



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Evaluación del Valor Nutricio y Contenido de
Tóxicos y Factores Antinutricionales en la
Semilla del Tehuistle (*Acacia bilimekii*).

T E S I S
Que para obtener el título de
QUIMICO DE ALIMENTOS
p r e s e n t a
ARTURO TOLEDO ARENAS

2000



México, D. F.



2000



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.

AGRADECIMIENTOS:

**A LA MAESTRA ANGELA SOTELO POR SU GRAN AYUDA Y PACIENCIA PARA LA
CULMINACION DE ESTE TRABAJO EXPERIMENTAL.**

**AL MAESTRO BERNARDO LUCAS, POR SUS ACERTADOS COMENTARIOS Y SU
APOYO INCONDICIONAL.**

A MI MADRE; MARIA DEL ROSARIO, POR QUE ESTE ES EL REGALO MAS BELLO
QUE HE RECIBIDO EN MI VIDA Y A DIOS POR HABERME DADO ESTA MUJER COMO
MADRE.

A MIS HERMANOS: ERNESTO, MARIA DE LA LUZ, TERESA, MARIA, MANUELA,
BERNARDINO Y OSCAR, POR SER PARTE DE ESTA ILUSION QUE HOY ES UNA
REALIDAD.

Canto a las mujeres que en una eres; a los valles de tus mundos donde camino; a la ribera de tu alma donde obtengo la flor de tu ternura.

Le canto a tu luz que cada día me hace amarte más; a tu mirada infinita de amor; a tu sonrisa que me da vida al recordarte.

Canto a tu corazón guardián de mil tesoros, a tu mirada que llena mis latidos de paz y de alegría.

Canto a tu cuerpo que es mi sangre, a las lágrimas de amor y de tristeza por esta humanidad, a tus alas que a veces temen a los vientos.

Canto a tu canto que deshace silencios, a tu habla de soles que iluminan mis sentidos, a tu majestad sin par, a quien doy mis sueños e ilusiones y mis logros.

Porque tú, haces el prodigio de que el amor germine y florezca, y por ende, yo viva y sea.

Sofía.

Jurado asignado:

.Presidente:

Prof. Sotelo López Angela

.Vocal:

Prof. Pedro Valle Vega

.Secretario:

Prof. Lucas Florentino Bernardo

.Primer suplente:

Prof. Gil Vieryra Leticia

.Segundo suplente:

Prof. Sandoval Guillén Bertha Julieta

Sitio donde se desarrollo el tema:

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

Asesor del tema:



M.en C. Angela Sotelo López

Sustentante:



Arturo Toledo Arenas.

INDICE:

I.- INTRODUCCION

II.- OBJETIVOS

III.- GENERALIDADES

III.1 Descripción Botánica de las Leguminosas

III.2 Composición Química de las Leguminosas

III.3 Contenido de Aminoácidos de las Leguminosas

III.4 Tóxicos presentes en Alimentos de Origen Vegetal

III.5 Digestibilidad en Rumen Artificial

III.6 Aspectos Botánicos de *Acacia bilimekii*

III.7 Usos de *Acacia bilimekii*

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

VI.- CONCLUSIONES

VII.- BIBLIOGRAFIA

Capítulo I.

INTRODUCCION.

La cubierta vegetal de México es una de la más variadas de la tierra, pues en su territorio están representados prácticamente todos los ecosistemas que se conocen en nuestro planeta, desde los desiertos, hasta las densas y frondosas selvas; desde la vegetación netamente tropical, hasta los páramos de alta montaña (1).

Aproximadamente el 40% del territorio de la república mexicana lo conforman las zonas áridas y semiáridas en donde uno de los principales problemas lo constituye el bajo nivel de vida, además de la baja productividad del sector agropecuario y la escasa o nula utilización de los recursos naturales de dichas zonas (2).

En estos ecosistemas (zonas áridas y semiáridas) en donde los suelos son muy salinos, existen temporadas largas de sequía; la vegetación nativa consiste por lo general en un complejo de cactáceas y arbustos, en donde están ampliamente representadas las leguminosas (3).

Las semillas de estas leguminosas muestran un contenido de proteína alrededor del 12 - 55%, dependiendo de las especies, y condiciones agronómicas principalmente. Estas semillas constituyen una fuente de proteína básica en las dietas de todos los grupos de poblaciones y su consumo es mayor en los países en vías de desarrollo principalmente de América latina y Africa. En los países desarrollados muchas de las leguminosas se utilizan como forraje rico en proteínas para producción animal intensiva (4,5).

El género *Acacia* es muy común en el territorio nacional; varias de sus especies se encuentran distribuidas en los climas semiáridos ya que son constituyentes primarios de la vegetación. En estos sistemas, son utilizados como árboles ornamentales, para fabricar muebles (*Acacia seyal*), para obtención de taninos (*Acacia meamsi*), en la elaboración de

perfumes (*Acacia farnesiana*), así como también algunas son utilizadas como plantas medicinales como es el caso de *Acacia bilimekii* (6,7,8).

Debido a la poca importancia que se les da a dichas zonas existe muy poca información sobre la potencialidad como alimento que su flora puede tener. Aún con esto el número de especies de *Acacia* domesticadas y explotadas es una pequeña proporción del total (5,9).

