Acido aspártico	Asp	D	ác. 2-aminobutanodioico
Cisteína	Cys	C	ác. 2-amino-3-mercaptopropanoico
Glutamina	Gln	Q	ác. 2-amino-4-carbamilbutanoico
Acido glutámico	Glu	E	ác. 2-aminopentanodioico
Glicina	Gly	G	ác. aminoetanoico
Histidina	His	H	ác. 2-amino-3-(1 H-imidazol-4-il) propanoico
Isoleucina	Ile	I	ác. 2-amino-3 metilpentanoico
Leucina	Leu	L	ác. 2-amino-4-metilpentanoico
Lisina	Lys	K	ác. 2,6-diaminohexanoico
Metionina	Met	M	ác. 2-amino-4-(metiltio) butanoico
Fenilalanina	Phe	F	ác. 2-amino-3-fenilpropanoico
Prolina	Pro	P	ác. pirrolidin-2-carboxílico
Serina	Ser	S	ác. 2-amino-3-hidroxiopropanoico
Treonina	Thr	T	ác. 2-amino-3-hidroxi-butanoico
Triptofano	Trp	W	ác. 2-amino-3-(1 H-indol-3-il) propanoico
Tirosina	Tyr	Y	ác. 2-amino-3-(4-hidroxifenil) propanoico
Valina	Val	V	ác. 2-amino-3-metilbutanoico

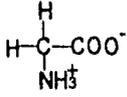
Desde el descubrimiento de la asparagina como primer aminoácido en 1806, pasaron ciento treinta y dos años hasta que se encontró la treonina en 1938, cerrando la lista de veinte aminoácidos que se presentan habitualmente en las proteínas. Todos ellos son  $\alpha$ -aminoácidos, puesto que poseen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos a un mismo átomo de carbono ( $C_2$ ), que se encuentra en posición alfa con relación al primer carbono ( $C_1$ ). Se diferencian entre sí por el resto de la cadena lateral R, que puede ser radical alquilo o arilo, o un grupo heterocíclico.

Los aminoácidos se denominan por nombres triviales o comunes, fruto del material donde se aislaron por primera vez. Tales nombres han dado lugar a símbolos de tres letras, integrados por una mayúscula seguida por dos minúsculas, que los identifican. En las técnicas modernas de secuenciación de proteínas se ha hecho aconsejable la anotación de los aminoácidos por una sola letra mayúscula. Tabla 1. (Fennema, 1990. Herrera, 1993).

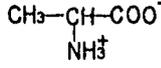
## 1.2. CLASIFICACION

La clasificación más extendida es la que los agrupa en familias, atendiendo a la propiedades fisicoquímicas de su cadena lateral R. Según este criterio, se dividen en aminoácidos cuyo grupo R es no polar hidrofóbico (glicina, alanina, prolina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptofano y metionina) y aquellos cuya cadena lateral R tiene naturaleza polar, que se divide a su vez en tres clases: R hidrófila neutra (Serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina y tirosina), R hidrófila ácida (ácido aspártico y ácido glutámico) y R hidrófila básica (lisina, arginina e histidina).

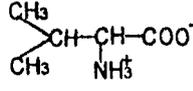
R NO POLAR



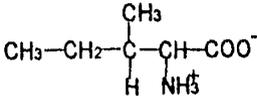
GLICINA



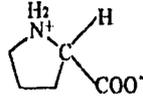
ALANINA



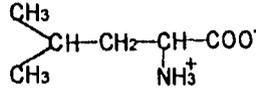
VALINA



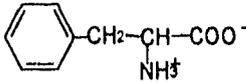
ISOLEUCINA



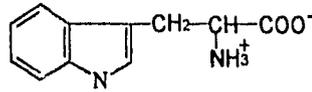
PROLINA



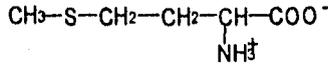
LEUCINA



FENILALANINA

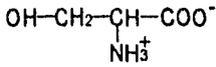


TRIPTOFANO

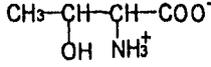


METIONINA

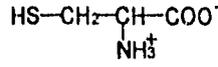
R POLAR NEUTRA



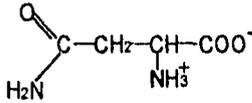
SERINA



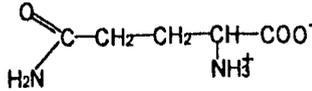
TREONINA



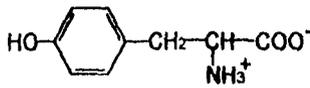
CISTEINA



ASPARAGINA

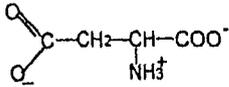


GLUTAMINA

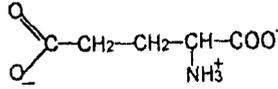


TIROSINA

R POLAR ACIDA

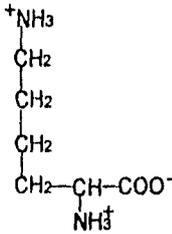


ACIDO ASPARTICO

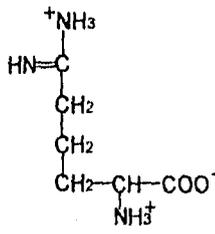


ACIDO GLUTAMICO

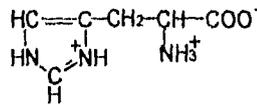
R POLAR BASICA



LISINA



ARGININA



HISTIDINA

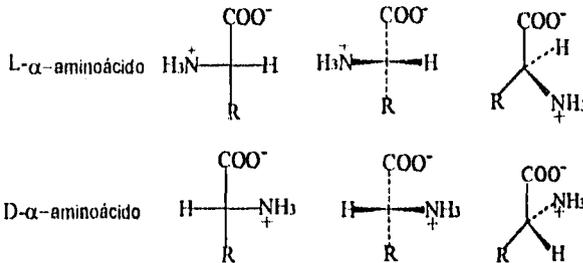
Además de los 20 aminoácidos fundamentales, es relativamente frecuente encontrar en las estructuras proteicas algunos derivados sustituidos, como la hidroxiprolina o la hidroxilisina, o dímeros oxidados, como la cistina. Tales aminoácidos modificados no son codificados, sino que son producto de transformaciones estructurales de las proteínas una vez que han sido sintetizadas sobre el molde de mRNA. Además, en la célula se encuentran

multitud de moléculas con estructura de aminoácido que no forman parte de las proteínas y que desempeñan importantes papeles en el metabolismo intermedio (Herrera, 1993).

### 1.3. ESTEREOISOMERIA

Con excepción de la glicina, el átomo de carbono en posición  $\alpha$  de todos los aminoácidos tiene un radical diferente por cada una de sus cuatro valencias, por lo que tiene carácter asimétrico. Esto hace que existan dos isómeros enantiomorfos o enantiómeros, D y L.

#### ESTEREOISOMERISMO DE LOS AMINOACIDOS



Los aminoácidos presentes en las proteínas naturales corresponden siempre a la configuración L. De hecho, la célula posee enzimas estereoespecíficas que sintetizan los estereoisómeros L de los aminoácidos, gracias al ordenamiento asimétrico de sus sitios activos. La estereoisomería causa que los aminoácidos presenten propiedades ópticas, pudiendo desviar el plano de la luz polarizada.

Cuando se sintetiza un aminoácido mediante reacciones químicas no biológicas los estereoisómeros D y L se forman a la misma velocidad, por lo que se obtiene una mezcla

equimolecular de ambos o racemato.

La glicina no tiene C asimétrico y, por tanto, no presenta estereoisómeros. Diecisiete de los 20 aminoácidos presentan dos enantiómeros porque su  $C_{\alpha}$  es asimétrico. La treonina y la isoleucina tienen dos centros quirales, por lo que cada uno de ellos puede existir en cuatro configuraciones, o diestereoisómeros diferentes, cada uno con actividad óptica característica.

#### 1.4. COMPORTAMIENTO DE LOS AMINOACIDOS COMO ELECTROLITOS

Los aminoácidos tienen carácter anfótero, ya que, debido a sus grupos ionizables, se comportan como ácidos o como bases en solución acuosa. Cuando el grupo amino y el carboxilo, se encuentran ionizados en solución neutra constituyen un ion dipolar o zwitterión.

Tabla 2.

El pH fisiológico 7.4 es un valor relativamente cercano al punto isoeléctrico (pI) de dichos aminoácidos, por lo que el pI es el punto de mínima solubilidad de aminoácidos y proteínas. Podría pensarse que estos aminoácidos deberían cristalizar en los tejidos; sin embargo, esto no ocurre por la distribución ordenada de cargas positivas y negativas que determinan que los aminoácidos se comporten como potentes dipolos solubles en agua, aunque menos solubles que las formas iónicas correspondientes (Herrera, 1993).

#### 1.5. BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS

El flujo de nitrógeno hacia los aminoácidos comienza con la reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  realizada por los microorganismos fijadores de nitrógeno como las bacterias y algas verdes-

azuladas. Algunos de estos microorganismos como las bacterias simbióticas *Rhizobium* invaden la raíz de las plantas leguminosas y forman nódulos radiculares, en los que tiene lugar la fijación de nitrógeno que va a ser utilizado tanto por la bacteria como por la planta. Los animales superiores son incapaces de convertir el  $N_2$  en esta forma.

Tabla 2

VALORES DE pK PARA LOS GRUPOS IONIZABLES DE LOS AMINOACIDOS

(A 25° C)

Aminoácido	pK <sub>1</sub> (-COOH)	pK <sub>2</sub> (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	Aminoácido	pK <sub>1</sub> (-COOH)	pK <sub>2</sub> (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	pK <sub>R</sub> (R)
Glicina	2,34	9,60	A. aspártico	2,09	9,82	3,86
Alanina	3,35	9,69	A. glutámico	2,19	9,67	4,25
Prolina	1,95	10,64	Lisina	2,18	8,95	10,53
Valina	2,32	9,62	Arginina	2,17	9,04	12,48
Leucina	2,36	9,60	Histidina	1,82	9,17	6,00
Isoleucina	2,36	9,68	Cisteína	1,71	10,78	8,33
Fenilalanina	1,83	9,13	Tirosina	2,20	9,11	10,07
Triptofano	2,38	9,38				
Metionina	2,28	9,21				
Serina	2,21	9,15				
Treonina	2,09	9,10				
Asparagina	2,02	8,80				
Glutamina	2,17	9,13				

El  $NH_4^+$  se asimila después a través de los aminoácidos, vía glutamato y glutamina, que son dos moléculas cruciales en el metabolismo nitrogenado. El grupo  $\alpha$ -amino de la mayoría de los aminoácidos procede del grupo  $\alpha$ -amino del glutamato, por transaminación. La glutamina, es el otro compuesto importante que aporta el nitrógeno de su cadena lateral a la biosíntesis de una amplia gama de compuestos biológicos.

De la serie fundamental de veinte aminoácidos, doce se sintetizan a partir del ciclo del ácido cítrico y otros intermediarios importantes mediante reacciones muy sencillas, mientras que las vías para la formación de los esenciales son muy complejas. El hombre debe obtener el último grupo de ocho aminoácidos de los alimentos de la dieta, y por eso se llaman aminoácidos indispensables (Stryer, 1988).

#### 1.5.1. REGULACION EN LA BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS

La velocidad de síntesis de los aminoácidos depende principalmente de las cantidades de enzimas biosintéticas y de sus actividades enzimáticas.

La primera reacción irreversible en una vía biosintética, llamada etapa comprometida o crucial, es generalmente un punto importante de regulación. El producto final (Z) de esta vía con frecuencia inhibe la enzima que cataliza el paso comprometido ( $A \rightarrow B$ ). Este tipo de control es esencial para la conservación de los precursores y de la energía metabólica. Se han encontrado varios mecanismos de control en las vías biosintéticas bifurcadas.

#### 1.6. LOS AMINOACIDOS COMO PRECURSORES DE NUMEROSAS BIOMOLECULAS.

Los aminoácidos son las unidades integrantes de proteínas y péptidos. También sirven como precursores de muchos tipos de moléculas pequeñas que tienen misiones biológicas importantes. Las purinas y las pirimidinas son derivadas, en parte, de los aminoácidos. El extremo reactivo de la esfingosina, un intermediario en la síntesis de esfingolípidos, procede de la serina. La histamina, un vasodilatador potente, deriva por

descarboxilación de la histidina. La tirosina es un precursor de las hormonas tiroxina (tetraiodotironina), adrenalina (epinefrina) y de la melanina, que es un pigmento polimérico. El neurotransmisor, 5-hidroxitriptamina (serotonina) y el anillo nicotinamida del NAD<sup>+</sup> se sintetizan a partir de triptofano. La glutamina proporciona el grupo amida de la nicotinamida. (Stryer, 1988).

## 1.7. REACCIONES QUIMICAS DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

En los aminoácidos y las proteínas se hallan grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo, indol e imidazol, además, del imino y carbonilo del enlace peptídico. Estos grupos funcionales son capaces de reaccionar con otros compuestos del medio y entre si originando enlaces inter o intramoleculares, todo lo cual determina, en cierto modo, las propiedades físicas y químicas de las proteínas.

### 1.7.1. REACCIONES DEBIDAS AL GRUPO $\alpha$ -CARBOXILO

Los grupos  $\alpha$ -carboxilo de todos los  $\alpha$ -aminoácidos pueden participar en reacciones orgánicas que originen amidas, ésteres y halogenuros de acilo. La esterificación con alcohol etílico se desarrolla de acuerdo a la forma siguiente:



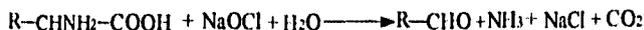
También es posible reducir los grupos  $\alpha$ -carboxilo al correspondiente alcohol.



Los aminoácidos también pueden experimentar descarboxilación por vías enzimáticas, lo cual originará las correspondientes aminas, aunque esta reacción es factible por acción del calor, ácidos, bases y reactivos especiales, tales como la ninhidrina.

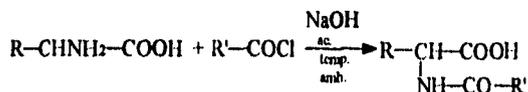


Los aminoácidos se transforman en aldehidos en presencia de agentes oxidantes energéticos.

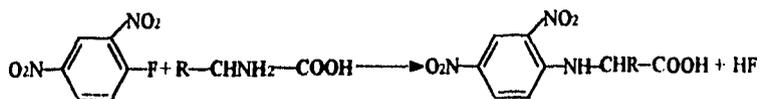


### 1.7.2. REACIONES DEL GRUPO AMINO

La acilación del grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos, por acción de los halogenuros de ácido y anhídridos, conduce a la formación de acilaminoácidos.



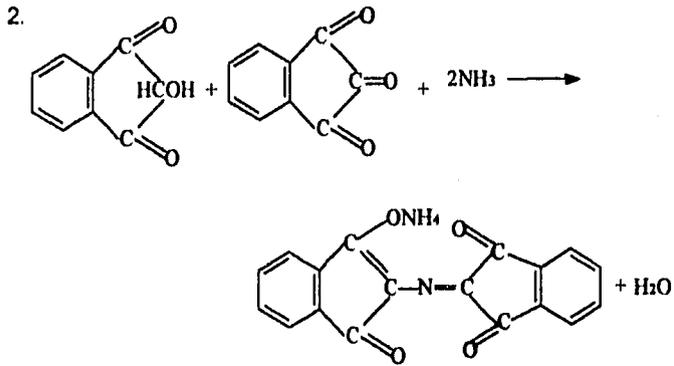
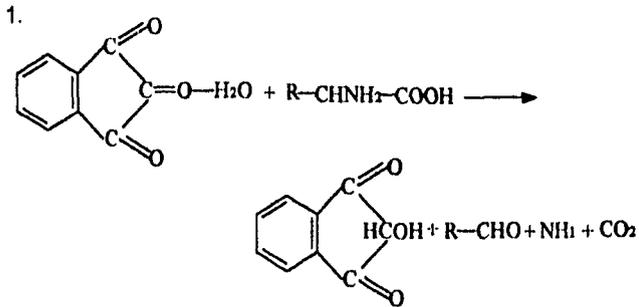
Por la acción del 1-fluoruro-2,4-dinitrobenzeno (reactivo de Sanger) se produce arilación de los grupos  $\alpha$ -amino. Con esta reacción se marcan cuantitativamente los grupos amino de aminoácidos, péptidos y proteínas así como la secuencia de las mismas.



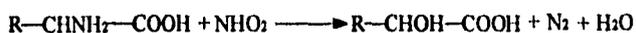
Los derivados del 2,4-dinitrofenol, amarillos y denominados DNP-aminoácidos, se forman con los grupos amino terminales o con los  $\epsilon$ -amino de la lisina. Estos derivados se

separan fácilmente mediante métodos cromatográficos, con lo que se determina la naturaleza de los aminoácidos terminales de péptidos y proteínas.

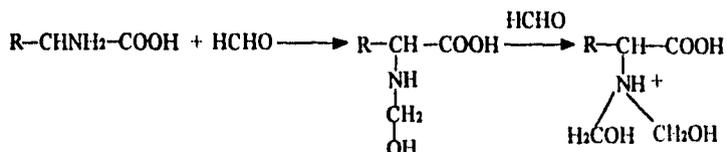
La reacción con la ninhidrina es característica del grupo  $\alpha$ -amino, y por acción del calor se origina un producto intensamente coloreado de azul, que permite estimar cuantitativamente pequeñas cantidades de aminoácidos en solución o en tiras de papel. Sin embargo, en el caso particular de la prolina e hidroxiprolina, se obtienen unos productos de reacción con una característica coloración amarilla.



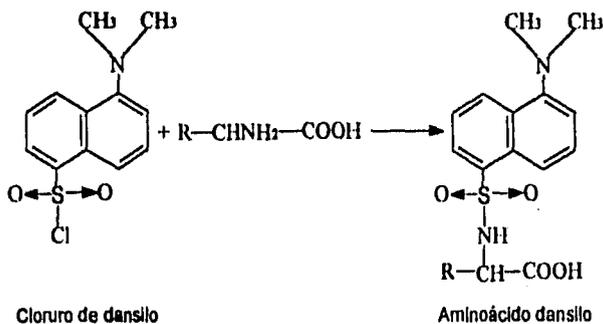
A temperatura ambiente, el grupo  $\alpha$ -amino reacciona con el ácido nitroso y se libera un mol de nitrógeno por mol de aminoácido.



También se emplea el formol como reactivo para determinar grupos  $\alpha$ -amino, tal como se indica a continuación.

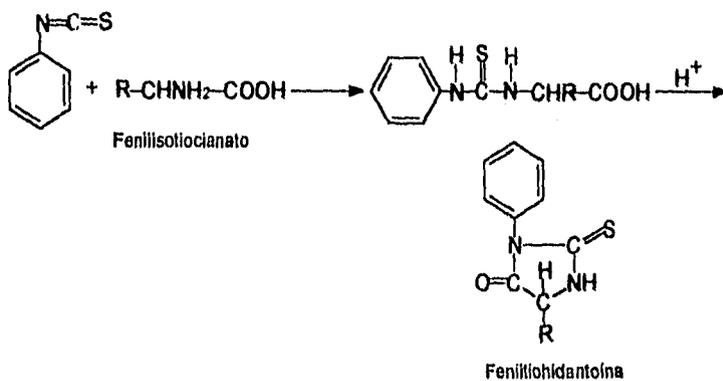


Se ha estudiado así mismo una reacción similar a la de 1-fluoruro-2,4-dinitrobenceno, con el fin de conocer los aminoácidos terminales de péptidos y proteínas. En esta ocasión, el reactivo es el cloruro de aminodimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo (o cloruro de dansilo) que como es sumamente fluorescente, los derivados que se forman son detectables, aunque estén en muy pequeñas cantidades, mediante la aplicación de métodos fluorométricos.

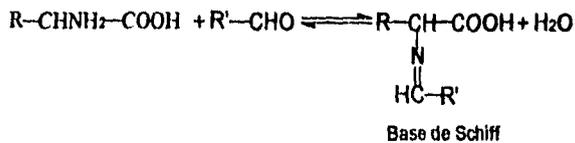


Los  $\alpha$ -aminoácidos reaccionan cuantitativamente con fenilisotiocianato para producir los correspondientes feniltiocarbamilaminoácidos

La formación de compuestos cíclicos derivados de la feniltiohidantoína, se desarrolla en un medio con nitrometano y por acción de un ácido. Este es el fundamento de la reacción de Edman, muy utilizada para determinar la secuencia de aminoácidos en péptidos y proteínas. A pesar de que las feniltiohidantoínas son incoloras, se separan fácilmente mediante procedimientos cromatográficos.