En México se han registrado 1500 especies de leguminosas de las cuales solamente 20 de ellas se consumen, siendo el frijol (*Phaseolus vulgaris*) de las más conocidas y consumidas(10).

Acacia bilimekii es una leguminosa la cual pertenece a la subfamilia de las Mimosoideas, en general este grupo no proporciona alimentos de consumo humano, pero hay algunas especies que suministran sustancias comestibles(11), al ser consumidas por la ganadería caprina (12). puede ser una fuente alternativa de materia prima en la elaboración de alimentos balanceados para la producción animal(11,12). Por lo que es interesante el estudio bromatológico, toxicológico, así como también la evaluación por métodos químicos de la calidad de la proteína de esta leguminosa.

Para tener un mejor aprovechamiento de estas fuentes alternativas de proteína es de vital importancia conocer los recursos con los que cuenta nuestro país resultando muy importante la investigación que sobre la flora silvestre se realice con el fin de evaluar su posible uso en la alimentación del hombre y/o animales(9). Por lo anteriormente mencionado, es interesante y necesario realizar investigaciones en leguminosas silvestres originarias de nuestro país como la *Acacia bilimekii*.

Capítulo II.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

-Establecer el valor nutricional de la semilla del Tehuistle (*Acacia bilimekii*), con la finalidad de que dicha información sirva para el aprovechamiento de esta leguminosa en la alimentación animal.

Objetivos particulares:

- Determinar el análisis proximal de *Acacia bilimekii*.
- Evaluar el contenido de factores antinutricionales y tóxicos en la semilla del Tehuistle.
- Conocer la digestibilidad in vitro y con líquido ruminal de la semilla del Tehuistle.

Capítulo III.

GENERALIDADES:

III.1. Descripción Botánica de *Acacia billmeki*.

Las leguminosas constituyen una familia extensa de aproximadamente 18,000 especies, y las plantas comprendidas dentro de este grupo varían de tamaño, desde las pequeñas hierbas anuales de las zonas áridas, hasta los grandes árboles que crecen en los trópicos y que producen vainas de hasta un metro de largo(13). Las semillas de estas leguminosas se encuentran contenidas en una vaina característica y el contenido proteínico de estas es alto debido a la simbiosis que establecen con *Rhizobium*. Las raíces tienen nódulos que encierran a estas bacterias que desempeñan un papel singular y vital en la nutrición de estos vegetales(11).

La subfamilia Papilionoidea es la que más diversidad muestra de las tres subfamilias en las que se dividen las leguminosas, es aquí donde se encuentran las de gran importancia económica ya que comprende a oleaginosas (soya y cacahuate principalmente), las especies que se utilizan como forrajes (alfalfa), o bien semillas de leguminosas utilizadas en la alimentación humana como por ejemplo el frijol, habas, chícharos, lentejas etc.

Las subfamilia Caesalpinioidea también incluye un número económicamente importante de especies especialmente en las tribus Caesalpinieae y Cassieae, las cuales son utilizadas para fines ornamentales, así como también por su apreciada madera, como fuente de taninos y algunas producen material comestible como el tamarindo(9).

La subfamilia Mimosoideae está compuesta por cinco tribus y una de esas tribus son las Acaciae, en donde uno de los géneros económica y ecológicamente interesantes son las Acacias (8,14).

III.2. Composición Química de las Leguminosas.

Las proteínas se encuentran distribuidas tanto en el reino vegetal, siendo de gran importancia en la dieta del hombre, ya que las proteínas forman parte de todas las células que conforman los tejidos del cuerpo y en donde se realizan diferentes funciones. Las semillas de las leguminosas son una buena fuente de proteína, aproximadamente de un 12 al 55%(11), en donde la mayor parte de estas son globulinas (alrededor de un 80%), las albúminas se encuentran en un 8-10%. Las leguminosas son importantes productos alimenticios en todos los países en desarrollo; en donde son la principal fuente proteica. Son consideradas como un suplemento natural de los cereales, aunque son deficientes en los aminoácidos metionina y cisteína, pero contienen cantidades adecuadas de lisina y triptofano, mientras que los cereales son deficientes en lisina pero tienen cantidades considerables de metionina y cisteína con respecto a las leguminosas(15).

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

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

Las leguminosas contienen del 57-65% de hidratos de carbono (principalmente almidón) que en general es bien aprovechados por los organismos superiores. Es importante mencionar que existen algunos hidratos de carbono, tales como los

galactósidos, pentosas, y hemicelulosas que no son aprovechados por los animales monogástricos(13).

La fibra cruda es un grupo importante de los carbohidratos, está formada principalmente por hemicelulosa, celulosa y la lignina, las cuales no son digeridas por el sistema digestivo humano; sin embargo, los rumiantes si pueden aprovechar este tipo de compuestos. La concentración de estos hidratos de carbono es de 2 al 5% en las leguminosas(17).

Las grasas constituyen alrededor del 1-2%, en peso de la mayoría de las leguminosas. Solamente el cacahuete (*Arachis hipogaea*) y la soya (*Glycine max*) constituyen fuentes importantes de lípidos. Las grasas de las semillas de las leguminosas son ricas en ácidos grasos esenciales, tales como el araquidónico, linoleico y linolénico.

El residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha incinerado denominado cenizas, constituye en las leguminosas el 2 al 4 %. Al igual que las gramíneas, las leguminosas tienden a tener concentraciones altas de potasio y fósforo, pero por lo regular son mucho más ricas que las gramíneas en calcio y magnesio (18).

III.3. Contenido de Aminoácidos de las Leguminosas.

De los veinte aminoácidos, que conforman las proteínas, ocho son nutricionalmente indispensables para el organismo humano, ya que este no es capaz de sintetizarlos, estos son: Fenilalanina, Lisina, Isoleucina, Leucina, Triptofano, Valina, Metionina, y Treonina. Las leguminosas son deficientes en los aminoácidos metionina y cisteína, pero contienen cantidades adecuadas de lisina y triptofano.

El resto de los aminoácidos se consideran nutricionalmente no indispensables debido a que se pueden sintetizar en los tejidos del hombre a partir de los aminoácidos esenciales o de otras fuentes nitrogenadas(19).

El valor biológico o calidad nutritiva de las proteínas de las leguminosas (cuyo valor oscila entre 70 y 80) está limitado por la escasez relativa dentro de su estructura de uno o más aminoácidos indispensables(20).

Todos los aminoácidos indispensables deben estar presentes en la dieta, y para tener una eficiencia óptima, deben encontrarse en cantidades adecuadas. Si falta uno de los aminoácidos esenciales, el organismo no podría sintetizar una proteína nueva(21).

III.4. Tóxicos Presentes en Alimentos de Origen Vegetal:

La naturaleza ha dotado a ciertas plantas la capacidad de sintetizar una amplia variedad de sustancias químicas, las cuales se sabe que actúan como mecanismo de defensa ya que ejercen ciertos efectos dañinos cuando son ingeridas por el hombre o los animales(10).

A principios de este siglo se descubrió que las semillas de algunas leguminosas, al incorporarse de forma cruda a dietas experimentales, los animales presentaban un crecimiento anormal debido a la presencia de sustancias que se consideraron como tóxicas tanto para el hombre como para los animales. Estos primeros estudios se deben a Osborne y Mendel, los cuales nombraron a estas sustancias como "Toxialbúminas" (22).

Es por esto que se considera importante la determinación de sustancias tóxicas que afectan el aprovechamiento de las leguminosas, y sobre todo en las variedades que constituyen una parte importante en la dieta de grandes grupos de población ya sean humanos o animales. Sus efectos indeseables se pueden producir a diferentes niveles, algunas de estas sustancias se denominan factores antinutricionales porque afectan el metabolismo de nutrimentos y otras son verdaderos tóxicos porque alteran o producen anomalías fisiológicas o morfológicas de tejidos que no pueden atenuarse por una suplementación de la dieta(23).

Hemaglutininas.

En las semillas de las leguminosas y también en otras plantas existen sustancias de origen proteínico las cuales son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de distintos animales; a estas sustancias se les conoce por el nombre de fitohemaglutininas o lectinas.

La primera descripción de una lectina fué presentada por Stillmark que en 1889 estudió la semilla de ricino y atribuyó su toxicidad a una proteína que llamó ricina. Landstainer y Raubitschek en 1908, encontraron en las leguminosas el grupo de lectinas más importante, desde el punto de vista nutricional, observaron que los extractos producían aglutinación, pero en otros no se detectaba acción tóxica al mismo tiempo(22).

Posteriormente Summer aisló de una leguminosa (*Canavalia ensiformis*) una globulina que llamó concavanina A y que presentó una actividad aglutinante. La hemaglutinina de soya fue aislada por Liener y colaboradores en 1953, quienes estudiaron sus características químicas y biológicas(24).

Las lectinas son proteínas, algunas presentan uniones covalentes con azúcares y otras contienen grupos sulfhidrilos. Poseen una actividad específica para ciertas moléculas de azúcar, así la actividad hemoaglutinante se explica muy probablemente por la reacción entre las lectinas con ciertos grupos receptores situados en la superficie de las membranas de los glóbulos rojos(22,24)

Para que una lectina presente algún efecto dañino sobre el organismo, es necesario que resista el proceso de digestión.

Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Se supone que la lectina interacciona con grupos receptores situados en la superficie de las células que conforman la mucosa gástrica, de una manera semejante como se combinan con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de nutrientes(25).

Se ha observado en estudios anteriores que cuando animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas con elevado contenido de lectinas presentan diarreas, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso, retardo en el crecimiento, y en algunos casos la muerte(26).

Las fitohemaglutininas como la mayoría de las proteínas, son termolábiles, y generalmente su efecto tóxico se puede eliminar o disminuir notablemente por medio del tratamiento térmico adecuado, presentándose así un incremento en cuanto al valor nutritivo de las leguminosas(27).

Inhibidores de tripsina.

Los inhibidores de proteasas son también proteínas que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Los inhibidores de tripsina son probablemente los más ampliamente distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas. Actúan inhibiendo a la tripsina, la cual es una enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de nutrimentos en los humanos y animales monogástricos(28).

Estos inhibidores de proteasas han llamado la atención de los nutriólogos porque es posible que tengan un papel importante en el bajo valor nutritivo de las proteínas vegetales.