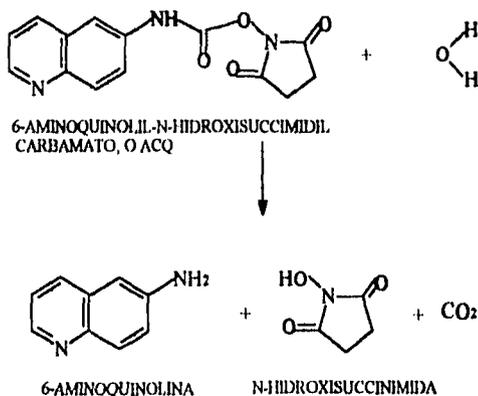


Por otro lado, la reacción entre aminoácidos (por su grupo  $\alpha$ -amino) y aldehidos origina las llamadas bases de Schiff, reacción reversible debido a que los productos son muy lábiles. Estos productos surgen en los procesos de pardeamiento no enzimático.

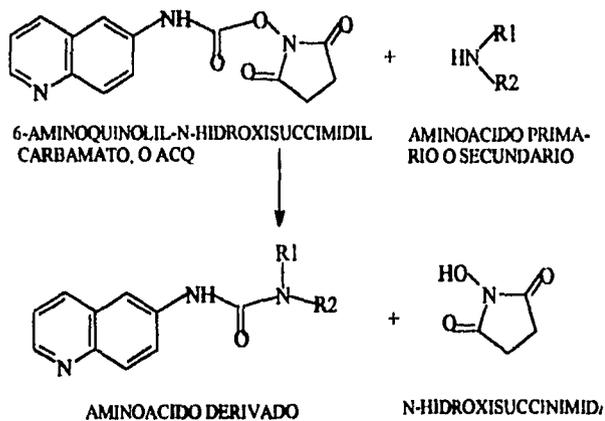


Al reaccionar el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato y un aminoácido primario o secundario se forma un derivado con propiedad de fluorescencia y la N-hidroxisuccinimida. Esta reacción es importante, porque constituye la clave para entender el método de separación y detección de aminoácidos utilizado en el presente trabajo.

#### HIDROLISIS DEL REACTIVO



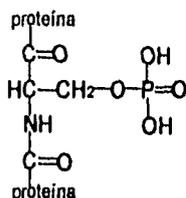
#### REACCION DE DERIVATIZACION



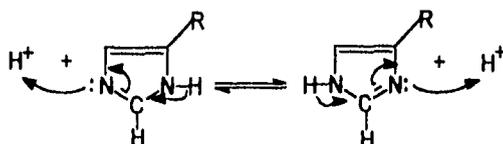
La hidrólisis del 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccimidil carbamato se describió en la figura anterior, debido a que el reactivo se debe mantener aislado del agua (inclusive de la atmosférica) antes de que se lleve a cabo la reacción de derivación. Es necesario mencionar que la 6-aminoquinolina también es un producto fluorescente y se detecta al principio del aminograma.

### 1.7.3. REACCIONES DEBIDAS A LOS GRUPOS R.

Las propiedades físicas y químicas de las proteínas están fuertemente condicionadas por los radicales o cadenas de los distintos aminoácidos. También los grupos hidroxilo de la serina, treonina e hidroxiprolina ocasionan la formación de enlaces éster.



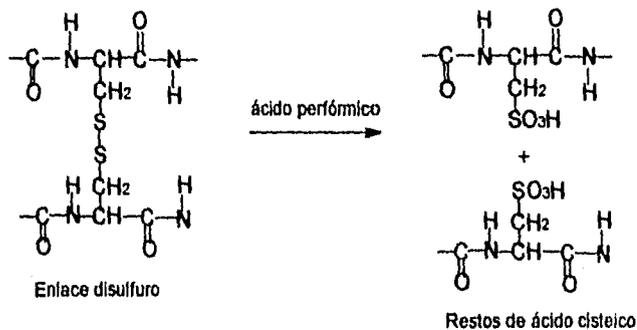
El grupo fenólico de la tirosina contribuye a las propiedades ácidas y además es acetilable. También los grupos carboxílicos que no participan en los enlaces peptídicos, concretamente los del aspártico y glutámico, confieren acidez a la proteína. El grupo imidazólico de la histidina puede actuar como ácido o base y generalmente se halla en los



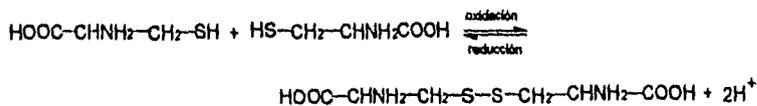
centros activos de las enzimas. Por el contrario, el grupo guanidínico de la arginina contribuye a las propiedades básicas de las proteínas. A este grupo guanidínico se debe la coloración roja que posee el producto de reacción entre la arginina, el  $\alpha$ -naftol y el hipoclorito de sodio y éste es precisamente el fundamento de la reacción de Sakaguchi.



Los oxidantes fuertes, como el ácido perbórico ( $\text{HCOOOH}$ ) son capaces de romper el enlace disulfuro con formación de ácido cisteico.



El grupo sulfhidrilo de la cisteína, a pesar de su débil acidez, es extremadamente reactivo y desempeña un papel importante en la formación de enlaces cruzados en la

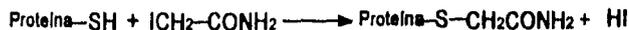


estructura de las proteínas, debido al establecimiento de puentes disulfuro.

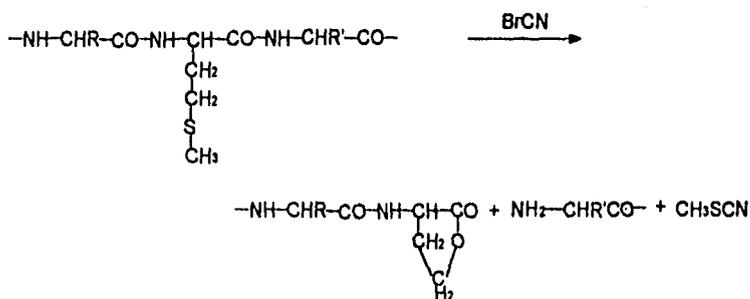
También los grupos sulfhidrilo de las cisteínas son parte constitutiva de los centros activos de algunas enzimas. Los compuestos que tienen grupos sulfhidrilo pueden modificar en algunas ocasiones la actividad biológica de los metales pesados.



Algunos compuestos iodados, tales como el ácido yodoacético o su amida, provocan una reacción de alquilación irreversible en los grupos sulfhidrilo de las proteínas.



El bromuro de cianógeno reacciona de manera específica con los restos de metionina de los péptidos (Fennema, 1990. Bohinsky, 1987).



## 2. PROTEINAS

### 2.1. CONCEPTO Y PAPEL FUNCIONAL

Proteína es una palabra propuesta por Jones J. Berzelius en 1838. Proviene de la palabra griega proteios, que significa de primera clase. Las proteínas tienen una amplia gama de funciones, tales como el transporte y el almacenamiento, el movimiento coordinado, el soporte mecánico, la protección inmune, la excitabilidad, la integración del metabolismo, el control de la diferenciación y el crecimiento. Son moléculas de gran tamaño, complejidad y diversidad, y son la fuente, a través de la dieta, de los aminoácidos esenciales y de los no esenciales necesarios para el crecimiento, mantenimiento y reproducción de los organismos vivos. Constituyen el 50% o más del peso seco de las células.

Las proteínas de todas las especies, desde las bacterias hasta el hombre, están construidas a partir de un conjunto idéntico de 20 aminoácidos. La secuencia definida de nucleótidos en los ácidos nucleicos determina, sobre la base de lenguaje universal del código genético, la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica. Desde el punto de vista estructural, esta secuencia de aminoácidos define un eje central, o esqueleto de las proteínas que resulta de la condensación de  $\alpha$ -aminoácidos de la serie L por una unión de tipo amida que se repite sin ninguna variación.

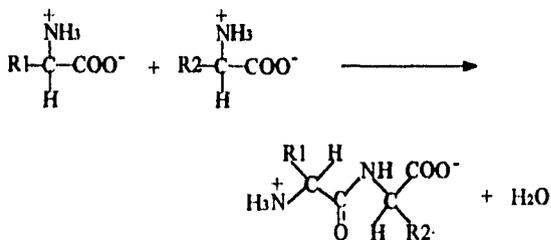
La diversidad informativa y funcional que existe entre las distintas proteínas viene impuesta por las cadenas laterales de los aminoácidos, que son sillares moleculares de construcción diferente en tamaño, forma, carga, capacidad de enlace de hidrógeno y de actividad química. Pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de aminoácidos que las conforman.

El término oligopéptido se reserva para las moléculas que tienen 2 a 20 aminoácidos; el de polipéptido para las que tienen de 20 a 50 y el de proteína, para las cadenas de mayor número de aminoácidos (Fennema, 1990. Herrera, 1993. Stryer, 1988).

## 2.2. FORMACION DEL ENLACE PEPTIDICO

Los polipéptidos y las proteínas se forman por condensación de aminoácidos en los ribosomas de las células. La polimerización se basa en la formación de enlaces amida entre el grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido y el  $\alpha$ -carboxilo de otro, con la liberación de una molécula de agua. El crecimiento de la cadena se realiza desde el extremo  $\text{NH}_3^+$  inicial hacia el  $\text{COO}^-$  terminal.

### ENLACE PEPTIDICO



La formación del enlace peptídico requiere la hidrólisis de cuatro enlaces ricos en energía procedentes del ATP y del GTP con una liberación de energía libre de  $\approx 25$  kcal/mol. Parte de esa energía se utiliza en la formación del enlace ( $\approx 5$  kcal/mol), mientras el resto se emplea en la traducción del mRNA.

### 2.3. FUERZAS QUE DETERMINAN LA CONFORMACION ESPACIAL DE LAS PROTEINAS

La conformación espacial de las proteínas viene impuesta por la secuencia de los aminoácidos en la cadena. El proceso de plegamiento es energéticamente favorable, y las fuerzas que lo gobiernan o controlan se encuentran circunscritas a la cadena polipeptídica y al medio acuoso en la que ésta se encuentra.

TABLA 3

#### FUERZAS NO COVALENTES QUE DETERMINAN LA CONFORMACION PROTEICA

Tipo de fuerza	Tipo de interacción	Energía de interacción (Kcal/mol)	$\Delta G_{unf.}$ agua $\rightarrow$ etanol (Kcal/mol)
Electrostática	carga-carga	-5	-
	carga-dipolo	-	-
	dipolo-dipolo	+0,3	-
Van der Waals	atractivas	-0,03	-
	repulsivas	-	-
Puente de hidrógeno	en hielo	-4	-
	en proteínas	-3	-
Hidrofóbica o entrópica	R(fenilalanina)	-	-2,5
	R(triptofano)	-	-3,4
	R(tirosina)	-	-2,3

#### 2.3.1. FUERZAS NO COVALENTES

Este tipo de fuerzas son de uno o tres órdenes de magnitud más débiles que las correspondientes al enlace covalente. La tabla 3 resume las cuatro fuerzas no covalentes de

interés que concurren en el proceso de plegamiento de las proteínas.

### 2.3.2. FUERZAS COVALENTES

El único tipo de fuerza covalente implicado en la conformación de las proteínas es el puente disulfuro (S-S) que se establece entre restos de cisteína de una misma cadena o bien entre cadenas proteicas distintas. Su formación *in vivo* es un proceso catalizado con una enzima de membrana que actúa con la cistaminaoxidada como sustrato. Los puentes disulfuro son de importancia en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas (Herrera, 1993).

### 2.4. ELEMENTOS ESTRUCTURALES EN LA CONFORMACION DE LAS PROTEINAS

Los conocimientos actuales permiten considerar seis niveles de organización estructural de las proteínas, los cuales son: la estructura primaria, que constituye la secuencia de aminoácidos; la estructura secundaria, que es la disposición regular del esqueleto polipeptídico (también llamada grupo lineal); las estructuras supersecundarias, que son agregados físicos preferenciales de estructura secundarias; los dominios estructurales, que son parte de la proteína con regiones globulares bien diferenciadas; la estructura terciaria, que corresponde a la estructura tridimensional de la proteína globular y, finalmente, la estructura cuaternaria o agregados proteicos, que corresponde al nivel de máxima complejidad estructural y resulta de la asociación de proteínas globulares para formar agregados (Herrera, 1993).

## 2.5. DESNATURALIZACION

Determinados tratamientos, no excesivamente energicos modifican de manera importante la estructura de las proteínas, perdiéndose, las estructuras, secundaria, terciaria y cuaternaria, sin que haya una hidrólisis del enlace peptídico. Los enlaces principalmente afectados son los de hidrógeno, los hidrófobos, los iónicos y en ocasiones los disulfuro. Como consecuencia de este proceso se presentan las siguientes modificaciones: a) mayor sensibilidad del enlace peptídico a los fenómenos de hidrólisis provocados por enzimas proteolíticas; b) disminución de la solubilidad; c) descenso o incluso pérdida de la actividad enzimática; d) imposibilidad de cristalización; e) aumento de la viscosidad intrínseca y, f) aumento del poder rotatorio específico de la proteína.

### 2.5.1 AGENTES FISICOS

La susceptibilidad de la proteína a la desnaturalización por el calor depende de factores como: contenido de agua, fuerza iónica, pH de la solución y la naturaleza de los iones presentes. Las presiones elevadas ( $1000 \text{ kg/ cm}^2$ ), provocan la desnaturalización de las proteínas, debido a que se modifican las estructuras de las moléculas y adquieren mayor densidad. Las radiaciones ultravioletas inactivan determinadas enzimas y disminuyen la solubilidad de ciertas proteínas.

### 2.5.2. AGENTES QUIMICOS

El pH del medio tiene gran importancia en los fenómenos de desnaturalización de proteínas. La mayoría de las proteínas son estables en un reducido intervalo de pH. Si estos

cambios no son excesivos, la proteína puede adquirir de nuevo su configuración normal cuando se restablece el valor de pH óptimo.

Altas concentraciones de solutos (6-8 M), tales como urea o guanidina, ocasionan la rotura de enlaces de hidrógeno y, en último término la desnaturalización de la proteína.

Los detergentes sintéticos son los agentes más enérgicos para causar la desnaturalización, debido a su propiedad de neutralizar los grupos hidrófilos e hidrófobos, bloqueando así las fuerzas necesarias para el mantenimiento de la estructura. Los disolventes orgánicos, tales como acetona o alcohol, consiguen la desnaturalización, aunque es posible disminuir los efectos trabajando a bajas temperaturas (Fennema, 1990).

## 2.6. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS

Debido a la naturaleza polimérica de las proteínas, su presencia influye decididamente en las características reológicas y de textura del alimento, que hacen que éste sea más aceptado por el consumidor.

Las propiedades funcionales se definen como "cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica algunas características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto". Las propiedades funcionales de las proteínas empleadas en los alimentos se resumen en la tabla 4; éstas dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, ionización, carga eléctrica, forma, peso molecular), así como de factores extrínsecos del medio que las rodea, y que en ocasiones pueden modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc.) (Badui, 1990).

Tabla 4

PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS EMPLEADAS EN ALIMENTOS

Propiedad	Función
Hidratación	Solubilidad, dispersión, absorción de agua, espesante, gelificante, viscosidad, formación de masas y propiedades reológicas en general
Estructural y reológica	Elasticidad, cohesión, formación de redes tridimensionales, formación de fibras, viscosidad, agregación, gelificación
Sensorial	Color, sabor, olor, textura, turbidez, arenosidad, etc.
Superficie	Emulsificación, espumante, estabilización, formación de complejos lípido-proteínicos.
Otras	Compatibilidad con aditivos, acción enzimática y modificación de propiedades de los alimentos

2.7. PROPIEDADES NUTRITIVAS DE LAS PROTEINAS

Las proteínas de los distintos tejidos corporales contienen veinte aminoácidos. Ocho de ellos los obtenemos únicamente a través de la dieta, puesto que el organismo es incapaz de sintetizarlos. Los aminoácidos indispensables son: leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina. La dieta debe aportar la suficiente cantidad de aminoácidos esenciales y el nitrógeno necesario para la biosíntesis de los dispensables. Para que esta biosíntesis de proteínas se desarrolle correctamente en el organismo, todos los aminoácidos deben estar presentes en los lugares en que aquella transcurre. La síntesis de proteínas disminuye y puede llegar a detenerse cuando se presenta deficiencia de un solo aminoácido. Esta situación se da realmente en niños con gran demanda de nutrimentos que

reciben únicamente a través de la dieta cantidades elevadas de hidratos de carbono procedentes de cereales o de tapioca. Los niños, especialmente los de edad preescolar que han dejado de consumir la leche, precisan un elevado aporte proteico. Como consecuencia de su estado nutricional presentan deficiencias de crecimiento y gran susceptibilidad ante las enfermedades infecciosas (Bohinsky, 1987).

La calidad de una proteína depende del contenido de aminoácidos indispensables, de acuerdo con las necesidades del organismo. Las proteínas de origen animal poseen superior calidad en comparación con las de origen vegetal. Así por ejemplo, las proteínas de los cereales presentan déficit de lisina y también, en algunos casos, de metionina, triptófano y treonina. Las semillas oleaginosas y frutos secos son pobres en lisina y metionina, mientras que las leguminosas suelen estar faltas de aminoácidos azufrados. Las proteínas de baja calidad son aquellas que no tienen las concentraciones adecuadas de aminoácidos esenciales. Al aminoácido más pobremente representado se le denomina "limitante" (Fennema, 1990).

#### 2.7.1. NECESIDADES HUMANAS DE PROTEINA

La FAO y la Food and Nutrition Board, dependiente del National Research Council, publica las recomendaciones de alimentos bajo el título genérico de Recommended Dietary Allowances (RDA) como se muestra en la tabla 5. Se han calculado a tenor de los conocimientos actuales y, por tanto, están sujetas a revisiones periódicas.

Las ingestas recomendadas son, por lo general, superiores a las necesidades medias e inferiores a los requerimientos en casos de enfermedad o deficiencia. Asimismo, se mencionan los ajustes y correcciones necesarias para casos de embarazo y lactancia.

En el cálculo de las necesidades de proteínas, se considera que las proteínas de la ingesta poseen una eficiencia del 75% en comparación con la proteína ideal. Esta proteína ideal (o proteína patrón) es aquella que contiene cantidades adecuadas y utilizables de todos los aminoácidos indispensables. Los requerimientos de proteínas se expresan como gramos por kilogramo de peso corporal y también pueden referirse como porcentaje del total de calorías necesarias (Fennema, 1990).

*Tabla 5*

**INGESTION DIARIA RECOMENDADA DE PROTEINAS PARA LA DIETA**

<b>GRUPO</b>	<b>EDAD</b>	<b>g/kg de peso corporal</b>
Lactantes	0-6 meses	2,2
	6-12 meses	2,0
Niños	1-3 años	1,8
	4-6 años	1,5
	7-10 años	1,2
Adolescentes	11-14 años	1,0
	15-18 años	0,9
Adultos	De 19 años en adelante	0,8

**2.7.2. MEDICION DE LA CALIDAD PROTEINICA**

La única medida verdadera de la calidad proteínica para los humanos es la medida del crecimiento y/o evaluación del balance metabólico llevado a cabo en sujetos adecuados de una determinada población. Reconociendo que estos estudios no pueden llevarse a cabo como rutina fue necesario desarrollar ensayos en animales que correlacionen cercanamente para cada alimento con datos humanos. Para una amplia aplicabilidad y precisión, los métodos rutinarios deben medir todos los parámetros básicos que determinan la calidad de una proteína, incluyendo digestibilidad de la proteína, cantidades y biodisponibilidad de

aminoácidos.

La calificación química corregida con la digestibilidad verdadera de proteínas (como la determinada por el método de balance en ratas), fue recomendada como el método rutinario más adecuado para la evaluación de la calidad proteínica en productos vegetales en la quinta sesión del Codex Committee en Vegetable Proteins (CCVP). La calificación de aminoácidos fue basada en la cantidad del aminoácido individual más limitante y su cálculo incluye el uso de patrones sugeridos por la Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations for pre-school children. (Sarwar y McDonough, 1990).

## 2.8. CUANTIFICACION DE PROTEINA

Existen numerosos métodos para la cuantificación de proteínas, todos ellos basados en alguna de sus propiedades típicas. En la tabla 6 se muestra un resumen de los más conocidos, con sus respectivas ventajas y limitaciones, de acuerdo con el alimento de que se trate, la exactitud requerida, la disponibilidad del equipo, etc. (Badui, 1990).

## 2.9. NITROGENO NO PROTEICO

El nitrógeno no proteico (NNP) es definido como el nitrógeno contenido en compuestos solubles en ácido tricloroacético al 12%. Esta clasificación puede incluir péptidos muy pequeños para ser precipitados, aminoácidos libres, amidas, alcaloides y otros compuestos nitrogenados no poliméricos. Grandes cantidades de NNP pueden alterar el valor nutritivo estimado con el método de Kjeldahl (Purcell, 1980).

TABLA 6

METODOS MAS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE PROTEINAS

PRINCIPIO	VENTAJAS	LIMITACIONES
<i>Absorción en ultravioleta (280 nm)</i>		
La mayoría de las proteínas absorben en el UV a 280 nm, debido básicamente a grupos cromóforos de tirosina y triptofano. La absorbancia debe ser proporcional a la concentración de proteína.	Es el método más rápido requiere de muy poca cantidad de proteína. El sulfato de amonio no interfiere, mientras que en la mayoría de los métodos si existe interferencia. La muestra no se destruye y puede ser usada en otros análisis.	Varia la cantidad de aromáticos entre las proteínas. Como los ácidos nucleicos absorben a 260 nm puede haber interferencias.
<i>Biuret</i>		
Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo púrpura violeta con sales de cobre en soluciones alcalinas. La intensidad del color es determinada espectroscópicamente a 540 nm con una curva patrón	Es el método más simple para medir proteína total. Muy pocas interferencias de otros compuestos en el desarrollo de color.	Se requiere de 20-40 mg de proteína. Existen varios pigmentos que absorben a 540 nm. La presencia de $\text{NH}_4^+$ interfiere con la reacción. El desarrollo de color es diferente para cada proteína. Interfieren lípidos o hidratos de carbono por formación de complejos.
<i>Lowry</i>		
Se basa en el desarrollo de un color azul debido 1)Reacción de biuret. 2)Reducción del reactivo de fosfomolibdeno-volframato por aminoácidos como tirosina y triptofano presentes en las proteínas. La absorbancia se mide a 750 o a 500 nm. Se requiere de una curva patrón que es recomendable hacer con la misma proteína. La sensibilidad va de 0.2 µg hasta 300 µg.	Es el método más sensible 100 veces más sensible que el de Biuret. Relativamente rápido (1 hora).	Requiere de muchos cuidados en la estandarización. Existe interferencia de sacarosa, lípidos amortiguadores, monosacáridos y hexosaminas, ya que reaccionan con los reactivos de Lowry. Los sulfato de amonio, los sulfhidrilos y los fosfatos también interfieren en la determinación.

PRINCIPIO	VENTAJAS	LIMITACIONES
<p><i>Turbidimétrico</i></p> <p>Las proteínas se pueden precipitar con ácido tricloroacético sulfosalilico o ferrocianuro de potasio en ácido acético. Se produce turbidez que puede ser estandarizada a una temperatura, concentración y tiempo de reacción para medirse a 600 nm: Se requiere de una curva estandar. El intervalo recomendado va de 0.5 a 1.5 mg de proteína.</p>	<p>Es el método más rápido.</p>	<p>Tiene muchas limitaciones ya que no todas las proteínas precipitan en la misma forma en presencia de ácido.</p> <p>Otras sustancias también precipitan en presencia de ácidos.</p>
<p><i>Kjeldahl</i></p> <p>Determina nitrógeno total tanto orgánico como no proteico. El método consiste en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico y la formación de <math>NH_4OH</math> que es recibido en ácido. Finalmente se titula con álcali el ácido que no reaccionó con el <math>NH_4OH</math>.</p>	<p>Es el método más común, permite comparar resultados con otros laboratorios.</p> <p>Determina todo el contenido de nitrógeno del alimento.</p> <p>El nitrógeno no proteico puede ser analizado después de precipitar la proteína con ácido tricloroacético.</p> <p>Con algunas modificaciones puede realizarse con cantidades pequeñas de muestra.</p>	<p>Puede haber pérdidas de nitrógeno, debido a la temperatura de digestión.</p> <p>El factor usado para convertir nitrógeno a proteína puede variar.</p> <p>El nitrógeno no proteico se debe tomar en cuenta.</p> <p>Las condiciones de trabajo y los reactivos son peligrosos. El proceso es largo.</p>
<p><i>Dumas</i></p> <p>Mide nitrógeno total después de la combustión de la muestra (700-900°C). La medición de nitrógeno elemental desprendido se hace volumétricamente en un nitrómetro.</p>	<p>Se puede hacer el análisis en 10 min con los equipos automatizados que existen en el mercado.</p>	<p>Se requiere de equipo muy costoso.</p> <p>La presencia de nitrógeno no proteico interfiere en las determinaciones</p>

## 2.10. DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA

La técnica se basa en la solubilidad del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio, con el fin de

eliminar el nitrógeno no proteínico que pueda interferir en la determinación del nitrógeno por medio del método micro-Kjeldahl.

Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración esta es incluida junto con la proteína soluble precipitada (Lucas *et al*, 1988). En la tabla 6 se muestra un resumen de las metodologías más conocidas para determinar proteína, con sus respectivas ventajas y limitaciones; de acuerdo con el alimento de que se trate, la exactitud requerida, la disponibilidad del equipo, etc. (Badui, 1990).

### 3. LEGUMINOSAS

#### 3.1. IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN EL MUNDO ACTUAL

Las semillas de leguminosas constituyen una fuente de proteína básica en las dietas de los países tropicales en vías de desarrollo como India, Africa, México, Centro y Sud América. En los países desarrollados, las leguminosas son utilizadas principalmente como forraje rico en proteínas para la producción animal intensiva, pero también tienen importancia como sustitutos de carne (principalmente en Japón) o agentes funcionales en la industria de los alimentos.

En los países en vías de desarrollo, como parte de la política para incrementar la producción y disponibilidad de alimentos, las leguminosas para el consumo humano también han estado desarrollándose como suplemento de buena proteína y un adecuado complemento para cereales. Por razones económicas y sociales los productos manufacturados concentrados y aislados no pueden ser utilizados como una regla. Deben preferentemente desarrollarse procesos más baratos para mejorar la calidad proteínica de los

materiales crudos.

Es interesante resaltar que la siembra de leguminosas incrementa la fertilidad del suelo fijando el nitrógeno, por lo que se reduce el uso de fertilizantes nitrogenados caros.

Comercialmente el mercado de las leguminosas está dominado por la soya. En 1987 cerca de 100 millones de toneladas métricas se produjeron a nivel mundial, 2 veces más de la producción total de leguminosas. USA es el productor mayoritario de soya

Menos disponibilidad y aumento de costos en los productos de proteína animal incrementan la necesidad de utilizar las leguminosas como alimento. La familia *Leguminosae* abarca tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, *Papilionoideae* que comprende 600 géneros y 13, 000 especies reconocidas. Sin embargo, solamente un número limitado de especies pertenecientes a 10 géneros, se utilizan para la alimentación humana. Por lo anteriormente mencionado, es interesante y necesario realizar investigaciones en leguminosas silvestres originarias de nuestro país como la *Erythrina americana* (Bodwell, 1983. Inglett, 1979. Rajaram. 1992).

### 3.2. ESPECIE *ERYTHRINA AMERICANA*

La *Erythrina* es un género distintivo y bien determinado de *Fabaceae* perteneciente a la familia *Leguminosae*. En México el género es ampliamente distribuido. Se han detectado 25 especies en el país y en el área del Caribe. (Sotelo, 1993). El género *Erythrina* comprende 108 especies de las cuales corresponden 51 a América, 32 a África, 18 a Asia y 2 a Australia.

La *Erythrina americana* conocida comúnmente como colorín, es una especie que se

caracteriza por alcanzar 4 o 5 metros de altura, de tallo amarillo e irregular, las ramas espinosas y las hojas trifoliadas; el follaje es frondoso y deciduo. Las flores son de color rojo brillante, se producen en conjuntos terminales cónicos. Son muy abundantes, viven en climas cálidos y templados y sobre terrenos medianamente fértiles.

En lugares como el Valle de México crecen sobre suelos pobres, alcanzando en este caso menor desarrollo; se propaga fácilmente por semillas y por estaca (Ordoñez y Pardo, 1982).

### 3.2.1. UTILIZACION EN MEXICO

Esta leguminosa se usa como cerca viva, por su rápido crecimiento, multiplicación por estacas y fácil adaptación. Se siembra en los jardines como planta ornamental, la madera se utiliza para hacer esculturas, tapones de botella y tablones. La corteza y los tallos se emplean en América Tropical como estupefaciente para peces.

Las semillas se utilizan para hacer collares ornamentales. Son empleadas también en remedios caseros contra granos e hinchazones de la piel entre otros.

En los mercados de Xalapa y principalmente durante la cuaresma, meses de marzo y abril, se puede conseguir fácilmente la flor, la cual se utiliza en la alimentación de dos maneras; cocinando la inflorescencia en botón o únicamente las colas rojas de las flores maduras, pero en ambas formas es necesario eliminar los estambres y pistilos, pues estos le confieren un sabor muy amargo. Una vez que se hierva la flor, se escurren y se les añade huevo y se fríe; estas tortas se pueden comer en seco o con mole. También se sirven las tortas en una salsa preparada en chile seco, pipián y ajonjolí molido.

Otra forma de preparar las flores, es acompañándolas con frijol gordo, se hierven los frijoles y se frien, por otro lado se hierven y se escurren los gasparitos o flores y se añade a los frijoles ya cocinados agregándoles cilantro; este platillo es conocido como Tlatonile.

Aunque las flores son frágiles tienen la ventaja de ser más resistentes que las flores de calabaza si se manejan adecuadamente. Pueden refrigerarse durante dos o tres días; en el árbol se conservan sin marchitarse durante un tiempo más prolongado. La flor de colorín en Xalapa es la de mayor consumo después de la flor de calabaza. El cocimiento de las flores también se utiliza para el tratamiento de las enfermedades del tórax (Ordoñez y Pardo, 1982).

### 3.3. ASPECTOS RELEVANTES DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN LEGUMINOSAS

*Leguminosae* es una inmensa familia botánica en donde las semillas muestran una variación considerable en el contenido de proteína. 12-55% en 320 especies diferentes. El genotipo y las condiciones agronómicas influyen los niveles de proteína en las especies. Las semillas de las leguminosas ampliamente cultivadas tienen un rango de 20-40% de proteína. Estos valores son altos comparados a otras fuentes vegetales. El contenido de proteína y la calidad en las leguminosas son los factores más importantes como fuente alimenticia. Alrededor de 80% de proteína en la semilla es proteína de almacenaje. Las proteínas restantes (de las cuales hay cerca de 1000 tipos) están involucradas principalmente en la estructura celular y procesos metabólicos básicos. Algunas tienen significado comercial porque poseen propiedades antinutricionales.

Las función fisiológica de las proteínas de almacenaje es proveer una fuente de aminoácidos y nitrógeno para la germinación. Una proteína puede ser clasificada como de almacenaje si: a) se acumula en las semillas en grandes cantidades; b) aparece solo en las semillas; c) es hidrolizada en sus aminoácidos constitutivos durante la germinación y crecimiento temprano; d) posee altos niveles en aminoácidos ricos en nitrógeno, amidas y arginina.

Las proteínas de almacenaje también son llamadas globulinas y pueden ser divididas en dos clases de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación 7S y 11S. Las proteínas maduras son empacadas en organelos llamados cuerpos proteicos, donde permanecen através del desarrollo de las semillas hasta que son hidrolizadas por proteasas durante la germinación. Su naturaleza multimérica y baja solubilidad a pH fisiológico es ideal para el empaquetamiento y deposición (Shewry y Gutteridge, 1992. Singh, 1988).

### 3.4. DESARROLLO EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

#### 3.4.1. MECANISMOS DE DEPOSICION DE CUERPOS PROTEINICOS

Se ha encontrado un patrón general de desarrollo similar en todas las leguminosas que han sido examinadas. En la primera fase del proceso el mayor crecimiento ocurre en la vaina, testa, y endospermo. Hay una creación de precursores para el futuro desarrollo del embrión y posteriormente ocurre una división celular rápida en el embrión hasta el final de la fase.

En la segunda etapa las reservas son depositadas intracelularmente. Hay un incremento en reticulo endoplásmico corrugado (REC), los polirribosomas son ligados a la cisterna del REC y una rápida síntesis de proteína se hace evidente en las células del cotiledón. El

almidón y los lípidos también son depositados durante este período. La fase de depósito rápido de reservas termina con la desaparición de los polirribosomas y la deshidratación de las semillas. Este proceso continúa hasta que la semilla contiene aproximadamente 10 por ciento de agua (Norton, 1978).

### 3.4.2. FISILOGIA DEL DESARROLLO EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

En *Pisum arvense* la hojuela o foliolo y la vaina son responsables de proveer dos terceras partes del carbono requerido por las semillas en desarrollo, y el carbono fijado por la vaina fue totalmente comprometido a la síntesis de proteínas.

Una relación similar entre las hojas y vainas se ha encontrado en *Vicia faba* donde el  $^{14}\text{CO}_2$  incorporado fotosintéticamente por las hojas fue inmediatamente transferido a la vaina, principalmente como ácido aspártico. El proveedor de nitrógeno del fruto en desarrollo, a diferencia del carbono, fue dependiente en alguna medida de la asimilación antes de la floración, que en *Pisum arvense* constituyó la quinta parte del nitrógeno requerido por la semilla.

Un suplemento de compuestos  $^{15}\text{N}$  vía transpiración por vapor en *Pisum sativum* demostró que las partes no reproductivas de la planta son las que contribuyen en mayor medida a la obtención y asimilación del nitrógeno. La translocación del nitrógeno al fruto en desarrollo, y preferentemente a las semillas, se lleva a cabo subsecuentemente.

La vaina funciona como un órgano de suministro y asimilación. En *Phaseolus vulgaris* parte del carbono se deriva del  $\text{CO}_2$  respiratorio, liberado por las semillas y fotosintéticamente asimilado por los tejidos de la vaina. Se ha demostrado que hay actividad

nitrito reductasa en las vainas de *Phaseolus vulgaris* y *Vicia faba* y dichos tejidos deben ser capaces de sintetizar aminoácidos.

Se ha encontrado que en la semilla se realizan numerosas síntesis e interconversiones y no puede ser relegada como depósito para abastecimiento externo de compuestos amino. Otro aspecto interesante es que la fotosíntesis de las hojas puede ser modulada por la demanda de asimilación de los frutos adyacentes en desarrollo (Norton, 1978).

### 3.4.3. CAMBIOS EN AMINOACIDOS LIBRES Y PROTEINAS DE SEMILLAS EN MADURACION

Los aminoácidos libres individuales de semillas de cacahuete en varios cultivos, desaparecieron cuantitativamente durante la maduración. El contenido de proteína total y soluble en las semillas en maduración se incrementó simultáneamente. Los estudios han demostrado que durante las primeras 8 a 12 semanas las semillas inmaduras de cacahuete incrementan rápidamente en peso fresco y contienen mayores cantidades de enzimas. Posteriormente, este desarrollo es acompañado por varios cambios composicionales como la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos y compuestos orgánicos volátiles. La variación de proteína cuantitativa y cualitativa está relacionada a las condiciones genéticas y agronómicas.

Las harinas desengrasadas de las semillas inmaduras de cacahuete contenían aproximadamente 3.5%-4.5%, de aminoácidos libres. Durante el desarrollo las harinas de las semillas exhibieron un rápido decremento de aminoácidos libres hasta 0.5% respectivamente.

En conjunción con el decremento de aminoácidos libres incrementa la deposición de proteína total.

En la fase inmadura de granos de arroz con "alto contenido de proteína" hay mayor cantidad de aminoácidos libres y mayor capacidad de depositar proteínas durante la maduración, que en las semillas de "bajo contenido de proteína".

El estudio bioquímico durante la deposición de proteína en semillas en maduración, puede llevar a información útil para entender los factores genéticos y ambientales que afectan estos constituyentes.

El incremento de la deposición de proteína en semillas en maduración puede ser genéticamente relacionado a la transcripción del ácido ribonucleico mensajero y/o a la translación de los componentes, o la incorporación de aminoácidos libres en polipéptidos en nivel ribosomal. Hay datos limitados que correlacionan cambios en la concentración de aminoácidos libres con la deposición de proteína.

El papel como precursor de aminoácidos libres durante la deposición de proteínas en semillas de cacahuete es evidente. Altos niveles de aminoácidos libres en semillas en maduración contribuyen a una mayor y más rápida acumulación de proteína "en cuerpos proteínicos" (Basha *et al.*, 1976).

### 3.5. CONSIDERACIONES NUTRICIONALES

Ya que la lisina es el principal aminoácido deficiente en la mayoría de las proteínas vegetales, la importancia de los granos de leguminosa en nutrición humana es mayor a lo generalmente reconocido ya que son ricos en este aminoácido. En adición de proveer

proteínas y calorías, son una fuente importante de varias vitaminas del complejo-B, minerales y fibra.

### 3.5.1. CALIDAD DE PROTEINA EN LEGUMINOSAS

En comparación con el patrón de la FAO la composición de aminoácidos en semillas de leguminosas es limitante en aminoácidos azufrados y el triptofano ocupa el tercer lugar. Las semillas de leguminosas son particularmente ricas en lisina y otros aminoácidos indispensables.

A pesar que la composición de la proteína en semillas es relativamente fácil de determinar y hay una fuerte relación entre la composición esencial de aminoácidos en las proteínas y su valor nutritivo, es importante complementar los resultados analíticos obtenidos con ensayos biológicos. Una razón para esto es que muchos factores pueden afectar la transferencia de aminoácidos del material vegetal al animal. La digestibilidad de la semilla completa y la presencia de inhibidores puede interferir con la utilización de aminoácidos (Norton, 1978. Bodwell, 1983. Inglett, 1979).

### 3.5.2. PROPUESTAS PARA INCREMENTAR LA CALIDAD NUTRITIVA DE LAS LEGUMINOSAS

Es bien conocido que las mezclas de cereales y leguminosas tienen efectos sinérgicos en la calidad de la proteína porque se complementan los aminoácidos deficientes en cada uno de los dos alimentos. Y hay una proporción óptima que maximiza la calidad nutricional de las mezclas.

La suplementación natural con cereales y/o proteínas animales en baja proporción extienden y maximizan la calidad nutricional de las leguminosas.

Incrementando nuestro conocimiento del metabolismo del nitrógeno en estas plantas y sus bases genéticas de la variación en fracciones proteínicas en semilla y sus componentes, hay posibilidad de mejorar el contenido y la calidad de las proteínas.

Con miras hacia el futuro las aproximaciones para mejorar el contenido de aminoácidos indispensables en leguminosas pueden realizarse por dos vías: a) estudiando los mecanismos moleculares del control en la acumulación de proteína de almacén en semillas; b) Hibridaciones moleculares *in vitro* sostienen la existencia de homologías conformacionales entre estas proteínas de almacén. La ingeniería genética puede permitir en algunos años la transferencia de genes estructurales de una especie a otra que codifiquen para las proteínas de almacén.

La modificación genética de los sistemas de fijación de nitrógeno en las leguminosas incrementará su importancia, debido a que es el medio primario de producción de nitrógeno orgánico convertible directamente en proteína utilizable para la alimentación, además se sabe que hay evidencia suficiente de que el N y S afectan la cantidad y calidad de la proteína producida en las semillas. Una explicación satisfactoria es que el N y S disponible es utilizado prioritariamente por las proteínas metabólicas de la célula y el exceso de N puede ser utilizado para construir proteínas de almacén (Norton, 1978. Bodwell, 1983. Inglett, 1979).

### 3.6. CONSIDERACIONES ACERCA DE LA UTILIZACION DE LEGUMINOSAS EN LA ALIMENTACION

La mayoría de las leguminosas deben ser cocinadas para inactivar los factores antinutricionales lábiles y realzar el valor nutricional de la proteína. Los cultivos de *Phaseolus* caen dentro de esta categoría. Las semillas crudas no producen crecimiento en ratas y estas perecen antes que la relación de eficiencia proteínica (PER) sea completada (tres semanas). En dos variedades domésticas *C. arletimum* y *V. unguiculata* los valores de PER en las semillas crudas y cocidas es muy parecido. Presumiblemente estas leguminosas contienen bajos niveles de factores tóxicos (tabla 7).

Los problemas comunes para la utilización de las leguminosas incluyen: tiempo y energía requerida para prepararlas, deficiencia de aminoácidos azufrados, presencia de factores tóxicos y antinutricionales tanto lábiles como estables al calor (Shewry, 1992. Norton, 1978. Inglet, 1979).

#### 3.6.1. COCIMIENTO RAPIDO

Se propuso un cocimiento rápido de las leguminosas para el ahorro de energía que consiste en: a) pérdida de la cascarilla, cuando sea necesario, por un blanqueo breve en vapor o agua hirviendo; b) remojar la semilla entera de 1 a 24 horas (dependiendo de la variedad cultivo, historial de almacenamiento etc.), a temperatura ambiente en una solución de sales de grado alimenticio (cloruro, bicarbonato, carbonato y tripolifosfato de sodio) cuya composición ha sido optimizada para cada leguminosa; c) escurrimiento para remover el

exceso de agua de remojo. En la tabla 7 se observa como la relación de eficiencia proteínica mediante este tratamiento, es igual y en algunos casos mayor al cocimiento ordinario.