En cuanto al mecanismo de inhibición existen varias teorías entre los investigadores entre las cuales se menciona que:

-Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que ellos inhiben.

-La enzima e inhibidor experimentan algún tipo de interacción enzima-sustrato.

-Los inhibidores son resistentes a la proteólisis, aunque en la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos(29).

Los inhibidores más estudiados son el de Kunitz y el de Bowman-Birk. Entre la proteasas inhibidas por estas sustancias están las proteasas de tiales, pepsina, trombina, colagenasas, y carboxipeptidasas(30).

En los animales de experimentación que han sido tratados con extractos purificados de inhibidores de tripsina, han presentado hipertrofia pancreática, inhibición en el crecimiento y aumento en la secreción de enzimas pancreáticas(31).

La mayoría de los inhibidores de tripsina en las leguminosas pueden ser destruidas mediante el tratamiento térmico, con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de la proteína(23).

Glucósidos cianogénicos.

La presencia de glucósidos cianogénicos en el reino vegetal esta ampliamente distribuida aunque en cantidades traza. Estos glucósidos pueden contener en su molécula un monosacárido generalmente glucosa, o bien un disacárido como la gentobiosa unidos a un grupo ciano(22).

El HCN es un potente inhibidor del sistema respiratorio a nivel celular, ya que su sitio de acción es sobre la citocromo oxidasa, la cual es el catalizador respiratorio terminal de los organismos aerobios. Es difícil predecir las dimensiones del envenenamiento, ya que la sensibilidad al HCN en los diferentes individuos es muy variable(31).

La amigdalina fué el primer glucósido cianogénico identificado en las almendras amargas, presentandose también en otras clases de semillas. La durrina se encuentra en el sorgo y algunos pastos, en la linaza podemos encontrar lotaustralina y linamarina, está última se presenta en diferentes variedades de leguminosas(22).

Los glucósidos cianogénicos no son tóxicos por sí mismos, sino lo son por el HCN liberado, la forma como se libera el HCN de estos glucósidos es por vía enzimática, llegando a presentar autólisis de estos compuestos, solo cuando se presenta un daño físico en la planta. La liberación espontánea del HCN en la planta depende de la presencia de una enzima específica, la β -glucosidasa y agua, los enzimas se encuentran extracelulares y actúan solamente después de la ruptura de los tejidos de la semilla. La dosis letal de HCN para un individuo, cuando se ingiere por vía oral se ha estimado entre 0.5-3-5mg/Kg de peso corporal. Con estas dosis se presentan síntomas iniciales de adormecimiento periférico con ligeros mareos, seguidos por confusión mental, cianosis, temblores, convulsiones, coma y finalmente la muerte. En caso de que las dosis sean menores a la dosis letal, puede presentarse dolor de cabeza, sensación de opresión en la garganta, palpitaciones y debilidad muscular. En estos casos el organismo es capaz de llevar a cabo un proceso de detoxificación, ya que existe una sulfotransferasa (rodanasa) que cataliza la reacción del HCN con el tiosulfato formando sulfito y tiocianato que es eliminado por la orina(31,32).

Saponinas.

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

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

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

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

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

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

De acuerdo con lo anterior, el que una saponina sea incapaz de hemolizar, implicará que carezca o que tiene menos afinidad por el colesterol(22).

En cuanto al contenido de saponinas en ciertos productos alimenticios, el estatus del Merk Index (1979) indica que prácticamente las saponinas no son tóxicas para el hombre por ingestión oral(33).

Por otro lado algunos autores sí reportan cierta toxicidad oral en algunas saponinas como se puede observar a continuación:

Las dosis letales varían de 25 a 3000 mg/ Kg de peso corporal (Tal como se observa en la tabla de toxicidad oral de algunas saponinas). Las saponinas normalmente crean lesiones gastrointestinales, y si llegan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, producir fallas en la respiración, convulsiones y coma(34).

Tabla de toxicidad oral de algunas saponinas.

Fuente de saponina	Animal	Dosis	Dosificación	Referencia
Sapindus sapindus	Ratón	DL	3000	(Spector, 1956)
	Ratón	DL	1000	(Spector, 1956)
	Ratón	DL50	50	(Vogel & Marek, 1962)
Agrosthema githago (common corn cockle)	Conejo	DL	56-52	(Spector, 1956)
	Perro	DL	20-25	(Spector, 1956)
Saponaria vaccaria	Ratón	DL50	960	(Abubakirov et. al. 1960)
Aesculus hippocastanum (horse chesnut)	Rata	DL50	50	(Abubakirov et. al. 1960)
Hedera helix (ivy)	Rata	DL50	100	(Abubakirov et. al. 1960)
Gypsophila paniculata	Rata	DL50	50	(Vogel & Marek, 1962)
Cyclamen europaeum	Rata	DL50	160	(Vogel & Marek, 1962)
Digitalis purpurea (fox glove)	Rata	DL50	50	(Vogel & Marek, 1962)
	Ratón	DL50	80	(Spector, 1956)

La dosis letal esta representada como DL.

La dosis letal media esta definida como DL 50.