Tabla 7

RELACION DE EFICIENCIA PROTEINICA EN ALGUNAS LEGUMINOSAS  
CRUDAS Y COCINADAS

Leguminosas		Relación de Eficiencia Proteínica (PER)		
Nombre científico	Nombre común	Crudas	Cocinadas	
			Remojo previo en agua	Blanqueo y remojo previo en solución de sales
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol rosa	0	1.2	1.2
	Frijol pinto	0	1.2	1.3
	Blanco	0	1.4	1.2
<i>Phaseolus lunatus</i>	Frijol de lima	0	1.4	1.6
<i>Vigna unguiculata</i>	Ojo negro	1.2	1.5	1.5
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	2.2	2.3	2.5

En el cocimiento solamente requerirán del 10 al 15% del tiempo que se utiliza para cocinar las semillas remojadas solamente en agua. Los productos resultantes tienen apariencia excelente, textura cremosa y libres de hollejos. Por otra parte los factores flatulentos son menores en leguminosas cocidas y escurridas. Este proceso reduce significativamente la energía y los países pobres donde las leguminosas son el alimento proteínico-calórico por excelencia, pueden sacar provecho de esta tecnología, sin embargo,

las costumbres y prácticas tradicionales pueden retardar su expansión (Shewry, 1992. Norton, 1978. Inglet, 1979).

### 3.6.2. PROCESOS DE EXTRACCION DE LA PROTEINA

Las leguminosas comunes pueden ser divididas en dos categorías principales las que contienen lípidos y las que almacenan almidón. Por lo tanto los principios para procesar los aislados y concentrados de proteínas son diferentes de acuerdo a la composición bioquímica de las semillas.

#### a) Procesos en seco.

El resultado de una molienda en seco de semillas ricas en almidón como chicharos y habas es una harina con dos tipos de partículas diferentes en tamaño y densidad. Este fenómeno se aprovecha en técnicas de clasificación por aire. En donde se separa la fracción fina (concentrado de proteínas) de la fracción gruesa.

Las fracciones de proteínas son obtenidas con un rendimiento de 41 a 35% y un contenido de proteína de 68% y 56% para haba y chicharo respectivamente.

#### b) Proceso húmedo.

Después de una solubilización alcalina de las proteínas, el material insoluble se remueve por centrifugación. Adicionando ácido clorhídrico al sobrenadante, la proteína es precipitada isoelectricamente, produciendo el aislado. La recuperación de proteína fluctúa entre 64.3% y 87.6%. El proceso desarrollado por el Laboratorio de Tecnología de alimentos en Dinamarca, utiliza la ultrafiltración en lugar de la acidificación para recuperar las proteínas extraídas. El rendimiento total de recuperación fue de 62% y el contenido de

proteína en el secado por aspersión fue de 90%.

El principal problema de la ultrafiltración en años recientes es la lenta velocidad de flujo y la saturación de membrana cuando la concentración de proteína se incrementa.

Las diferentes tecnologías de clasificación por aire, precipitación ácida y ultrafiltración llevan a productos que contienen varias cantidades de factores antinutricionales. Por clasificación por aire, la mayoría de los factores antinutricionales son recuperados con mayores concentraciones que los aislados y las harinas. Los aislados contienen menos factores antinutricionales que los concentrados, incluyendo factores flatulentos

La viabilidad de producir aislados de haba y chícharo está relacionada a las propiedades funcionales comparadas con los aislados de soya y al mercado de los productos (Bodwell, 1983)

### 3.7. SUSTANCIAS TOXICAS Y ANTINUTRICIONALES DE LAS LEGUMINOSAS

Muchas sustancias antinutricionales han sido encontradas en especies de leguminosas. Su importancia varía de acuerdo a la cantidad, a sus diferentes efectos y a la posibilidad de ser reducidos o eliminados en las diferentes fases de preparación de los alimentos y procesos tecnológicos.

#### 3.7.1 FAVISMO

Favismo es una enfermedad hemolítica que afecta principalmente a los niños deficientes en G6PD (glucosa 6-fosfato dehidrogenasa) cuando consumen frijoles de haba.

Esta deficiencia enzimática afecta alrededor de 100 millones de personas, principalmente en el área del Mediterráneo. Los factores que están presentes en el frijol de haba responsables del favismo son: vicina, convicina, divicina, isouramil y L-DOPA. Hasta la fecha no se han encontrado genotipos que carezcan de los factores de inducción del favismo (Bodwell, 1983).

### 3.7.2. INHIBIDORES DE PROTEASAS

Estos compuestos son generalmente proteínas de bajo peso molecular con capacidad de asociarse a las enzimas proteolíticas y formar un complejo estable que no tiene actividad catalítica. Se han encontrado cantidades significativas de inhibidores de tripsina en soya y frijoles (más del 6% del total de peso de la semilla). Los estudios han demostrado que la presencia/ausencia de estos inhibidores es controlada por un solo gene. En *Vicia faba* se realizaron líneas con bajos niveles de estas sustancias (Bodwell (ed), 1983. Matthews (ed), 1989).

Se demostró durante una evaluación nutricional (PER) de semillas *E. americana* libres de alcaloides, que los inhibidores de tripsina no tienen efectos adversos en el crecimiento de las ratas (Sotelo *et al*, 1993).

### 3.7.3 LECTINAS

Las lectinas (o hemaglutininas) son proteínas cuyo peso molecular es de aproximadamente 100 000; tienen la peculiaridad de aglutinar los eritrocitos *in vitro*, y abundan mucho en el reino vegetal, son generalmente glucoproteínas y llegan a tener un

contenido hasta de 10% de hidratos de carbono. En los animales producen un efecto mucho más dañino cuando se suministran en forma inyectada que consumidas de manera oral. Además son termolábiles y se inactivan con los cocimientos normales a los que se someten las leguminosas. Están presentes en muchas especies de leguminosas principalmente en frijoles (Badui, 1990). Se han seleccionado variedades con bajos contenidos de estas sustancias. Las lectinas de la *Erythrina americana* son glicoproteínas que contienen 7% de azúcares neutros y la actividad aglutinante se pierde después de un minuto de incubación a 80 °C (Ortega *et al*, 1990).

#### 3.7.4. FACTORES DE FLATULENCIA

Los factores de flatulencia, particularmente importantes en frijoles comunes y soya, son debidos a oligosacáridos, principalmente rafinosa, estaquiosa y verbascosa. El tracto intestinal humano no sintetiza  $\alpha$ -galactosidasa, enzima que actúa sobre estos oligosacáridos, y por lo tanto no son hidrolizados durante el metabolismo normal de los alimentos; de esta forma llegan al ileon y al colon en donde los microorganismos naturales los descomponen en sus correspondientes monosacáridos, los que a su vez son fermentados anaeróbicamente para generar anhídrido carbónico, hidrógeno y algo de metano (Badui, 1990) Se ha encontrado un amplio rango en el contenido de rafinosa y estaquiosa total en leguminosas. Se han aislado algunas líneas con muy bajo contenido de azúcares individuales (Bodwell (ed), 1983).

### 3.7.5. ALCALOIDES

Los alcaloides forman un grupo heterogeneo de acción farmacológica potente en los animales. Pueden presentarse como sales de ácidos orgánicos o en forma de glucósidos de la rafinosa, galactosa y glucosa o también como ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable. Se ha considerado que los alcaloides son productos terminales en el metabolismo del nitrógeno.

Los alcaloides son ampliamente distribuidos en semillas de especies *Lupinus*. Sin embargo se han encontrado plantas libres de alcaloides en *L. luteus* y en *L. angustifolius*. Además se mostró que la ausencia de alcaloides es recesiva. (Bodwell, 1990).

En el género *Erythrina* los alcaloides son considerados típicos porque tienen estructuras inusuales y exhiben una restringida distribución dentro de *Fabaceae*. En *E. americana* los alcaloides mayoritarios son  $\alpha$ -erytroidina y  $\beta$ -erytroidina (Aguilar, 1981. Sotelo, 1993).

### 3.7.6. TANINOS

Los taninos están contenidos en la testa de las semillas principalmente y son de significado particular en habas. En las líneas con semillas grandes se encontró bajo contenido de compuestos fenólicos, debido a la pequeña proporción de testa cuando se compara con las semillas pequeñas.

Un trabajo de selección precisa en el aislamiento de líneas con bajo contenido de inhibidores de tripsina, lectinas, factores de flatulencia, alcaloides y taninos siempre ha dado respuestas positivas. A través del análisis del germoplasma y con técnicas peculiares de

selección, no debe haber dificultades en obtener variedades con calidad nutricional mejorada. desde un punto de vista en la evolución, debe decirse que la presencia de sustancias tóxicas o de mal sabor tienen un significado preciso, debido a que los animales evitan comer estas plantas, y por lo tanto tienen una ventaja sobre la selección natural. Debe haber un análisis cuidadoso de todas las consecuencias que pueden derivar del cultivo de nuevas plantas que carecen de sustancias antinutricionales (Bodwell, 1990).

#### 4. AMINOACIDOS RAROS O NO PROTEINICOS

Se han aislado y determinado las estructuras de cerca de trescientos aminoácidos presentes en la naturaleza, y es probable que una cantidad considerable de ellos esté por descubrirse. De estos trescientos, veinte son comunes para todos los organismos vivos como constituyentes de las proteínas y un pequeño número de los otros como ornitina, citrulina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico están generalmente distribuidos como intermediarios metabólicos. A los aminoácidos que no forman parte de las proteínas se les conoce como aminoácidos no proteínicos o raros, y presentan gran variación en sus patrones de distribución. Algunos son encontrados en organismos diversos mientras que otros son restringidos a una sola familia, género o especie (Harborne (ed), 1971).

##### 4.1. POSIBLES ORIGENES DE LOS AMINOACIDOS RAROS

Las plantas más evolucionadas son una rica fuente de aminoácidos raros y muchos han sido aislados de leguminosas. Las semillas de algunos miembros de la familia contienen hasta un cinco por ciento de peso seco de un solo compuesto de este tipo. A pesar de la

acumulación de altas concentraciones de estos compuestos en ciertas especies, se conoce poco acerca de la biosíntesis de la mayoría de ellos; y solo podemos especular acerca de su significado en la planta. Se sugiere que algunos de estos compuestos pueden aparecer debido a una falta de especificidad en algunos sistemas enzimáticos, los cuales conciernen primeramente a la síntesis de aminoácidos comunes (Harborne (ed), 1971).

#### 4.2. VALOR POTENCIAL DE AMINOACIDOS RAROS EN ESTUDIOS COMPARATIVOS.

La presencia de un aminoácido raro particular en una especie puede ser de importancia primaria para la evolución, por su papel de marcadores filogenéticos. Cuando un aminoácido raro se presenta en dos o más especies que están relacionadas en otros aspectos, es probable que estas especies provengan de una forma ancestral común.

La necesidad de elucidar los caminos biosintéticos es importante cuando más de un aminoácido raro es encontrado en las mismas especies. En estas circunstancias, los aminoácidos raros pueden estar relacionados como precursores y derivados en vías biosintéticas comunes o pueden venir de vías independientes controladas por genomas no relacionados (Harborne (ed), 1971).

#### 4.3. POSIBLE SIGNIFICADO BIOLÓGICO

Es claro que no se le puede atribuir a estos aminoácidos un solo papel metabólico. La canavanina, uno de los aminoácidos ricos en nitrógeno de las leguminosas, se ha encontrado en altas concentraciones en las semillas de muchas especies y desaparece durante

la germinación. Estos descubrimientos sugieren que su función primaria puede ser el almacenaje de nitrógeno. Sin embargo, esta explicación no es enteramente convincente debido a que no son obvias las ventajas evolutivas de una planta que almacena canavanina de otra que almacena arginina. El almacenamiento de arginina representa una solución más económica en términos de requerimientos enzimáticos, ya que el complemento apropiado de enzimas para la síntesis de arginina debe estar presente en todas las especies. Si un aminoácido raro confiere alguna ventaja adicional en las especies en que es encontrado, entonces esto favorecerá una selección natural de estas especies.

Un aminoácido raro puede conferir la ventaja adicional de proteger a la planta para que sea menos vulnerable al ataque por animales, insectos, hongos o microorganismos. La toxicidad de aminoácidos como ácido  $\alpha$ - $\gamma$ -diaminobutírico a los animales evolucionados, la inhibición del crecimiento bacteriano por homoarginina, y la aparente habilidad de las enzimas de algunas plantas para discriminar sus propios aminoácidos raros que son tóxicos incrementa la posibilidad de que algunos pueden haber sido seleccionados debido a la habilidad de estos compuestos de jugar un papel dual.

Dentro del género *Lathyrus* se ha demostrado que la presencia de un aminoácido raro puede prevenir la hibridación por la inhibición del desarrollo de los tubos de polen en otras especies. La presencia de un aminoácido establece y preserva la identidad taxonómica (Harborne (ed), 1971).

#### 4.4. SU ACCION COMO ANTIMETABOLITOS

Los análogos de aminoácidos poseen propiedades inhibitorias de crecimiento, particularmente hacia los microorganismos. Los tipos de variaciones estructurales que llevan a la elaboración de un análogo de aminoácido efectivo son: a) el reemplazamiento de un residuo en el esqueleto del aminoácido por otro de tamaño similar; b) el reemplazamiento del grupo fenil por otro anillo con sistema de resonancia similar; c) el reemplazamiento de un tipo de anillo heterocíclico por otro. Las sustituciones mencionadas provocan cambios ligeros en los enlaces interatómicos y ángulos, así como en el tamaño y aspecto del correspondiente aminoácido proteínico

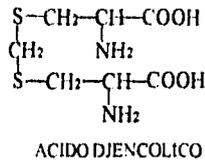
Una característica general de los análogos tóxicos ya sean sintéticos o de origen natural, es que sus efectos tóxicos son reversibles específicamente por el aminoácido normal de la proteína. Se sabe también que la inhibición de crecimiento puede ser reversible no específicamente por un aminoácido diferente al análogo.

Un análogo de aminoácido puede inhibir la activación del aminoácido normal correspondiente reduciendo la velocidad de síntesis de proteína, pero es raro el reemplazamiento de residuos de un aminoácido normal por un análogo en una proteína. Los efectos inhibitorios de crecimiento son transitorios excepto posiblemente a concentraciones elevadas. Como resultado de la competencia para un mecanismo de transporte, un análogo puede dañar el flujo de algún aminoácido esencial hacia la célula (Fowden *et al.* 1967).

#### 4.5. AMINOACIDOS NO PROTEINICOS DE INTERES EN LA FAMILIA DE LAS LEGUMINOSAS.

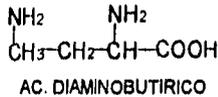
##### 4.5.1. ACIDO DJENKOLICO

En ciertas partes de Sumatra particularmente en Java, el frijol Djenkol es de consumo popular. Este frijol es la semilla de una leguminosa arborea, *Pithecelobium lobatum*. El frijol es tóxico cuando se consume en exceso, la acumulación de ácido djencólico provoca falla de riñón, que es acompañada de la aparición de sangre y puntos blancos en la orina. El ácido djencólico está presente en el frijol de manera libre, en una proporción de 1 a 4%. A pesar de su semejanza estructural con la cistina el ácido djencólico, debido a su relativa insolubilidad, escapa a la degradación metabólica. Tiende a ser cristalizado en el riñón y en la orina. El ácido djencólico se puede sintetizar de una mol de formaldehído y dos de L-cisteína en solución concentrada de HCl (Irving (ed), 1969, Index Merk).



##### 4.5.2. ACIDO $\alpha,\gamma$ -DIAMINO BUTIRICO

En la India el latirismo es una enfermedad atribuida al consumo de semillas *L. cicera*, *L. sativus*, y *L. chymenum*. Los síntomas clásicos producidos en humanos son mejor descritos como neurolatirismo. Síntomas similares de degeneramiento de los nervios pueden

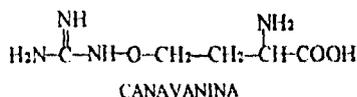


ser producidos en ratas con dietas que contengan las semillas de estas especies. El ácido  $\alpha$ - $\gamma$ -diaminobutírico actúa como neuroletirógeno (Murty, 1967, Fowden *et al* 1967).

#### 4.5.3. CANAVANINA

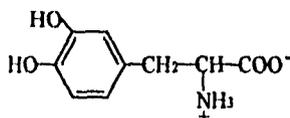
O-((Aminoiminometil)amino)homoserina; ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -guanidinoxibutírico. Está restringida a la subfamilia de leguminosas *Papilionoideae*, se considera que su distribución tiene significancia taxonómica.

Aminoácido básico aislado como L-canavanina del frijol jack, *Canavalia ensiformis* y la *Glyricidia sepium*. Constituye cerca del 1.5% del peso de las semillas y brotes de alfalfa. Es usado como sustrato de algunas enzimas que normalmente actúan en arginina (Harborne *et al*, 1971). Es un potente inhibidor de crecimiento de muchos organismos interfiriendo con la síntesis de proteína. Se ha demostrado la incorporación de canavanina en moléculas proteicas de en *Staph. aureus*, *E. Coli*, células con carcinoma de Walker, y preparaciones ribosomales de hígado de rata, las resultantes moléculas exhiben propiedades biológicas alteradas, desde que hay una considerable diferencia de la ionización de los grupos oxiguanidino y guanidino (la canavanina es más básica que la arginina  $pI=8.2$  comparada con la arginina de  $pI=10.8$ ) es toxica para los mamíferos, induce ciertas anomalías serológicas y hematológicas en monos, características de lupus eritematoso (Fowden *et al*, 1967, Index Merk).



#### 4.5.4. DIHIDROXIFENILALANINA (DOPA).

El aminoácido 3-hidroxitirosina; 3-(3,4-dihidroxifenil)alanina (DOPA) se presenta en altas concentraciones en el haba *Vicia faba* y en el frijol "velvet", *Stizolobium deeringianum*. El consumo de haba es frecuentemente asociado con una enfermedad en los humanos conocida como favismo. Las personas genéticamente deficientes en la enzima glucosa-6-fosfato dehidrogenasa son susceptibles al favismo, y hay un tipo de anemia hemolítica característica de esta enfermedad. La hemólisis de las células rojas se cree que son debidas a una disminución marcada del contenido de glutatona de los eritrocitos. En vista de estos hechos, es pertinente hacer notar que la adición *in vitro* de DOPA a las células rojas de la sangre de los individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, produce una significativa reducción del contenido de glutatona. Además inhibe la transferencia de tirosina a sRNA sintetasa (Irving (ed), 1969, Index Merk).

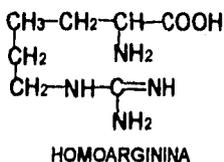


DIHIDROXIFENILALANINA (DOPA)

#### 4.5.5. HOMOARGININA

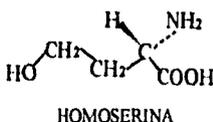
Se identificó como un producto natural a finales de la década de los sesentas en numerosas especies de *Lathyrus* y después se aisló de dos de ellas, *L. cicera* y *L. sativus* inhibe el crecimiento de *Chorella vulgaris*, *E. Coli*, *Staph. aureus*, y *Candida albicans* pero no de *Torolopsis utilis* o *Neurospora crassa*. Este homólogo de arginina no produce inhibición de crecimiento u otros efectos tóxicos cuando se suministró oralmente o por inyección a las ratas. De hecho las ratas mostraron una respuesta de crecimiento a la

homoarginina cuando fue adicionada a una dieta deficiente de lisina. La evidencia de que la homoarginina pueda reemplazar los residuos de homoarginina en las moléculas de proteína microbiana no se ha comprobado (Fowden *et al*, 1967).



#### 4.5.6. HOMOSERINA

Acido 2-amino-4-hidroxibutanóico, ácido 2-amino-4-hidroxibutírico. Principal aminoácido libre que se encuentra en las plantas de chicharos.



## 5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

### 5.1. ASPECTOS RELEVANTES DEL ANALISIS DE ALIMENTOS POR HPLC

El HPLC es una de las técnicas cromatográficas más recientes, en donde el poder de resolución es más que adecuado para manipular muchos componentes de los alimentos como vitaminas cercanamente relacionadas o aminoácidos. Sin embargo, en la práctica los sistemas alimenticios frecuentemente necesitan procedimientos complejos de extracción para aislar los compuestos de interés en un estado suficientemente puro con alta recuperación.

El costo de un equipo moderno de HPLC es muy alto, pero además se deben considerar los costos por corrida, las columnas, el mantenimiento de rutina y las

refacciones. Los sistemas de bombeo en particular pueden ser extremadamente costosos a menos que se tenga cuidado con su operación.

Debe haber un mayor énfasis en el análisis de muestras en los alimentos que en las separaciones cromatográficas de sus componentes. En muchas publicaciones esta parte fundamental es omitida. En la literatura se puede encontrar procedimientos de limpieza para las muestras (Macrae, 1988).

## 5.2. DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Para análisis más adecuados de composición de aminoácidos se deben seguir los siguientes sugerencias: a) especificar el origen y naturaleza de la muestra, así como el peso total y el peso promedio de las semillas involucradas. b) El contenido de proteína en las semillas se debe determinar preliminarmente. c) Es recomendable realizar análisis separados para metionina y cisteina (hidrólisis después de oxidación con ácido perbórmico) y también para triptofano (hidrólisis alcalina). d) Se reportan 18 de los 20 aminoácidos debido a la imposibilidad de distinguir glutamina de ácido glutámico (Gln + Glu = Glx) y asparagina de ácido aspártico (Asn + Asp = Asx). Los aminoácidos no comunes que pueden estar presentes deben ser tomados en cuenta. e) Los resultados deben dar el total de aminoácidos recuperado; o mejor el porcentaje de nitrógeno recuperado (Bodwell (ed), 1983).

### 5.2.1. PREPARACION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS

Para la determinación de la composición total de aminoácidos en los alimentos se necesita primero de la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes. Pueden ser

utilizados para estos ácidos, álcalis o enzimas, pero se concluyó que el mejor método es el tratamiento con HCl 6 N a 110 °C por 24 horas. Muchos autores sugieren la oxidación de metionina y cisteína antes de la hidrólisis para producir sulfona de metionina y ácido cistéico. Sin embargo en trabajos previos se ha mencionado que con una hidrólisis a mayor temperatura y tiempo corto no se afectan los aminoácidos azufrados (Romero, 1988). También es necesaria la hidrólisis alcalina del triptofano.

Se desarrolló un método para la determinación de triptofano en el cual el triptofano es reducido por borano de piridina a dihidro triptofano. Después de la hidrólisis con HCl 6 N y corriendo la muestra por intercambio iónico con detección con ninhidrina, se encontró que los otros aminoácidos permanecían intactos y podían ser estimados adecuadamente en un autoanalizador Technicon.

En estudios detallados de condiciones de hidrólisis se mostró que la hidrólisis con HCl 6 M en tubos sellados a 145 °C se reducía el tiempo significativamente de 24 h a 4 h. La recuperación de aminoácidos concuerda bien con los encontrados a 110 °C y 24 h (Macrae, 1988).

## 5.2.2. PREPARACION DE MUESTRAS PARA DETERMINAR

### AMINOACIDOS LIBRES

Para determinar la concentración de aminoácidos libres, es usual deproteinizar primero. Los métodos de deproteinización han incluido al ácido picrico y al ácido sulfosalicílico (ASS), centrifugación de alta velocidad, ultrafiltración y resinas de intercambio iónico. El método más común es la precipitación con 3 % de ASS seguido por

centrifugación para remover la precipitación de proteínas. Este procedimiento es popular debido a su simplicidad, pero se ha reportado que hay una mejor precisión en el análisis de aminoácidos de plasma sanguíneo con la deproteinización con ácido pícrico. Se han estimado aminoácidos libres en alimentos sólidos como la cocoa, en donde se ha demostrado que son unos de los componentes mayoritarios precursores del aroma del chocolate.

### 5.3. PROCESO CROMATOGRÁFICO

El proceso cromatográfico básico consiste en la partición de las moléculas de la muestra entre un fluido móvil y la fase estacionaria. Los factores que afectan la difusión son esencialmente la cinética y la termodinámica. La diferencia en los tiempos de retención es controlada termodinámicamente y el ancho de los picos depende de factores cinéticos. Lo importante en la cromatografía de columnas es la separación entre los componentes de una muestra, y entender los factores que influyen la separación (Macrae, 1988).

#### 5.3.1. ENSANCHAMIENTO DE BANDA

El aspecto de un pico cromatográfico está gobernado por una gran cantidad de factores cinéticos. Cuando la muestra pasa a través de la columna sus componentes se difunden para formar un pico Gaussiano en condiciones ideales.

El proceso de ensanchamiento de banda es complejo. Estos mecanismos pueden ser clasificados como procesos de no equilibrio, que resultan del flujo de la fase móvil a través de la columna y una difusión simple de las moléculas que residen en la columna.

### 5.3.2 DIFUSION Y EFECTOS DE TEMPERATURA.

Cuando es posible utilizar varios solventes se debe escoger el de menor viscosidad. Los incrementos en la temperatura reducen los tiempos de retención y pueden tener un efecto en la resolución de los picos. El efecto del incremento de la temperatura será el de reducir la altura de platos. En el análisis de aminoácidos por cromatografía se elevan las temperaturas para incrementar la difusión molecular del soluto (Macrae, 1988).

### 5.3.3 OPTIMIZACION DE RESOLUCION

La concentración en el componente de elución en el pico máximo  $C_{max}$  puede ser expresada como:

$$C_{max} = \frac{m, N^{1/2}}{er^2 L (1+K) (2 \pi^2)^{1/2}}$$

Por lo tanto, un incremento en la masa inyectada ( $m$ ) o en el número de platos ( $N$ ), o un decremento en el radio de la columna ( $r$ ), longitud ( $L$ ) o factor de capacidad ( $K$ ), incrementa la sensibilidad (Macrae, 1988).

### 5.4 TIPOS DE CROMATOGRAFIA

Las condiciones cromatográficas adecuadas (fase móvil y estacionaria) para un compuesto particular, requieren el entendimiento de los mecanismos de la retención. La tabla 8 resume los principales tipos de cromatografía y las bases para la retención.

*Tabla 8*

**TIPOS DE CROMATOGRAFIA**

<b>Tipos de cromatografía</b>	<b>Bases de la retención</b>
Adsorción	Polaridad
Partición	Solubilidad
Intercambio iónico	Carga
Tamaño de exclusión	Tamaño molecular
Quiral	Actividad óptica
Afinidad	Actividad biológica

**5.4.1. CROMATOGRAFIA DE ADSORCION**

La cromatografía de adsorción está basada en la partición selectiva de las moléculas de un soluto entre la fase móvil y la adsorción en la superficie de la fase estacionaria sólida. La fase estacionaria más utilizada es la sílica gel. Este tipo de cromatografía también se conoce como líquido/sólido. En el análisis de alimentos sus aplicaciones son limitadas por las razones siguientes: a) se deben tomar cuidados extremos para asegurar que la actividad de la fase estacionaria sea reproducible; b) la equilibración es muy lenta, c) la sílica puede ser usada dentro de un rango relativamente limitado de pH (2.7-7.5); d) la sílica se ensucia fácilmente con compuestos de polaridad elevada encontrados frecuentemente en extractos de alimentos

#### 5.4.2. CROMATOGRAFIA DE PARTICION LIQUIDO/LIQUIDO

La cromatografía de partición líquido/líquido puede ser considerada análoga a la cromatografía de adsorción, con la salvedad de que la retención cromatográfica es gobernada por el equilibrio de distribución entre la fase móvil y la fase líquida estacionaria. El material de soporte para la fase estacionaria frecuentemente es sílica.

Debido a las desventajas que tiene la cromatografía de partición líquido/líquido hoy en día se prefiere utilizar la cromatografía de fases enlazadas.

#### 5.4.3. CROMATOGRAFIA DE FASES ENLAZADAS

La cromatografía de fases enlazadas se utilizó en el trabajo experimental de la tesis para separar los aminoácidos, por lo tanto, se hace mayor énfasis en este capítulo.

Los problemas inherentes en cromatografía de partición líquido/líquido pueden ser superados por el enlace químico de la fase estacionaria al material de soporte. La sílica se esterifica para formar ésteres de silicato. Las especies Si-C se producen cuando se lleva a cabo la clorinación y reacción con reactivos de Grignard, o la reacción con cloro-o(alcoxi)-silanos para formar siloxanos. Este último es usado para formar materiales estables de empacado comercial (Macrae, 1988).

Las fases enlazadas polares han sido preparadas con polaridades variadas desde el diol débil hasta las más fuertes amino fases. Estas últimas son utilizadas para separar compuestos polares. Las fases amino también tienen propiedades débiles de intercambio iónico y un cuidadoso control del pH puede ser importante, especialmente para compuestos iónicos. Estas fases han sido utilizadas con fases móviles acuosas.

Una alternativa para la cromatografía de fases enlazadas es usar una fase estacionaria hidrofóbica, preparada por el enlace de una cadena hidrocarbonada con la base de sílica. Este material es utilizado en conjunción con las fases polares móviles llevando a la técnica de cromatografía de fase reversa, (El término se utiliza porque las polaridades de la fase estacionaria y móvil son reversas en comparación con la cromatografía de fase normal. La interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria provoca fuerzas de dispersión (interacciones hidrofóbicas) y entonces los compuestos polares se eluyen primero. Han sido preparados un amplio rango de materiales para la fase reversa, desde  $C_1$  a  $C_{22}$ , pero de estos, el octadecil, y en menor proporción los materiales octil, son los más comunmente utilizados.

En muchos casos la elección juiciosa de las fases móviles permitirá un rango amplio de compuestos que se separan en una columna dada. Una columna  $C_{18}$  puede ser utilizada para separar azúcares, las mismas columnas pueden ser utilizadas para separar triglicéridos utilizando fases móviles no-acuosas de acetona-acetonitrilo (Macrae, 1988).

#### 5.4.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION

En la cromatografía de exclusión no hay interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria. La separación se basa en las diferencias de tamaño molecular de los solutos en solución por la permeación diferencial, a través de los poros del material de la fase estacionaria.

#### 5.4.5. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Es utilizada para separar los compuestos iónicos basándose en las diferencias de su carga neta. El requisito es que la fase estacionaria tenga carga opuesta a la de los compuestos de interés. En un intercambio iónico puro la interacción resulta enteramente de las atracciones coulombicas entre cargas opuestas.

El efecto de pH en la fase móvil del proceso de intercambio iónico es crítico. Los intercambiadores aniónicos y catiónicos son clasificados de manera análoga como ácidos y bases, fuertes o débiles, dependiendo de cómo varía la carga con la variación del pH.

#### 5.4.6. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Cromatografía de afinidad es un término general que engloba los métodos que implican una interacción específica entre la fase estacionaria y el compuesto particular o grupo de compuestos. La mayoría de estos métodos se basan en interacciones bioespecíficas como antígenos y anticuerpos.

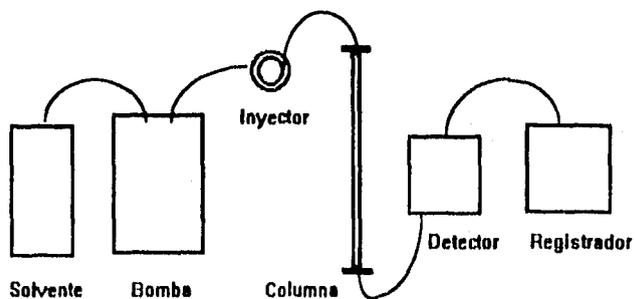
La cromatografía de afinidad es un excelente medio de aislamiento y purificación de un limitado número de compuestos. El material de soporte debe tener un ligante específico inmovilizado para el aislamiento/separación de una amplia gama de enzimas, ácidos nucleicos, glicoproteínas etc.

#### 5.4.7. CROMATOGRAFIA QUIRAL

Se lleva a cabo para la separación de formas enantioméricas por cromatografía líquida de columna. La fase estacionaria quiral debe ser preparada por la adsorción del

ligante quiral al material de soporte, o preferentemente por el enlace químico. La técnica ha sido utilizada para separar barbitúricos y otras drogas.

### 5.5. INSTRUMENTACION BASICA



#### 5.5.1 SOLVENTE

La naturaleza de los solventes depende de la cromatografía utilizada y puede variar en polaridad. Se puede degasar el solvente por medio de calor, vacío, ultrasonido o purgándolo con un gas inerte como helio (Macrae, 1988).

#### 5.5.2 BOMBAS

Las bombas con pistones alternativos proveen las bases para la mayoría de los sistemas de bombeo.

Muchos problemas se atribuyen al poco cuidado en el manejo de las bombas como: filtración inadecuada de solventes, el uso de solventes inapropiados y permitir que se formen precipitados en las cabezas de las bombas por no sacar los buffers.

El sistema de bombeo depende del tamaño y el tipo de la columna empleada y la viscosidad del solvente. Es esencial un flujo constante del solvente cuando se corren cromatogramas de estándares y muestras, porque se pueden afectar los tiempos de retención y los factores de capacidad (Hancock, 1984)

### 5.5.3. DISPOSITIVOS DE INYECCION

El método más común es una válvula de inyección en la cual la muestra se inyecta en la tubería de contención. El flujo del solvente es desviado en la tubería de contención para empujar la muestra a la columna (Hancock, 1984)

### 5.5.4. COLUMNA CROMATOGRÁFICA.

Las columnas comunmente utilizadas en HPLC son las de 4.5-5 mm y de diámetro y 10-25 cm de largo empacadas con fases estacionarias de 5 o 10 micrómetros. Las columnas son construidas de acero inoxidable.

El advenimiento de sistemas con cartucho supera la tecnología de columnas empacadas, en los cuales el material cromatográfico es empacado en una columna de vidrio, el cual es sostenido dentro de una columna de acero. Cuando la columna se acaba solo es necesario reemplazar los cartuchos.

Un sistema de cartuchos basado en compresión radial, fué desarrollado por Waters associates y es ampliamente utilizado por muchos cromatografistas.

La eficiencia en la columna cromatográfica depende, entre otras cosas del tamaño de partícula de la fase estacionaria. Si el tamaño de partícula medio es reducido de 5 a 3

micrómetros habrá una reducción significativa en la altura de plato.

La mayoría de las separaciones por HPLC se realizan a temperatura ambiente. Sin embargo los tiempos de retención pueden solo ser reproducibles si la temperatura de la columna es constante (Macrae, 1988).

#### 5.5.5. DETECTORES DE FLUORESCENCIA

El radio de moléculas orgánicas que absorben luz uv-visible comparado con aquellas que absorben y subsecuentemente reemiten radiación de una longitud de onda mayor, es muy grande. La fluorescencia, es inherente a medios más selectivos de detección que la absorción. Es mucho mas sensitiva, permitiendo la detección de compuestos con bajos niveles de concentración, como las aflatoxinas, aromáticos polinucleares, ciertas vitaminas y aminoácidos derivados.

El fenómeno de fluorescencia es muy susceptible a ser disminuido por oxígeno disuelto, impurezas en los solventes y compuestos de coelución, aun si estos no fluorescen interfieren con la cuantificación de los compuestos de interés.

#### 5.5.6. DERIVATIZACION

La detección de muchos compuestos puede ser mejorada por derivatización química. La derivatización puede tener lugar antes de la inyección o post-columna. La derivatización post-columna toma lugar introduciendo al agente derivatizador en el eluyente de la columna después de que los compuestos han sido separados. Esta reacción se lleva a cabo rápidamente antes de que la muestra pase a través del detector (Hancock, 1984)

## 5.6. GRADIENTE DE ELUCION.

En mezclas complejas de compuestos con una amplia variación de polaridad, no siempre es posible tener una adecuada resolución dentro de un tiempo razonable de análisis.

Los gradientes en HPLC pueden ser formados por dos métodos, sistemas de alta y baja presión. El utilizado por nosotros fue el sistema de alta presión. Se requiere una bomba para cada solvente, donde hay un dispositivo de mezclado previo al inyector. El gradiente es formado controlando las potencias relativas de las bombas.

El gradiente de elución se utiliza para el análisis de ciertas mezclas complejas, como aminoácidos en hidrolizados proteínicos, esto introduce problemas adicionales y debe ser utilizado cuando la elución isocrática no se puede utilizar. Los datos cuantitativos tienden a ser menos precisos y el tiempo requiendo para el reequilibrio de la columna previo a cada análisis subsecuente debe ser tomado en cuenta (Macrae, 1988)

## 5.7. ANALISIS CUALITATIVO

El grado de retención de un compuesto, o su factor de capacidad, es característico de ese compuesto bajo condiciones cromatográficas establecidas. Por tanto, una comparación de los factores de capacidad de estándares y componentes desconocidos en una mezcla puede teóricamente llevar a la identificación. Sin embargo, se debe recordar que el HPLC, como otras técnicas cromatográficas, no determinan estructuras pero sugieren compuestos que se comportan cromatográficamente de la misma manera bajo condiciones específicas.

Es esencial que el cromatograma para la muestra a ser analizada y aquellos para los

estándares se corran bajo condiciones idénticas, si se quiere sean válidas las comparaciones de datos de retención.

En periodos extensos las características de retención para una columna dada cambiarán. Un método para parcialmente superar este problema es utilizando el factor de capacidad de un compuesto conocido como una referencia interna y comparar la retención de los otros compuestos con esta.

Si hay alguna duda que el componente y un estandar particular tienen el mismo tiempo de retención, entonces a la muestra debe añadirse una cantidad pequeña de estandar y si coincide el pico de la muestra con el material adicionado es muy probable que se trate del mismo compuesto.

En los sistemas de HPLC-espectrometría de masas los compuestos eluidos pueden ser introducidos directamente en el espectrofotómetro de masas después de remover el solvente cromatográfico. Actualmente estos sistemas son ampliamente utilizados (Macrae, 1988).

## 5.8. ANALISIS CUANTITATIVO

La producción de datos cromatográficos cuantitativos de cromatogramas involucra involucra la determinación tanto de alturas como de áreas de picos. Un requisito en el análisis cuantitativo es la linealidad del sistema de detección. Es esencial que el detector muestre linealidad a través de el rango completo de concentraciones utilizadas.

Los métodos más importantes de cuantificación son aquellos que utilizan estándares externos o internos. En la formación del pico de interés en una muestra es simplemente comparado con el pico de un compuesto de concentración conocida en un cromatograma

estándar.

En el método de estándar interno se adiciona una cantidad conocida de un compuesto, no presente en la muestra naturalmente, y la cuantificación es entonces basada en el radio de el estándar y del pico de interés. Es necesario conocer los factores de respuesta absoluta para los estándares internos y los componentes de interés, o al menos su factor de respuesta relativo. El estándar interno puede ser agregado al principio del análisis y compensa las pérdidas durante el proceso de extracción y para las variaciones en el volumen de inyección (Macrae, 1988).

$$PF(i) = m(i) / A(i)$$

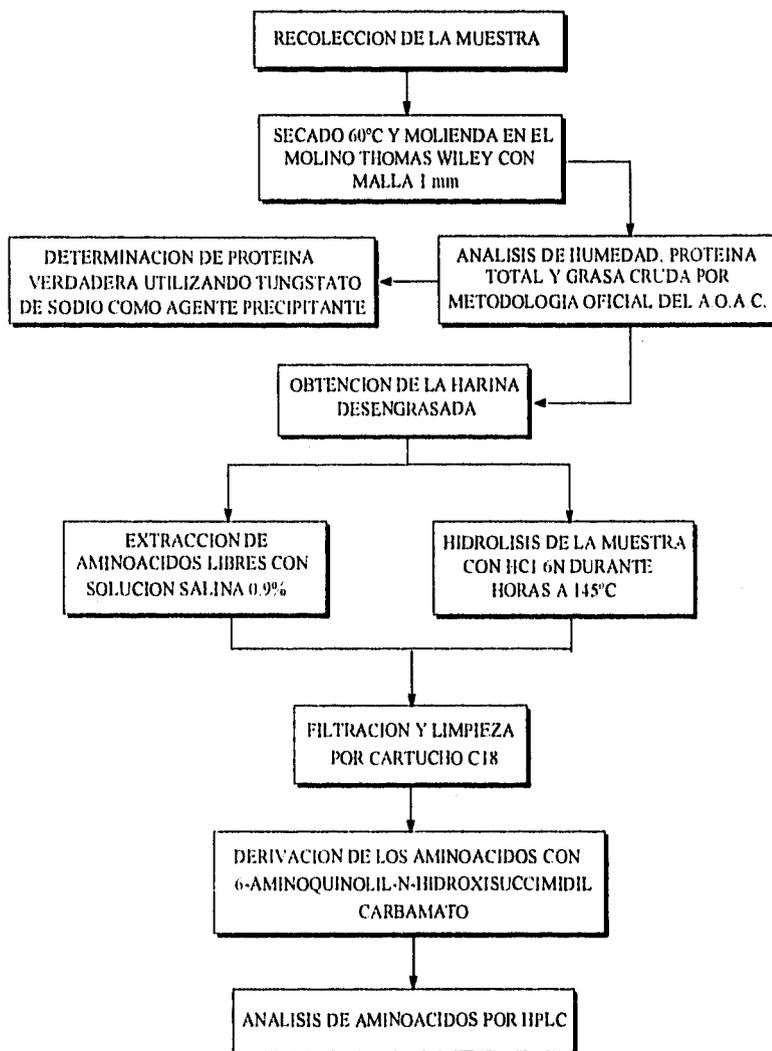
PF(i) es factor absoluto, M(i) masa del componente y A(i) area bajo el pico.

#### 5.9. PRECISION EN ANALISIS DE AMINOACIDOS.

La precisión de un método analítico es su capacidad para proveer el mismo resultado en aplicaciones repetidas a la misma muestra y es usualmente descrita como la relación del valor medio obtenido y el coeficiente de variación.