Versión condensada de datos recopilados por George (34)

Se ha observado que las saponinas de alfalfa y soya inhiben a ciertas enzimas, como la α quimotripsina , las proteasas de Tribolium y la colinesterasa , asi como las enzimas concernientes al ciclo del ácido cítrico, la inhibición es no específica y se ve suprimida por la presencia de cualquier otra sustancia proteínica(35)

Se ha sugerido que la presencia de saponinas en las plantas es un mecanismo de defensa, ya que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y protozoarios patógenos. También se ha considerado que las saponinas pudieran ser material de reserva.

Alcaloides:

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

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

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

Los alcaloides forman un grupo muy heterogéneo de acción farmacológica potente en los animales. No todos los alcaloides poseen la misma toxicidad, ni su efecto tóxico es el mismo en todos ellos; así, encontramos alcaloides neurotóxicos, hepatotóxicos, teratogénicos, cardiotóxicos, entre otros. Su acción, en general, sobre los humanos se da sobre el sistema nervioso y el endócrino, siendo su acción, principalmente sobre el sistema nervioso(36).

Se ha considerado que los alcaloides son productos terminales del metabolismo del nitrógeno en las plantas, como protección contra ataques de insectos y herbívoros, así también se ha sugerido que algunos intervienen estimulando y regulando actividades como el desarrollo, el metabolismo y reproducción de la planta, como agentes destoxicantes.

Los alcaloides son sintetizados a partir de los aminoácidos y su degradación biológica da lugar a aminoácidos raros(37).

III. 5. Digestibilidad en rumen artificial.

Se han empleado extensamente los estudios en rumen artificial con el fin de valorar la utilización de distintas sustancias alimenticias especialmente los forrajes. Johnson en 1966, elaboró una revisión de algunos de los métodos empleados. Aunque el procedimiento puede variar de uno a otro laboratorio, las necesidades esenciales incluyen la fermentación por parte de los microorganismos en el rumen sobre el sustrato que se desea probar en un buffer durante un periodo de tiempo. Para analizar cuantitativamente los resultados se emplea la fermentación de la celulosa o de materia seca.

Esta técnica requiere pequeñas cantidades de material a probar y pueden valorarse muchos forrajes en un periodo de tiempo relativamente corto si lo comparamos con el que se necesita en los ensayos de digestibilidad. Las posibilidades de un forraje nuevo, sobre todo cuando el material del que disponemos es limitado, son obvias. Los índices de correlación entre la digestión in vitro de la celulosa o de la materia seca y la digestión in vivo de la materia seca son de 0.9 o incluso más altos, permitiendo así una estimación bastante buena sobre la digestibilidad del forraje ensayado (38).

III.6. Aspectos Botánicos de *Acacia bilimekii*.

Miranda y Hernández incluyen al tehuistle (*Acacia bilimekii*) dentro del matorral espinoso con espinas laterales. La vegetación consiste en agrupaciones secundarias originadas por la tala o destrucción de diversos tipos de selva; sobre todo la selva baja caducifolia o selvas bajas espinosas. *Acacia bilimekii* se encuentra muy bien difundido en la cuenca del Balsas. Este tipo de vegetación encuentra aprovechamiento especial a través

de la ganadería caprina ampliamente desarrollada en Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Oaxaca (12).

La clasificación botánica de esta leguminosa fué elaborada por Macbride en el año de 1919, en donde en forma general se menciona que *Acacia bilimekii* es un árbol o arbusto de hasta 6m de alto, que tiene su habitat en la selva baja caducifolia , en palmares , en suelos calizos, o bien en lugares entre los 1500 y 2500 metros sobre el nivel del mar, florece de septiembre a marzo, fructifica de febrero a junio. La distribución de esta leguminosa en la República Mexicana comprende los Estados de México, Morelos; Guerrero, Puebla y Oaxaca. Otros nombres con los que se conoce a *Acacia bilimekii* son: Tehuistle y Espino.

III.7. Usos de *Acacia bilimekii*.

Medicinal.- La cáscara se utiliza para lavar heridas (evitando así infecciones).

Curtiduría.- La cáscara (por sus taninos).

Construcción.- Se utilizan el tronco y las ramas.

Combustible.- El tronco y las ramas.

Forrajero.- La vaina es su estadio inmaduro se utiliza para la alimentación de las cabras.

Capitulo IV

PARTE EXPERIMENTAL

La leguminosa silvestre estudiada pertenece al género *Acacia* (*Acacia bilimekii*), la cual es originaria del estado de Puebla. Fue recolectada y clasificada en el año de 1996 por el Biólogo José Luis Contreras Jimenez, Investigador del Herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (HUAP).

PREPARACION DE LA MUESTRA

- 1.-Se separó la vaina de la semilla del fruto.
- 2.-La semilla y la vaina de *Acacia bilimekii* se sometieron a una molienda por separado en un molino Thomas Wiley mod. 4, con malla de 1 mm de diámetro.
- 3.-Las muestra molidas se guardaron en frascos de vidrio y se utilizaron para los análisis de nutrimentos y componentes tóxicos.
- 4.-El estudio incluyó el análisis químico proximal de la vaina y la semilla por separado siguiendo las técnicas descritas en el AOAC, así como las determinaciones de proteína verdadera, aminoácidos (incluyendo triptófano), tóxicos naturales, digestibilidad "in vitro", digestibilidad ruminal "in vitro" .