Las posibles razones para una mala precisión en el análisis de aminoácidos son: inexperiencia de colaboradores, resolución incompleta, identificaciones de picos incorrectas, reactivos impuros, variaciones en resinas, analistas y muestras. La preparación de la muestra y almacenaje, corrida de la muestra y procesamiento de datos pueden ser fuentes de error.

## PARTE EXPERIMENTAL



#### IV. PARTE EXPERIMENTAL

##### I. PREPARACION DE MUESTRAS Y ANALISIS PRELIMINARES

La recolección de las muestras se realizó de un árbol debidamente identificado, ubicado dentro del campus de la Facultad de Química de la UNAM.

*Tabla 1*

#### FASES DE MADURACION DEL FRUTO *ERYTHRINA AMERICANA* UTILIZADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

FASE	DESCRIPCION
Flor	Las flores son de color rojo brillante y se procesaron con la corola, pistilo, estambres, cáliz y pendúnculo.
Ejote	El fruto en esta fase es la vaina tierna y elástica de color verde. Al abrirla sus semillas apenas comienzan a formarse.
Fase de maduración fisiológica	Es cuando el fruto alcanza el máximo crecimiento celular de peso forma y tamaño. La vaina es verde todavía. Las semillas tienen un alto contenido de humedad y son de color rojo claro.
Fase madura y seca	La vaina es café quebradiza y se abre para liberar a las semillas ya secas de color rojo brillante.

Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, en el laboratorio se clasificaron y rotularon. A continuación se secaron en una estufa a 60 C.

Se realizó una molienda en el molino Thomas-Wiley con malla de 1 mm y las muestras se almacenaron en frascos de vidrio con tapa de rosca.

Los análisis de humedad, proteína total y grasa cruda se realizaron por la metodología oficial del A.O.A.C.

## 2. DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA

(A.O.A.C., 1975. Caraway, 1958. Matthew y Stanley, 1972).

### MATERIAL

Microdigestor marca TECATOR Mod. ab 20/40.

Papel Whatman No. 5 de 5 cm (poro cerrado) o equivalente.

### REACTIVOS

Mezcla digestiva (a)

Solución de ácido bórico (b).

Solución precipitante (c).

(a) Mezcla digestiva. Se mezclan durante aproximadamente 30 min los siguientes reactivos en la siguiente proporción: 3 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 300 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc) y 100 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

(b) Solución de ácido bórico con indicadores: Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlos en un matraz de 2000 ml; se adiciona agua hasta disolverlo, a continuación se agregan 70 ml de indicador A (100 mg de fenofaleina aforados a 100 ml con alcohol etílico) y 20 ml de indicador B (33 mg de verde de Bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con alcohol etílico).

(c) Solucion precipitante: disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , añadir 22 ml de  $\text{HCl}$  2 N y mezclar; aforar a 50 ml con agua destilada.

### PROCEDIMIENTO

a) Se pesan de 50-100 mg de muestra finamente molida (que pase por malla de 1 mm).

- b) La muestra se coloca en un vaso de precipitados de 50 ml. Agregar 5 ml de H<sub>2</sub>O caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, se agregan 2 ml de solución precipitante y se deja reposar 10 minutos; transferir cuantitativamente para su filtración en papel Whatman No. 5 utilizando 25 ml de agua destilada caliente y ligera succión.
- c) Proceso de digestión. Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, al cual se le agregan 0.5 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 ml de mezcla digestiva, se coloca en el digestor y se calienta aproximadamente 15 min, se retira del digestor y se espera a que se enfríe para añadirle 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% se introduce nuevamente al digestor y se calienta a 370 °C hasta que la digestión sea completa y de apariencia translúcida.
- d) Destilación. Se deja enfriar el tubo con la muestra digerida y se transfiere cuantitativamente a la copa de adición lavando el tubo con agua destilada (aproximadamente 10 ml). Después se añade al aparato de destilación 15 ml de NaOH 60%, lenta pero en forma continua. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer que contenga 50 ml de solución de ácido bórico. Se lava la copa de adición con 15 ml de agua destilada y se procede a la destilación y se continúa hasta completar un volumen de 150 ml aproximadamente.
- e) Titulación. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre el ácido bórico, el indicador que este contiene vira del café rojizo al verde esmeralda. Finalmente el complejo nitrogenado formado se titula con el HCL 0.01 N, hasta el vire del indicador , del verde esmeralda al rosa claro.
- f) Se calcula el porcentaje de nitrógeno y a continuación el por ciento de proteína verdadera.

## CALCULOS

$$\% \text{ NP} = \frac{(P-B) * N * \text{Meq} * 100}{M}$$

B = ml de la titulación del blanco.	Meq = miliequivalentes del nitrógeno (0.014).
P = ml de la titulación de la muestra.	M = gramos de la muestra.
N = normalidad del ácido clorhídrico.	% Proteína verdadera = % NP * F
NT= nitrógeno total.	NNP = NT - NP
NP= nitrógeno proteinico.	%NNP = 100 - %NP
NNP= nitrógeno no proteinico.	F = Factor de conversión 6.25

## 3. ANALISIS DE AMINOACIDOS POR HPLC

### 3.1. CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS POR HIDROLISIS ACIDA

#### 3.1.1. PROCEDIMIENTO PARA HIDROLIZAR LA PROTEINA DE LAS

#### MUESTRAS

(Lucas y Sotelo, 1982. Roach y Gehrke, 1970).

#### MATERIAL

Digestor marca TECATOR, mod. ab 20 / 40.

Papel Whatman duro y poro cerrado.

Tubos de cultivo con pared gruesa y tapón de rosca. La cubierta del tapón debe ser de teflón PYREX No. 9826.

#### REACTIVOS

Acido clorhídrico 6 N.

Ac. alfa-aminobutírico 2.5 mM como estandar interno.

Nitrógeno de alta pureza.

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

Antioxidante.

### HIDROLISIS

- a) Se pesa dentro del tubo de hidrólisis la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor de 5%). A continuación se adiciona con mucho cuidado la cantidad de ácido requerida, tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo de hidrólisis; de ser necesario lo anterior se puede ayudar con un agitador mecánico (vortex). Se agregan dos ml de solución de ácido  $\alpha$ -aminobutírico como estandar interno.

$$A = \frac{0.125 * 100}{\%P}$$

$$B = \frac{1 * 100}{\%P}$$

Donde: A = cantidad de muestra en gramos.

B = ml de ácido (HCl 6N).

%P = porcentaje de proteína en la muestra.

- b) Se procede a congelar el material de hidrólisis en un baño de hielo seco-acetona, una vez congelado se le insufla nitrógeno de altísima pureza y se procede a cerrar perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. Una vez descongelado el material se somete a las condiciones de hidrólisis en el digestor tecator; en este caso son de  $145\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  y 4 horas (contadas a partir del momento en que se coloca en el digestor).

- c) Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar un poco el tubo y se transvasa cuantitativamente a un matraz de bola de 100 ml, dándole algunas lavadas al tubo con agua caliente y solución lavadora. El hidrolizado ya colocado en el matraz de bola se trabaja en el rotavapor llevándolo dos veces a sequedad, con el fin de eliminar el exceso del ácido clorhídrico; a continuación se concentra el hidrolizado en el tercer lavado a un volumen menor de 30 ml.
- d) El hidrolizado concentrado se filtra con papel whatman duro y poro cerrado con ayuda de vacío; es conveniente dar un lavado de 5 ml de la solución lavadora, enjuagando el matraz de bola. El hidrolizado filtrado se afora a un volumen de 50 ml. Cuando la muestra no vaya a ser analizada inmediatamente es apropiado ajustar el hidrolizado a un pH de  $6.8 \pm 0.2$  con la ayuda de un potenciómetro y NaOH 5N.

### 3.1.2. FILTRACION

Para correr una muestra en el HPLC es importante una adecuada filtración, ya que evita dañar el equipo y la columna.

#### MATERIAL

Adaptador para filtración en jeringa Millipore xx30-012-00.

Membrana Millipore tipo GVWP 047 00 (tamaño de poro 0.22 micrómetros).

Filtrar 3 ml de cada muestra por membrana de 0.22 micrómetros.

### **3.1.3. LIMPIEZA POR CARTUCHO C 18**

(Manual of Sep-Pak Cartridge. Number PN 011188, 1993).

#### **MATERIAL**

Cartucho C18 WATO 51910.

#### **REACTIVOS**

Acetonitrilo grado HPLC.

Agua grado HPLC.

Solución de acetonitrilo 20 %.

- a) Activar un cartucho C18 con 6 ml de acetonitrilo grado HPLC (la jeringa se conecta por la parte más larga del cartucho).
- b) Se pasan lentamente por el cartucho 6 ml de agua HPLC.
- c) Mezclar 2 ml de muestra con 2 ml de acetonitrilo 20%.
- d) Pasar la muestra lentamente a través del cartucho.
- e) Eliminar el primer mililitro y colocar el siguiente mililitro en un recipiente. Esta fracción contiene todos los aminoácidos. Los compuestos de interferencia son retenidos en el cartucho.

### **3.1.4. DERIVATIZACION**

(Manual of Waters AccQ•Tag Chemistry Package. Number WATO52874, 1993)

#### **MATERIAL**

Mimidigestor marca TECATOR.

## REACTIVOS

Kid de reactivos Acc. Q TAG.

Se lleva a cabo la reacción entre el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccimidil carbamato (ACQ) y los aminoácidos con el objeto de formar derivados fluorescentes como se muestra en el capítulo 1.7.2.

- a) Llevar a 55 °C el bloque de calentamiento.
- b) Colocar con una micropipeta 20 microlitros de muestra en el fondo de un tubo de 6x50 mm.
- c) Usar una micropipeta para adicionar 60 microlitros de buffer AccQ-Fluor-Borato al tubo con la muestra. Utilizar el vortex para agitar brevemente.
- d) Agregar 20 microlitros de reactivo AccQ-Fluor.
- e) Dejar reposar la muestra a la temperatura ambiente 1 min.
- f) Tapar el tubo con cinta de teflón y colocarlo en el bloque de calentamiento a 55 °C contando con cronómetro 10 min.
- g) Transcurrido el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente 5 min y la muestra se encuentra lista para inyectar.

## 3.2. EXTRACCION DE AMINOACIDOS LIBRES

(Guerrero, 1980).

### MATERIAL

Columna de vidrio 37.7 X 1 cm con soporte de vidrio poroso.

## REACTIVOS

Acido clorhídrico 0.02 N

Acido picrico 1% en agua

Buffer pH 1.5

Estandar de norleucina 1.25 mM.

Resina de intercambio aniónico Dowex Ag 2-X8 malla 200-400

Solución salina 0.9%

## PROCESO DE EXTRACCION

- a) Se pesa un gramo de muestra en un vaso de precipitado de 50 ml, se agregan 15 ml de solución salina 0.9%, se tapa el vaso con parafilm y se pone en agitación magnética durante dos horas y se le adicionan 2 ml de norleucina 1.25 mM.
- b) Toda la muestra se trasvasan a tubos de centrifuga y se centrifugan a 4000 r.p.m. durante 15 min. El sobrenadante se filtra con papel No. 52 en un matraz aforado de 50 ml.
- c) El sedimento se vuelve a resuspender en 15 ml de 0.9% de solución salina y se realizan otras dos extracciones, filtrando el sobrenadante en el mismo matraz completando el aforo.
- d) Se toma una alícuota de 5 ml, se coloca en un tubo de centrifuga y se adiciona por goteo acido picrico hasta que ya no haya precipitación de proteínas. Se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se pasa por una columna de 35.7 X 1.0 cm que contiene 2 cm de altura de resina de intercambio aniónico Dowex Ag 2-X8 malla 200-400 con el objeto de eliminar el ácido picrico y se lava tres veces con 5 ml de ácido clorhídrico 0.02 N.

- e) Se recibe el líquido translúcido sin restos del amarillo característico del ácido picrico en un matraz de bola de 50 ml. Se lleva a sequedad en un rotavapor con un baño de 80 °C y se le pone hielo al agua del refrigerante. Los restos sólidos del matraz se resuspenden con 3 ml agua caliente HPLC y se lleva a sequedad. Se resuspende el residuo con tres ml de agua caliente. Se transvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml y se afora con agua.
- f) La filtración y derivatización de la muestra se realiza de la misma manera que la que la utilizada para los aminoácidos hidrolizados.

### 3.3. ANALISIS DE AMINOACIDOS POR HPLC

(Manual of Waters AccQ•Tag Chemistry Package. Number WAT052874, 1993).

(Manual of Silica analytical column. Number 035699, 1991).

#### MATERIAL

Columna Nova-pack C18, 3,9 x 150 mm.. Diámetro medio de poro: 60 Å. Tamaño de partícula: 4 micrómetros.

Portafiltros "All glass", 47 mm xx 15 047 00 o equivalente.

#### REACTIVOS

Acetonitrilo grado HPLC.

Eluyente "A" concentrado grado HPLC. Es una mezcla de acetato de sodio trihidratado 19 %, ácido fosfórico líquido 6.9 %, trietilamina 1.72 %, azida de sodio 0.1 %, agua 72.28 %.

## EQUIPO

Detector: de exploración por fluorescencia.

Longitud de onda de excitación 250 nm.

Longitud de onda de emisión 395 nm.

Bombas: Water 510.

Eluyente A: 50 ml de eluyente "A" concentrado mas 500 ml de agua HPLC.

Eluyente B: acetonitrilo 60%.

Tabla 2

TABLA DE GRADIENTES

#	TIEMPO	FLUJO	%A	%B	CRV
1	0.0	1	100	0.	6
2	0.5	1	98	2.	6
3	15.0	1	93	7.	6
4	19.0	1	90	10.	6
5	32.0	1	67	33.	6
6	33.0	1	67	33.	6
7	34.0	1	0	100	6
8	37.0	1	0	100	6
9	38.0	1.2	100	0	6
10	59.0	1.2	100	0	6
11	60.0	1	100	0	6

Temperatura del horno: 36 °c

Tiempo de corrida: 40 min.

Los datos se procesaron en la estación de trabajo para cromatografía Máxima 820.

### 3.3.1. AMINOGRAMAS

El aminograma 1 es un estandar de aminoácidos proteínicos y raros donde se puede observar una buena separación entre los picos, el nombre de cada aminoácido y sus tiempos de retención, así como también el tiempo tan corto de la corrida en relación a métodos reportados por autoanализador de aminoácidos.

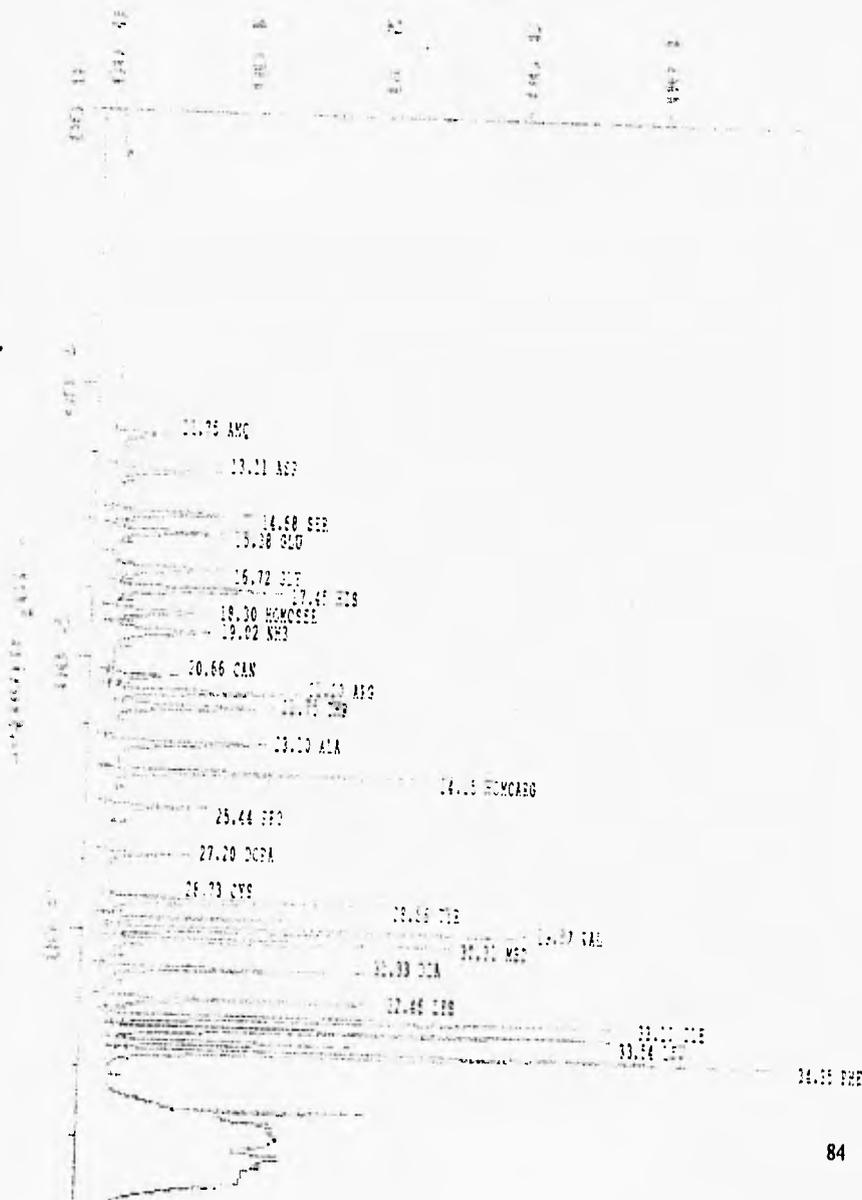
Con el objeto de ilustrar el aminograma de una muestra, se incluye el número 2, que es de fase madura y seca de colorín después de hidrólisis ácida, en donde se puede observar una buena separación entre los picos y la casi ausencia de interferencia debida a otros compuestos fluorescentes, debido a la limpieza por cartucho C18 que se llevó a cabo antes de la derivatización de los aminoácidos.

Sample: ESTANDB 2  
Acquired: 07-JUN-95 17:01  
Inj Vol: 5.00

Channel: ESI10 EM395 SW  
Method: C:\MSDCHEM\CAACG

Filename: STD66320  
Operator:

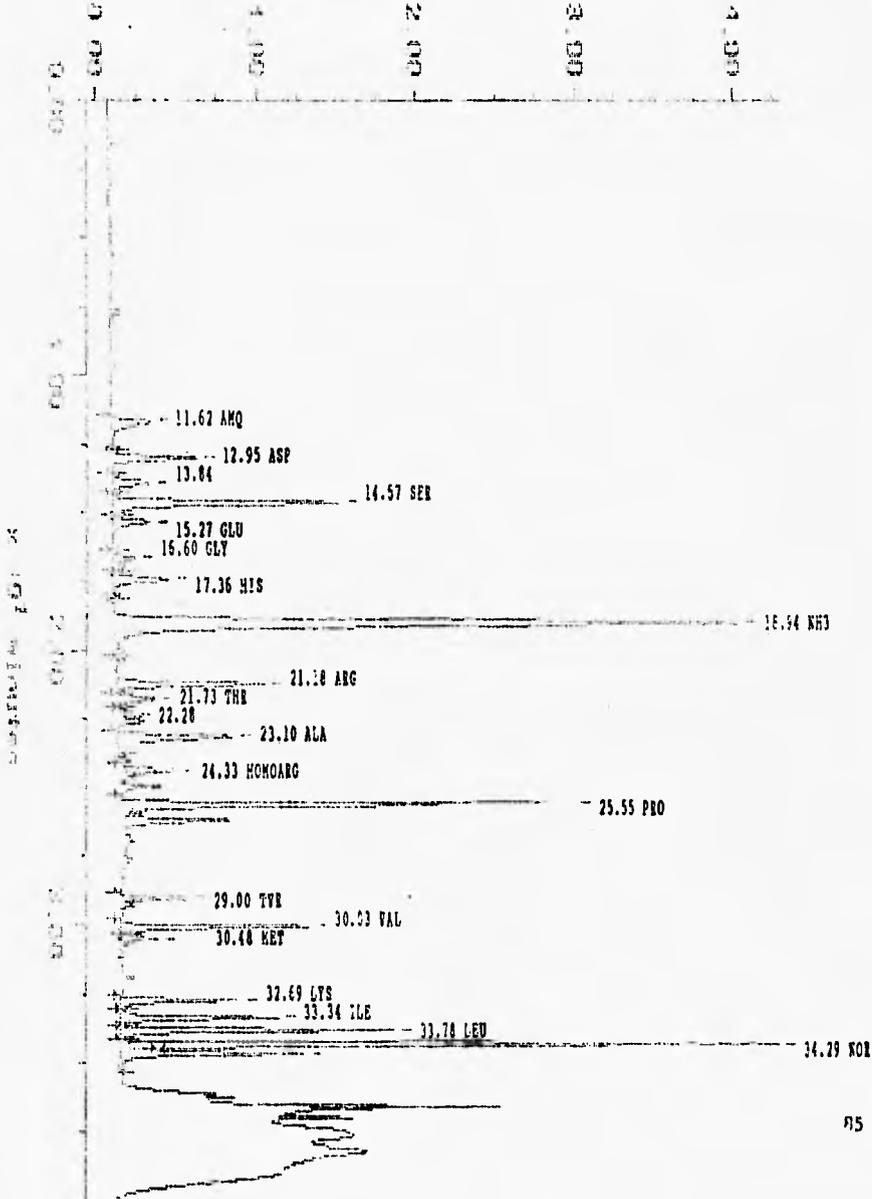
× 10<sup>-1</sup> units



Sample: SEMILLA MAD. 1 Channel: EX250 EM395 NM  
Acquired: 08-JUN-95 12:03 Method: C:\MAX\DATA\AVACQ  
Dilution: 1 : 20.000 Amount: 0.062

Filename: COLOR-60  
Operator:  
Inj Vol: 5.00

$\times 10^{-1}$  volts



## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### I. HUMEDAD, GRASA CRUDA, PROTEINA TOTAL Y PROTEINA

#### VERDADERA

La recolección de las muestras tardó tres meses, que es el tiempo aproximado para obtener las fases de maduración del ciclo completo de la flor al fruto seco

Es importante observar los cambios de humedad en las diferentes fases de desarrollo del fruto *E. americana*, ya que para comparar los cambios reales de los valores entre las diferentes fases se referencian en base seca.

Tabla 1

#### CONTENIDO DE HUMEDAD

(g / 100 g muestra)

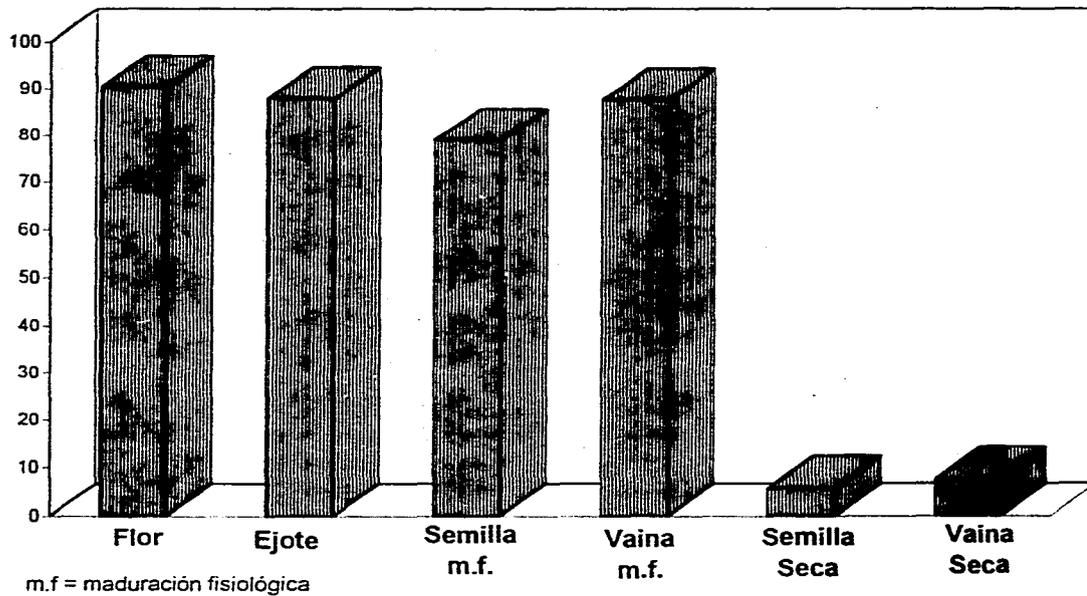
Muestra	Humedad original
Flor	90.30
Ejote	87.83
Semilla m. f.	78.90
Vaina m. f.	87.60
Semilla seca	5.67
Vaina seca	7.56

m.f. = maduración fisiológica

En la tabla 1 se observa que la humedad del fruto desde la flor al estado de maduración fisiológica es muy alta, disminuyendo considerablemente en la semilla y vainas secas.

En la tabla 2 podemos observar que el contenido de grasa aumenta conforme el fruto

**GRAFICA 1**  
**CONTENIDO DE HUMEDAD**  
**(g/g100 de muestra)**



se desarrolla, pero la deposición de la grasa se lleva a cabo principalmente en la etapa intermedia del ejote a la semilla de maduración fisiológica.

*Tabla 2*

GRASA ( g / 100 g)

	Grasa base seca	Grasa en muestra original
Flor	1.20	0.11
Ejote	1.26	0.15
Semilla m. f.	13.23	2.66
Vaina m.f.	0.74	0.09
Semilla seca	15.32	14.45
Vaina seca	0.84	0.78

m.f. = maduración fisiológica

*Tabla 3*

NITROGENO TOTAL (NT), NITROGENO PROTEINICO (NP) Y NO PROTEINICO

(NNP) (g N / 100 g base seca)

Muestra	NT	NP	NNP (a)	%NP (b)	%NNP (c)
Flor	3.42	1.75	1.67	51.17	48.83
Ejote	3.17	2.24	0.93	70.67	29.33
Semilla m. f.	4.92	4.38	0.54	89.03	10.97
Vaina m.f.	1.80	1.06	0.74	58.89	41.11
Semilla seca	4.47	5.17	0.30	97.52	5.48
Vaina seca	1.64	1.23	0.41	75.00	25.00

m.f. = maduración fisiológica

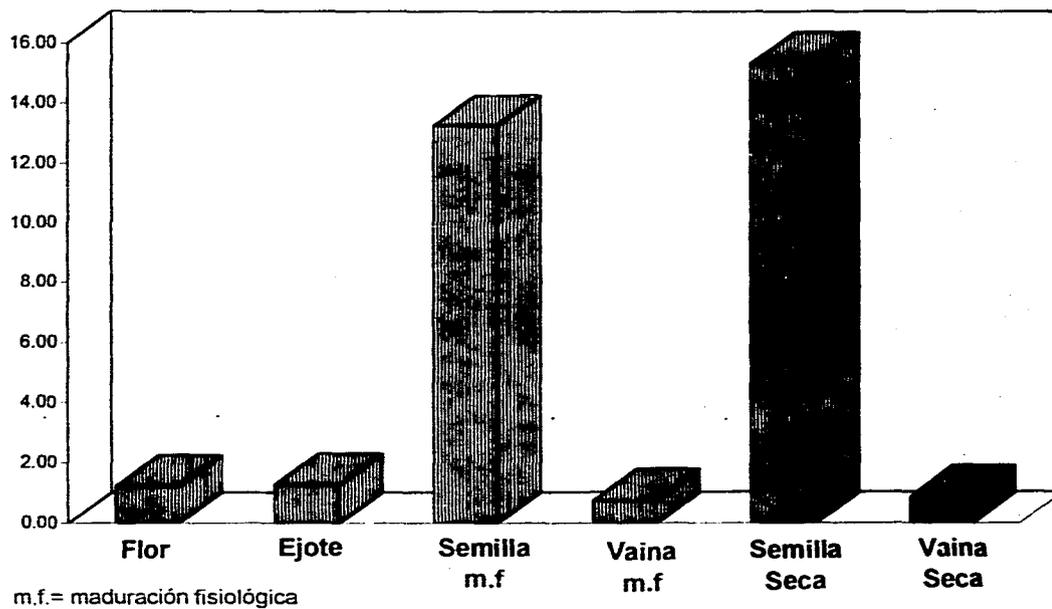
(a)  $NNP = NT - NP$

(b)  $\%NP = (NP / NT) 100$

(c)  $\%NNP = 100 - \%NP$

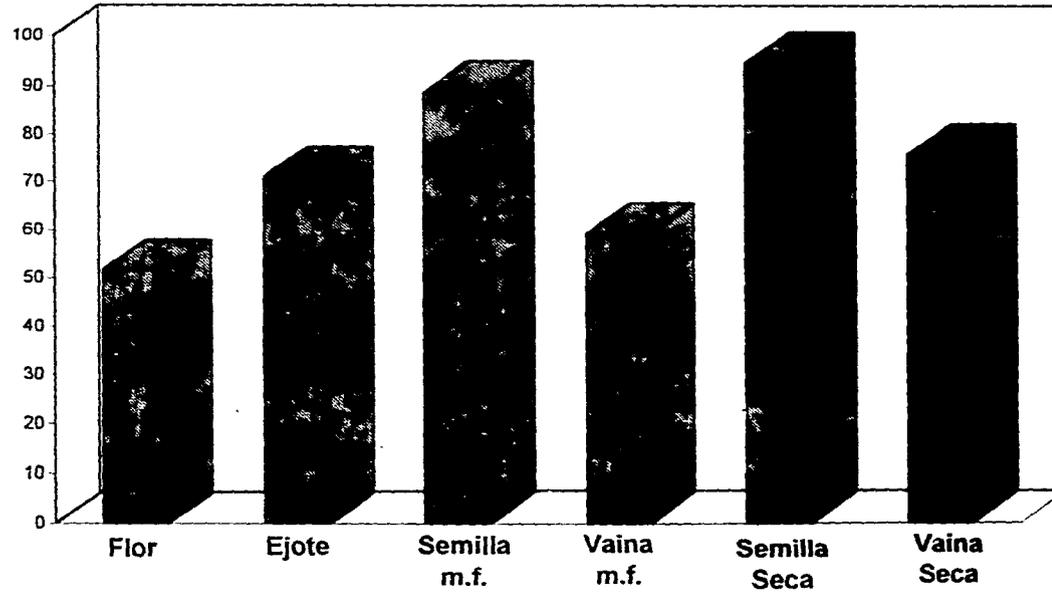
**GRAFICA 2**

**GRASA (BASE SECA)  
(g/100g de muestra)**



GRAFICA 3

% DE NITROGENO PROTEINICO (NP X 100)/NT



m.f. = maduración fisiológica

Existe un orden decreciente en cuanto a la concentración de nitrógeno no proteínico (NNP) en los diferentes estadios de maduración del fruto, desde la flor hasta el fruto maduro y seco (semilla). Por lo tanto puede pensarse que los compuestos que forman parte del NNP sean precursores de otros metabolitos útiles para la maduración del fruto.

Si comparamos las fases en base seca, podemos observar claramente que la deposición de nitrógeno total y proteínico al igual que la de grasa se lleva a cabo principalmente en la etapa intermedia del ejote y la semilla de maduración fisiológica.

*Tabla 4*

NITROGENO TOTAL (NT), NITROGENO PROTEINICO (NP) Y NO PROTEINICO (NNP) EN LAS MUESTRAS ORIGINALES (g / 100 g)

Muestra	NT	NP	NNP (a)	%NP (b)	%NNP
Flor	0.33	0.17	0.16	51.52	48.48
Ejote	0.38	0.27	0.11	71.05	28.95
Semilla m.f.	1.04	0.92	0.12	88.46	11.54
Vaina m.f.	0.22	0.13	0.09	59.09	40.91
Semilla seca	5.16	4.87	0.29	94.38	5.62
Vaina seca	1.51	1.14	0.37	75.5	24.50

m.f. = maduración fisiológica

(a)  $NNP = NT - NP$

(b)  $\%NP = (NP \times 100) / NT$

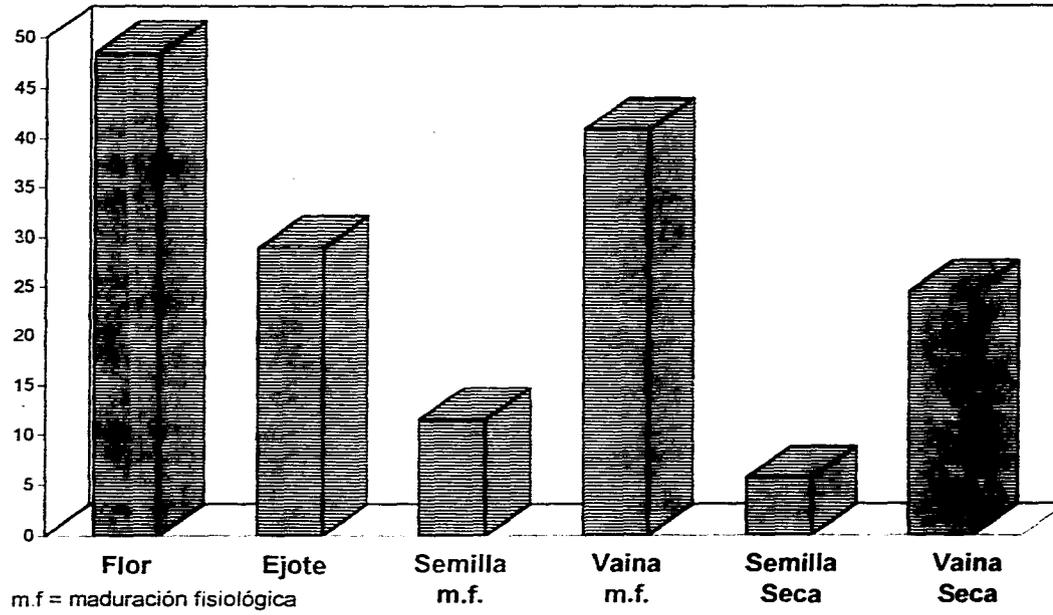
(c)  $\%NNP = 100 - \%NP$

El nitrógeno total referido a la muestra original sobresa en la semilla madura y seca en cuanto a la concentración, debido principalmente a la deshidratación de la semilla desde la etapa de maduración fisiológica hacia la última fase.

En la tabla 5 se observa que la proteína verdadera (base seca) aumenta a través del

GRAFICA 4

% DE NITROGENO NO PROTEINICO  
(100-%NP)



desarrollo del fruto, siendo de 89.03% en las semillas en maduración fisiológica y de 97.52% en las semillas secas.

*Tabla 5*

PROTEINA TOTAL (PT) Y PROTEINA VERDADERA (PV)

(g / 100 g base seca)

Muestra	PT (a)	PV (b)
Flor	21.31	10.94
Ejote	19.81	14.00
Semilla m.f.	30.75	27.37
Vaina m.f.	11.25	6.62
Semilla seca	34.14	32.31
Vaina seca	10.25	7.68

m.f. = maduración fisiológica

(a)  $PT=NT \times 6.25$

(b)  $PV=NP \times 6.25$

*Tabla 6*

PROTEINA TOTAL (PT) Y PROTEINA VERDADERA (PV) EN LAS MUESTRAS

ORIGINALES (g / 100 g)

Muestra	PT (a)	PV (b)
Flor	2.06	1.06
Ejote	2.37	1.69
Semilla m.f.	6.50	5.75
Vaina m.f.	1.37	0.81
Semilla seca	32.25	30.44
Vaina seca	9.44	7.12

m.f. = maduración fisiológica

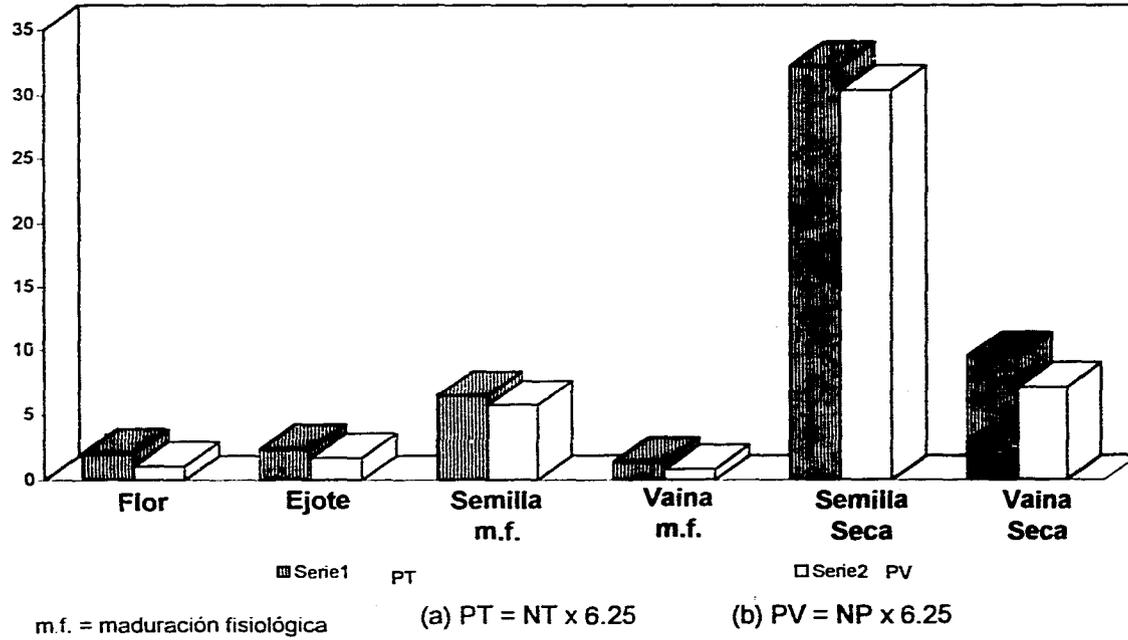
(a)  $PT=NT \times 6.25$

(b)  $PV=NP \times 6.25$

El porcentaje de proteína cruda en la muestra original es de 32.25%, siendo en las otras fases menor al 10% (Tabla 6).

**GRAFICA 5**

**PROTEINA TOTAL (PT) Y PROTEINA VERDADERA (PV) EN LA MUESTRA ORIGINAL (g/100g de muestra )**



## 2. AMINOACIDOS

En el presente trabajo una parte importante fue el establecer la metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo de aminoácidos proteínicos, libres y raros por HPLC.

La filtración fisicoquímica que proponemos con un cartucho C18 permite que los compuestos de mayor polaridad a la de los aminoácidos se eliminen antes de inyectar la muestra al HPLC, esto con la finalidad de disminuir interferencias debidas a otros compuestos en los aminogramas.

*Tabla 7*

### AMINOACIDOS DISPENSABLES DE PROTEINAS

(g aa / 16 g N)

Aminoácido	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca
ASP	24.11	14.80	10.15	18.42	13.07	5.95
SER	3.54	3.82	4.57	3.50	5.58	4.24
GLU	6.59	8.19	14.52	6.36	19.3	7.27
GLY	2.29	3.07	3.46	2.54	4.35	3.13
HIS	2.04	2.25	2.32	2.55	2.93	2.46
ARG	3.02	3.67	3.87	3.02	5.59	2.52
ALA	3.18	4.39	4.82	3.39	4.48	3.48
PRO	8.51	14.73	5.34	8.66	5.31	5.87
Totales	53.83	54.81	49.03	48.41	59.08	34.88

m.f. = maduración fisiológica

Como en la filtración fisicoquímica se utiliza acetonitrilo este compuesto ayuda a conservar la muestra en congelación hasta por un mes. Por los estudios realizados se comprobó que la cantidad de aminoácidos en la muestra no varía a lo largo de este

tiempo. Sin embargo en los resultados que se presentan la determinación de aminoácidos se realizó el mismo día de la preparación de la muestra.

Tabla 8

AMINOACIDOS INDISPENSABLES DE PROTEINAS

(g / 16 g N)

Amino-ácidos	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca	FAO 1985
ILE	2.56	3.11	3.44	2.45	4.07	2.42	4.00
LEU	4.56	5.68	7.36	4.16	8.57	4.54	7.04
LYS	3.70	5.28	5.29	4.44	8.37	3.67	5.44
PHE	2.41	2.91	3.28	1.68	3.91	2.12	6.08
TYR	2.28	2.66	3.12	1.96	4.26	1.84	
Aromáticos	4.69	5.57	6.40	3.64	8.17	3.96	
CYS	-	-	-	-	0.81	-	3.52
MET	1.00	1.22	1.38	0.74	1.62	0.77	
Azufrados	1.00	1.22	1.38	0.74	2.43	0.77	
THR	2.47	2.98	3.54	2.19	4.22	2.98	4.00
TRP	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	0.96
VAL	3.35	4.13	4.44	3.50	4.76	3.43	4.96
Totales	22.33	27.97	31.85	21.12	40.59	21.77	36

m.f. = maduración fisiológica

La reacción de derivatización de los aminoácidos es muy sencilla y los compuestos fluorescentes que se producen resultan ser muy estables durante una semana. Debe cuidarse que el tubo de reacción se guarde perfectamente sellado para que no varíe la concentración de la muestra, ya que se trabajan cantidades muy pequeñas.