Análisis proximal (39):

Humedad
Cenizas
Proteína cruda
Grasa cruda
Fibra cruda

Hidratos de carbono calculados por diferencia.

Determinación de proteína verdadera(40,41)

Determinación de aminoácidos(42)

Determinación de triptofano(43,44)

Análisis de componentes antinutricionales y tóxicos:

Inhibidores de tripsina(45)

Hemaglutininas (lectinas) (46,47)

Saponinas(48)

Glucósidos cianogénicos (49)

Alcaloides(50)

Digestibilidad proteínica "in vitro" (51)

Digestibilidad "in vitro" con líquido ruminal (52)

DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA

Fundamento: La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico; así, como de la proteína soluble con la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio. Esto con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por microKjeldhal.

Material y Reactivos.

*Digestor TECATOR Mod. AB 20/40

*Destilador KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER

*Tubos para digestión de 75 ml TECATOR

*Agitador magnético marca CORNING Mod 10.

*Papel WHATMAN # 4

*Mezcla digestiva (1)

*Peróxido de hidrógeno al 30% R.A.

*Solución precipitante (2)

*Hidróxido de sodio al 40% R.A.

*Sulfato de potasio R.A.

*Acido bórico al 1% con indicadores (3)

*Acido clorhídrico valorado 0.01N

Preparación:

1. Se mezclan durante 30 minutos los siguientes reactivos. 3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con 300 ml de H_2SO_4 Y 100 ml de H_3PO_4 .
2. Solución 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 agua, añadir 22 ml de HCl 2N, mezclar y aforar a 50 ml con agua destilada.
3. Acido bórico al 1% con indicadores: Pesar 10 g de ácido bórico y disolverlos en agua destilada, adicionar 10 ml de verde de bromocresol (100 mg disueltos y aforados a 100 ml con metanol) y 7 ml de rojo de metilo (100 mg disueltos y aforados a 100 ml con metanol), llevar a un volumen final de 1000 ml con agua destilada. Se ajusta el ácido bórico a un color café rojizo.

Procedimiento:

1. Pesar de 50 - 100 mg de muestra finamente molida en un vaso de precipitados de 50 ml, agregar 5 ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos. Agregar 2 ml de solución precipitante y dejar en reposo por 5 minutos. Transferir cuantitativamente para su filtración en papel whatman No 4, utilizando 25 ml de agua destilada caliente y ligera succión.
2. Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión. Agregar 0.5 g de K_2SO_4 , 5 ml de la mezcla digestiva y colocar en el digestor (previamente calentado a

370°C) por 15 minutos. Después de ese tiempo, retirar, dejar enfriar y añadir 3 ml de H₂O₂ AL 30% e introducir nuevamente al digestor. Calentar hasta que la digestión sea completa (aproximadamente 30 minutos).

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

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

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

Donde:

P = ml de HCl 0.01 N usados para titular la muestra.

B = ml de HCl 0.01 N gastados para titular el blanco.

N = Normalidad de la solución de HCl.

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

F = Factor de conversión (6.25).

DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Fundamento: Se basa en la realización de una hidrólisis ácida (HCl 6 N a 145° C) de la proteína de la muestra para romper los enlaces peptídicos logrando así la liberación de los aminoácidos, después mediante un autoanalizador de aminoácidos se logra la separación y la cuantificación de los mismos. El autoanalizador basa su funcionamiento en una cromatografía de intercambio iónico en donde se separan los aminoácidos, posterior a la separación ocurre una reacción con ninhidrina formando un compuesto colorido que permite la determinación colorimétrica de cada aminoácido presente en la muestra.

Material y Reactivos:

- *Autoanalizador de aminoácidos TECHNICON Mod. NC-2P
- *Rotavapor BÜCHI Mod R
- *Potenciómetro CORNING Mod. 10
- *Digestor TECATOR Mod. AB-20/40
- *Vortex LABLINE Mod. Super-Mixer No. 1290
- *Adaptador para filtración con jeringa MILLIPORE XX30-012-00
- *Membrana MILLIPORE tipo HAFT 025 00 (tamaño de poro 0.45µM)
- *Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta interior de teflón marca PYREX No 9826.
- *Microjeringa HAMILTON Mod. 1001-LTN.
- *Acido clorhidrico 6N
- *Metilcelosolve al 50%
- *Amortiguador de Acetato d sodio 0.4 N (a)
- *Sulfato de hidrazina (b)
- *Ninhidrina (c)

*Solución lavadora (d)

*Amortiguador de dilución (e)

*Amortiguadores de Acetato para regeneración y elución (f)

*Hidróxido de sodio 0.1 N

Preparación:

a) Amortiguador de acetato de sodio 4 N: Colocar aproximadamente 3 litros de agua destilada en un dispositivo de agitación, agregar lentamente 1.312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, de ser necesario puede calentarse para la completa solubilización de la sal. Una vez fría la solución se le agregan 400 ml de ácido acético glacial lentamente y se deja enfriar. Aforar a 4 litros.