Durante el desarrollo del fruto *E. americana* los aminoácidos esenciales hidrolizados aumentan, así como también se eleva la calidad de la proteína (Tabla 8). Se considera que la semilla seca es de buena calidad si tomamos solo la calificación química como referencia y sin tomar en cuenta los tóxicos presentes (Tabla 9). Los aminoácidos azufrados son limitantes en primer lugar y en segundo lugar valina. Es aconsejable, para tener un mayor criterio en cuanto a la calidad de proteína, realizar la determinación de triptofano debido a que en la mayoría de las leguminosas ocupa el segundo lugar como aminoácido limitante

Tabla 9

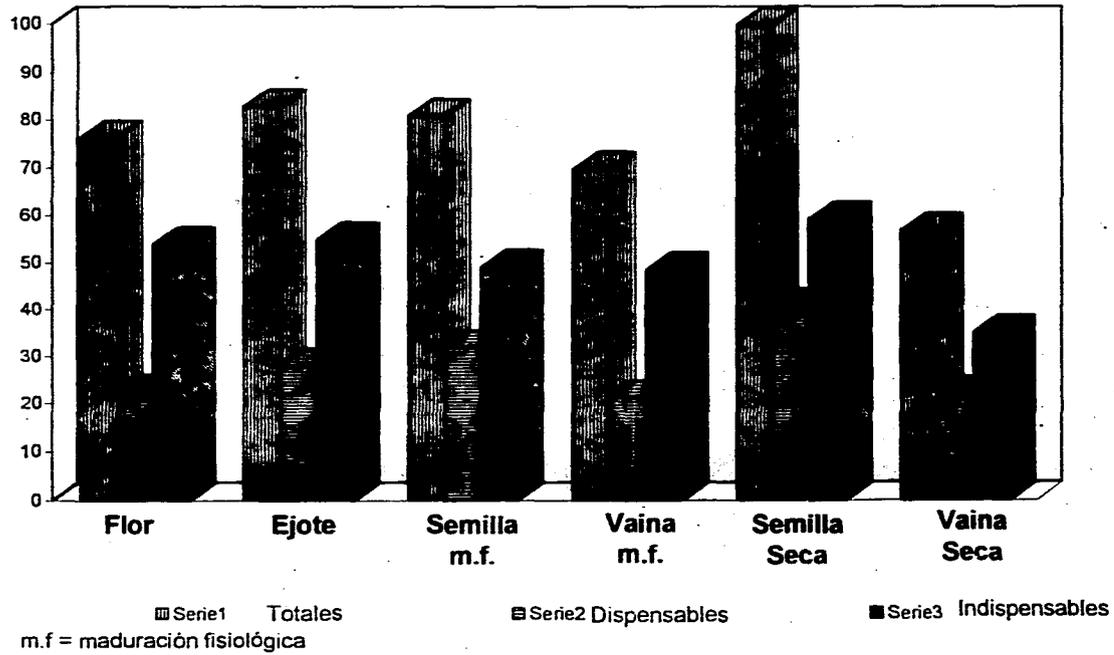
CALIFICACION QUIMICA DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES EN LA  
PROTEINA

Aminoácidos	Flor	Ejote	Semilla m. f	Vaina m. f.	Semilla Seca	Vaina Seca
ILE	64.0	77.7	86.0	61.2	>100	60.5
LEU	65.2	81.1	>100	59.4	>100	64.9
LYS	67.3	96.0	96.2	80.7	>100	66.7
Aromáticos	78.2	92.8	>100	60.7	>100	66.0
Azufrados	28.6	34.9	39.4	21.1	69.4	22.0
THR	61.7	74.5	88.5	54.6	>100	74.5
TRP	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
VAL	67.0	82.6	88.8	70.0	95.2	68.6

m. f. = maduración fisiológica

$$CQ = (\text{conc. a. a. muestra} / \text{conc. a. a. estandar FAO}) \times 100$$

**GRAFICA 6**  
**AMINOACIDOS DE HIDROLIZADOS**  
**PROTEICOS**  
**(gaa/16gN)**



*Tabla 10*

**AMINOACIDOS DE PROTEINAS**

(g aa / 16 g N)

	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca
Dispensables	22.33	27.97	31.85	21.12	40.59	21.77
Indispensables	53.83	54.81	49.03	48.41	59.08	34.88
Totales	76.16	82.78	80.88	69.53	99.67	56.65

m.f. = maduración fisiológica

*Tabla 11*

**AMINOACIDOS LIBRES DISPENSABLES**

(g aa / 16 g N)

	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca
ASP	0.393	0.637	0.255	0.260	0.120	-
SER	-	-	0.636	-	0.223	0.014
GLU	7.450	7.121	0.456	6.859	0.037	0.105
GLY	0.051	0.020	0.033	0.050	0.011	0.015
HIS	0.492	0.171	0.337	0.252	0.077	-
ARG	0.356	0.209	0.424	0.828	0.159	0.037
ALA	0.422	0.571	0.918	0.787	0.065	-
PRO	5.574	5.797	1.990	5.317	0.704	0.308
Totales	14.74	14.526	5.051	14.35	1.805	0.477

m.f. = maduración fisiológica

Como se observa en la tabla 10 los aminoácidos proteínicos varían en las diferentes fases, aunque deberíamos esperar alrededor de 100 g de aminoácidos totales por 16 g de

nitrógeno. La única fase cercana a esta cantidad es la semilla madura y seca. Sin embargo debemos tomar en cuenta que estamos refiriendo los aminoácidos al nitrógeno total y no al proteínico. Como se mostró en la tabla 3, excluyendo a las semillas, el nitrógeno no proteínico es muy alto en todas las fases restantes. La única razón para reportar los aminoácidos con respecto al nitrógeno total en lugar del proteínico, es que podemos comparar los datos con la bibliografía actualmente disponible.

*Tabla 12*

**AMINOACIDOS INDISPENSABLES LIBRES**

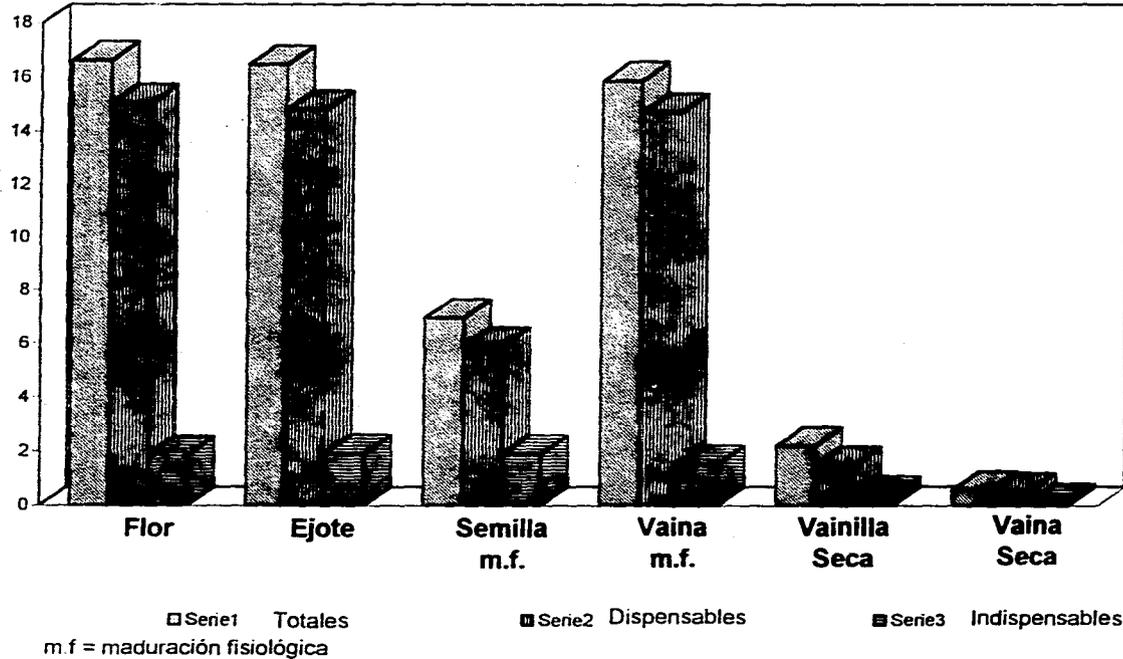
(g aa / 16 g N)

	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla Seca	Vaina Seca
THR	0.189	0.129	0.1107	0.186	0.025	-
TYR	0.136	0.112	0.1124	0.094	0.057	0.058
VAL	0.915	0.540	0.9993	0.490	0.148	0.050
MET	0.055	0.078	0.1248	0.052	0.031	-
LIS	0.153	0.017	0.1796	0.095	0.039	-
ILE	0.177	0.152	0.113	0.186	0.028	-
LEU	0.223	0.134	0.261	0.166	0.072	0.001
PHE	-	0.037	-	0.274		
TOTALES	1.849	1.919	1.901	1.543	0.399	0.109

m.f. = maduración fisiológica

Las harinas desengrasadas de la flor y el ejote contenían 16.88 y 16.72 gaa / 16 g N de aminoácidos libres respectivamente. Durante el desarrollo del fruto las harinas exhibieron un decremento de aminoácidos hacia la fase de maduración fisiológica, presentándose la menor concentración de aminoácidos libres en la semilla y vaina seca. En conjunción con

**GRAFICA 7**  
**AMINOACIDOS LIBRES**  
**(gaa/16gN)**



la disminución de aminoácidos libres incrementan los aminoácidos en proteína, lo que indica la deposición.

Tabla 13

AMINOACIDOS LIBRES

(g aa / 16 g N)

	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca
Totales	16.59	16.45	6.95	15.89	2.21	0.59
Dispensables	14.74	14.53	5.05	14.35	1.81	0.48
Indispensables	1.85	1.92	1.90	1.54	0.40	0.11

m.f. = maduración fisiológica

En la tabla 13 se observa claramente que los aminoácidos libres individuales totales disminuyen durante la maduración, este comportamiento varía de manera irregular en los aminoácidos libres individuales, dependiendo de las fases de maduración y partes del fruto en que se encuentren.

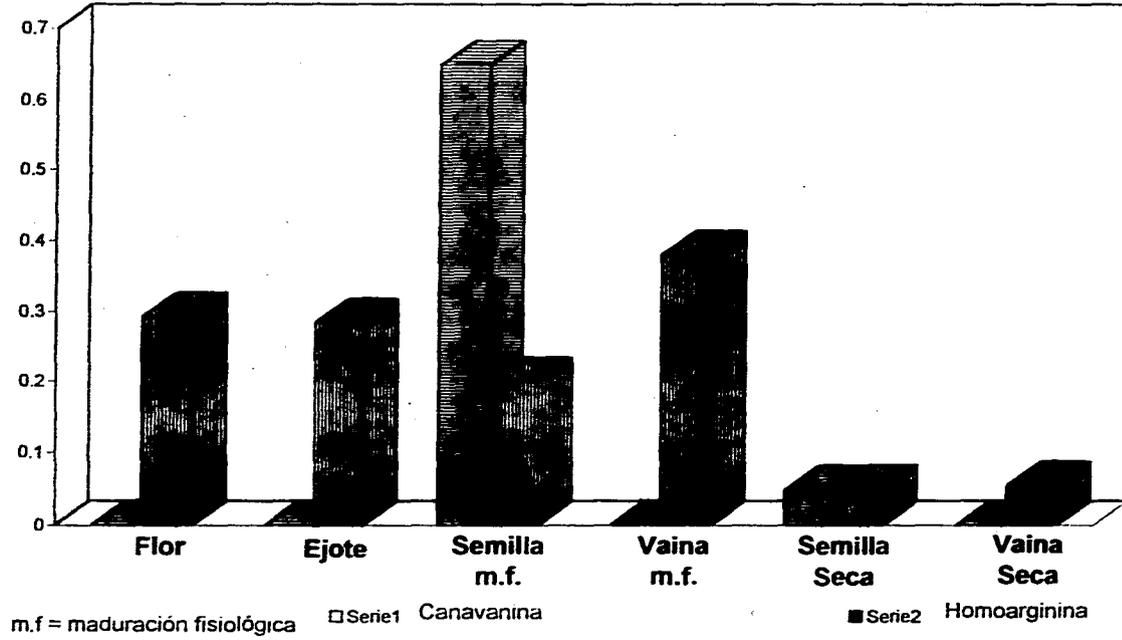
En lo referente al análisis de aminoácidos libres, además de los 18 aminoácidos normales, el método descrito permite, identificar y cuantificar homoserina, homoarginina, canavanina, dihidroxifenilalanina (DOPA), ácido djenkólico y ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico. De éstos solamente homoarginina y canavanina están presentes en *F.americana*.

Homoarginina tiene concentraciones similares en la flor y el ejote, pero aumentan en la fase de maduración fisiológica. Finalmente la concentración disminuye en la semilla y vaina seca.

Canavanina muestra un patrón de comportamiento similar. Suponemos que puede encontrarse en la flor y el ejote en concentraciones inferiores al límite de detección del

**GRAFICA 8**

**AMINOACIDOS RAROS**  
**(/g aa /16 gN)**



método. Canavanina está presente en mayor concentración en semillas de fase de maduración fisiológica que en la semilla seca.

*Tabla 14*

AMINOACIDOS RAROS (g aa / 16 g N)

	Flor	Ejote	Semilla m. f.	Vaina m. f.	Semilla seca	Vaina seca
CAN	-	-	0.649	-	0.047	-
HOMOARG	0.292	0.284	0.200	0.380	0.048	0.053

m.f. = maduración fisiológica

Pensamos que homoarginina y canavanina no se sintetizan para ser reservas de nitrógeno en la futura germinación de la semilla, sino que son metabolitos intermediarios para la síntesis de otros compuestos. Un estudio bioquímico profundo sería de gran interés para comprobar esta teoría.

A diferencia de homoarginina, no se detectó canavanina en las vainas. Esto no es extraño debido a que no solo en las vainas sino también en las semillas se realizan numerosas síntesis e interconversiones, y la semilla por consecuencia no puede ser relegada únicamente para abastecimiento externo de compuestos amino.

## VI. CONCLUSIONES

1. La deposición de la grasa y proteína se lleva a cabo principalmente en la etapa intermedia del ejote y la semilla de maduración fisiológica. Estos compuestos aumentan proporcionalmente en la semilla seca y madura debido principalmente a la deshidratación de la semilla.

2. Durante el desarrollo del fruto *E. americana* los aminoácidos libres disminuyen, presentándose la menor concentración en la semilla y vaina secas.

3. En conjunción con la disminución de aminoácidos libres, se incrementan los aminoácidos en las proteínas y por consiguiente la deposición de esta.

4. En lo referente al análisis de aminoácidos libres el procedimiento descrito permite separar e identificar a los 18 aminoácidos normales, así como cuantificar, homoserina, homoarginina, canavanina, dopa, ácido djencólico y ácido diaminobutírico.

5. Homoarginina y canavanina están presentes en *E. americana* y muestran un patrón de comportamiento similar a lo largo del desarrollo del fruto. La mayor concentración se presenta en la fase de maduración fisiológica, por lo que se piensa que son metabolitos intermediarios de otros compuestos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- ◆ Aguilar, C.A: y Zolla, C. Plantas tóxicas de México. 1a ed. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, 1982.
- ◆ Aguilar, M. I., Giral, F. and Espejo, O. Alkaloids from the Flowers of *Erythrina americana*. *Phytochemistry*. 1981. 20 (8): 2061-2062.
- ◆ Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 12a. ed. U.S.A., 1975.
- ◆ Badui Dergal Salvador. Química de los alimentos. Ed. Alhambra mexicana, 2a. ed. México, 1990.
- ◆ Basha S. M. M., Cherry, J. D, and Young C. T. Changes in free amino acids, carbohydrates, and proteins of maturing seeds from varios peanut (*Arachis hypogaea L.*) cultivars. *Cereal Chem*. 1976. 53 (4): 586-597.
- ◆ Bodwell, C.E., Petit, L (eds). Plant Proteins For Human Food. Academic Publishers group. U.S.A., 1983.
- ◆ Bohinsky C. Robert. Modern concepts in Biochemistry. Ed. Allyn and Bacon, INC. Fifth edition. U.S.A., 1987.
- ◆ Caraway, W.T. Stabilized tungstatic acid reagent for blood deproteinization. *Chem. Analyst*. 1958. 47: 44-45.
- ◆ FAO/WHO/UNU. "Energy and Protein Requirements" Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, WHO Tech. Rep. Ser. No. 724. Geneva, Switzerland. 1985.

- ◆ Fennema R. Owen. *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona. 1990.
- ◆ Fowden, L., Lewis, D. and Tristram, H. Toxic amino acids: their action as antimetabolites. *Adv. Enzymol.* , 1967. 29: 89-163.
- ◆ Hancock, S. W. *Handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides, and proteins*. Vol I y II. CRC Press, Inc. U.S.A., 1984.
- ◆ Harborne, J.B., Boulter, D., Turner, B:L. (eds.). *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic press, INC. New York, 1971.
- ◆ Herrera, Emilio. *Elementos de Bioquímica*. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México, 1993.
- ◆ Inglett, G.E., Charalambous G. (eds). *Tropical Foods: Chemistry and Nutrition*. Vol. 2. Ed. Academic press. U.S.A., 1979.
- ◆ Liener, I. E. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Ed. Academic press, 2a. ed. U.S:A, 1980.
- ◆ Lienner, I.E. Berardi, C.L. (eds.). *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, INC. New York, 1969.
- ◆ Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L., Sotelo, A. True protein content and non-protein amino acids present in legumes seeds. *Nutrition Rep. Int.* 1988. 37 (3): 545-553.
- ◆ Lucas B. and Sotelo A. Amino acid determination in pure proteins, foods, and feeds using two different acid hidrolisis methods. *Anal. Biochem.* 1982. 123: 349-356.
- ◆ Macrae, R. (ed.). *HPLC in food analysis*. Ed. Academic Press Limited. Second edition. Great Britain, 1988.

- ◆ Manual of Waters AccQ•Tag Chemistry Package. Number WAT052874. Rev O. Millipore corporation. U.S.A., 1993.
- ◆ Manual of Silica Analytical Column. Number 035699 Rev 1, Millipore corporation, U.S.A./ April, 1991
- ◆ Manual of Sep-Pak Cartridge. Number PN 011188 Rev 6, Millipore corporation, U.S.A./ August 1993.
- ◆ Matthews J.L. and Stanley S.R. Métodos de laboratorio. Ed. Interamericana, 2ª edición. 1972. P.65.
- ◆ Matthews H. R. (ed). Legumes. Ed. Marcel Dekker, Inc. U.S.A., 1989.
- ◆ Molina, M. R., Argueta, C.E. Bressani, R. Extraction of nitrogenous constituents from the Jack Bean (*Cannavalia ensiformis*). J. Agr. Food Chem. 1974. 22 (2): 309-312.
- ◆ Norton, G. Plant Proteins. Ed. Butterworths. U.S.A., 1978.
- ◆ Ordoñez D.M.J., Pardo, T.E. Estudio etnobotánico de tres especies de flores comestibles en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Biotica. 1982. 7 (2): 305-321.
- ◆ Ortega, M., Sanchez, C., Chacon, E. Rendon, J.L., Rocio, E., Masso, F., Montaña, L. F. and Zenteno, E. Purification and characterization of lectin from *Erythrina americana* by affinity chromatography. Plant Science. 1990. 72: 133-140.
- ◆ Purcell, A.E., Walter, W.M. Jr. Changes in Composition of the Nonprotein-Nitrogen Fraction of "Jewel" Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* (Lam.)) during Storage. J. Agric. Food Chem. 1980, 28 (4): 842-844.
- ◆ Rajaram, M. and Janardhanan, K. Nutritional and chemical evaluation of raw seeds of *Cannavalia gladiata* (Jacq) DC: and *V. ensiformis* DC: The under utilized food and

- fodder crops in India. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1992. 42: 329-336.
- ◆ Roach, D. and Gehrke, C.W. The hidrolisis of proteins. *J. Chromatog.* 1970. 52:393-404.
  - ◆ Romero Torres Juan Carlos. Determinación de metionina y cistina por medio de sus derivados oxidados. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México, 1988.
  - ◆ Sarwar, G.y Mcdonough, F.E. Evaluation Protein Digestibility- Corrected Amino Acid Score Method for Assessing Protein Quality of Foods. *Assoc. Off Anal. Chem.* 1990. 73 (3): 347-356.
  - ◆ Singh, D. K.; Rao, A. S., Singh, R. Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum L*) cultivar. *J. Sci. Agric.* 1988. 43: 373-379.
  - ◆ Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B., y Giral, F. Comparative Studies of the Alkaloidal Composition of Two Mexican *Erythrina* Species and Nutritive value of the Detoxified Seeds. *Agric. Food Chem.* 1993. 41 (12): 2340-2343.
  - ◆ Shewry P.R. *Plant Protein Engineering*. Ed. Cambridge University Press. First edition. U.S.A., 1992.
  - ◆ Stryer Lubert. *Bioquímica*. Vol 1y 2. 3a edición. Ed Reverté, S.A. México, 1988.
  - ◆ Zacharius, R.M. Composition of the nitrogenous components of the bush bean seed (*Phaseolus vulgaris*).including isolation of  $\delta$ - acetylmithine. *Phytichemistry*, 1970. (9): 2047-2051.