NOTA 1: El pH de este amortiguador debe ser de 5.51 ± 0.02 , si se requiere ajustar se debe usar álcali o ácido concentrado.

b) Sulfato de hidrazina: Disolver 1.049 g de sulfato de hidrazina en agua destilada desionizada, a continuación agregar 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20 %, se lleva esta solución a un volumen de 4 litros. Para su conservación se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico.

c) Ninhidrina: Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metil-celolve, a continuación adicionar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4 N, por último se lleva a un volumen final de 4 litros.

NOTA 2: Tener cuidado de no tener contacto directo con la ninhidrina.

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

- e) Amortiguador de dilución: se prepara una solución de ácido clorhídrico 0.2N (A) y una solución de cloruro de sodio 0.2 N (11.69 g/l) (B). Se toman 50 ml de A y 33.3 ml de B, se lleva a 200 ml con agua destilada, adicionando hidroquinona al 0.01%. El pH del amortiguador debe ser de 1.50 ± 0.05 .
- f) Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución: La preparación se presenta a continuación y en la tabla 1 se muestra los reactivos y las cantidades de los mismos.

Forma de preparar las soluciones amortiguadoras.

- 1.- En un recipiente con agitación se pone la mitad del volumen de agua y se disuelven todos los sólidos.
- 2.- Adicionar los reactivos líquidos o las soluciones correspondientes a excepción del ácido caprílico, el cual se adiciona hasta después de ajustar el pH.
- 3.- Agregar agua hasta un volumen aproximado de 900 ml, de tal manera que se tenga un margen para poder ajustar el pH
- 4.- Ajustar el pH con ayuda de un potenciómetro en escala expandida el cual se calibró previamente con buffer de referencia pH = 4.00. Aforar en un matraz volumétrico de 1 litro con ayuda del ácido caprílico para romper la espuma.
- 5.- Filtrar con papel filtro y vacío para eliminar cualquier partícula extraña, ya que estas soluciones pasarán por la resina de intercambio iónico.
- 6.- El amortiguador ajustado y aforado se vacía en un recipiente que contenga la cantidad especificada de ácido caprílico en la tabla 1.

BUFFER 1	Regeneración de la resina
BUFFER 2	Elución de aminoácidos ácidos y neutros.
BUFFER 3	Elución de aminoácidos básicos.
NaOH 0.2 N	Lavado de la resina.

Procedimiento:

HIDRÓLISIS Y PREPARACION DEL HIDROLIZADO

1.-Pesar dentro de un tubo de hidrólisis la cantidad de muestra (A) finamente molida y desengrasada (cuando el contenido de grasa sea mayor al 5 %). Adicionar con cuidado la cantidad de ácido clorhídrico 6 N (B), resbalandolo por las paredes tratando de que toda la muestra se humedezca con el reactivo; de ser necesario para lo anterior se puede ayudar de un agitador mecánico (Vortex).

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

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

Donde:

A = Cantidad de muestra en gramos

B = ml de ácido (HCl 6N)

%P = Porcentaje de proteína en la muestra

2.-Una vez pesada la muestra y agregado el ácido, se le insufla nitrógeno durante 30 segundos aproximadamente , cerrar el tubo con un tapón de rosca.

3.- Colocar el tubo en el digestor a una temperatura de $145^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 4 horas. El digestor se calienta previamente.

TABLA 1

Preparación de los amortiguadores

REACTIVO	BUFFER 1	BUFFER 2	BUFFER3	NaOH 2N
Acetato de sodio anhidro	4.1g	5.0g	87.0g	---
Acido acético glacial	20.0	15.0 ml	20.0 ml	---
Solución de acetato de zinc 0.5 M	---	0.6 ml	2.0 ml	---
Alcohol etílico absoluto	78.0 ml	78.0 ml	---	---
Alcohol benzílico	---	---	11.0 ml	---
Hidroquinona (antioxidante)	0.11 g	0.11 g	---	---
Solución BRIJ-35 al 20% (MERK # 1962)	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	---
EDTA (Sal disódica)	0.1 g	---	---	---
Hidróxido de sodio (lentejas)	---	---	---	8.0 g
Acido caprílico (conservador)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	---
Agua desionizada (<1 ppm Na ⁺)	1.01	1.01	1.01	1.01
Ajuste de pH (escala expandida)	4.0 ±0.02	4.1 ±0.02	5.3 ±0.02	
[Na ⁺]	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.2M
[Zn ⁺⁺]	0.0M	0.0003M	0.001M	0.0 M

BUFFER 1 Regeneración y equilibrio de la resina

BUFFER 2 Elución de aminoácidos ácidos y neutros

BUFFER 3 Elución de aminoácidos básicos

NaOH 0.2 N Lavado de la resina

4.-Transcurridas las 4 horas dejar enfriar el tubo y agregar 5 ml de estandar interno de norleucina 5mM, homogenizar y transferir cuantitativamente a un matraz de bola de 100 ml, ejuagar el tubo con solución lavadora, incorporar este volumen al hidrolizado.

5.- Lavar nuevamente el tubo de hidrólisis con solución lavadora, resuspender el residuo y evaporar el disolvente en el rotavapor hasta sequedad.

6.- Resuspender el residuo con la solución lavadora, es importante que el volumen no sobrepase los 20 ml.

7.- Ajustar el pH del filtrado a 6.8 ± 0.2 con un potenciómetro de escala expandida. Si se forma precipitado, filtrar a través de papel filtro doble (Whatman # 52) con ayuda vacío. Lavar el residuo con agua desionizada y aforar a 25 ml con agua desionizada. En caso de que la muestra no vaya a ser empleada en ese momento, se le insufla nitrógeno y se guarda en congelador.

INYECCION DEL HIDROLIZADO

1.- Diluir el hidrolizado tomando 1 ml del mismo y 1 ml del amortiguador de dilución (pH = 1.5), con esto los aminoácidos pasan a su forma catiónica.

2.- Tomar el hidrolizado diluido con una jeringa de 5 ml y filtrar a través del dispositivo millipore descartando las primeras 5 gotas.

3.- Con una microjeringa se inyectan de 100 a 200 μ del hidrolizado en la columna de intercambio iónico del autoanalizador de aminoácidos.

SEPARACION Y CUANTIFICACION

Una vez que el hidrolizado ha sido inyectado en la columna catiónica la separación de los aminoácidos ocurre en una forma secuencial pues el aparato bombea los amortiguadores de diferente pH a través de la columna llevándose a cabo la elución de los aminoácidos. Los aminoácidos ya separados reaccionan con

ninhidrina, pasan por un baño de aceite a 89°C y desarrollan color, el cual es detectado en un colorímetro que está conectado a un registrador que grafica el área correspondiente a cada aminoácido.

Antes de llevar a cabo el análisis de aminoácidos de las muestras debe correrse un estandar de aminoácidos de concentración conocida ya que sobre éste se basarán los cálculos. A continuación se muestran las condiciones físicas y el programa utilizado para el análisis realizado.

Condiciones físicas.

Tamaño de la columna	470 X 4 mm
Apertura del empaque de la columna	420 mm ± 5
Temperatura de la columna	60°C
Velocidad de flujo de los amortiguadores	0.6 ml/min
Velocidad de flujo del nitrógeno	0.32ml/min
Temperatura del baño de reacción	89°C ± 0.5
Sensibilidad del registrador	2.5U
Velocidad de la carta	3.0 mm/min

Programa

PASO	TIEMPO	CHARACTERIZACIÓN
1	2	Amortiguador # 1, metil-celolve
2	6	Amortiguador # 2, metil-celolve
3	110	Amortiguador # 2, ninhidrina, registrador
5	120	Amortiguador # 3, ninhidrina, registrador
6	2	NaOH 0.2N, metil-celolve, registrador
7	6	Amortiguador # 1, metil-celolve, registrador
8	10	Amortiguador # 1, metil-celolve, apaga registrador
9	16	NaOH 0.2N, metil-celolve
10	46	Amortiguador # 1, metil-celolve

NOTA: En todos los pasos hay flujo de sulfato de hidrazina.

Donde:

Aaa = Area del aminoácido en el aminograma de la muestra

Baa = Base a la mitad del pico

Haa = Altura del pico desde la línea base

Enaa = Equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente en el estandar

μ Mstd = Micromoles del aminoácido en el estandar

PMaa = Peso molecular del aminoácido

A = Aforo (ml)

ANm = Area de norleucina en el aminograma de la muestra

a = Alicuota inyectada en ml

mgNm = miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

DETERMINACION DE TRIPTOFANO.

Fundamento: Debido a que la hidrólisis ácida (que se usa comunmente para la determinación de la mayoría de los aminoácidos de una proteína), destruye completamente al triptofano; se realizará una hidrólisis alcalina (con LiOH 4N a 145°C) de la proteína y una vez liberado el triptofano se someterá a reaccionar con el reactivo de Ehrlich (p-dimetil-aminobenzaldehido en medio ácido) que nos producirá un derivado colorido, proporcional al contenido de este aminoácido.

Material y Reactivos:

*Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta interior de teflón

PYREX No 9826

*Digestor marca TECATOR mod AB-20/40

*Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340

*Potenciómetro CORNING mod. 10

*Hidróxido de litio 4N

*Solución lavadora agua-etanol (3:1)

*Acido orto-fosfórico concentrado

*Solución estandar de triptofano (50µg / ml)

*Acido clorhídrico concentrado

*Solución de p-dimetil-aminobenzaldehido al 0.5% en ácido clorhídrico concentrado

*Nitrito de sodio al 0.2%

Procedimiento:

En un tubo de pared gruesa y tapón de rosca se coloca la cantidad de muestra de acuerdo al contenido de proteína.

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

A continuación se le adiciona con mucho cuidado la cantidad de álcali necesaria, teniendo la precaución de no salpicar la muestra en la pared del tubo.

$$\text{ml de álcali} = \frac{400}{\% \text{ Proteína}}$$

Una vez que se tiene la cantidad de muestra y álcali adecuado se le insufla nitrógeno durante 30 segundos aproximadamente, se cierra el tubo perfectamente y se coloca en el digestor que debe estar en 145°C. El tiempo de hidrólisis va de 4 a 8 horas, dependiendo del contenido de proteína de la muestra.

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

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo, ya frío se transvasa el contenido del tubo a un vaso de precipitados, lavando el tubo con solución lavadora (aproximadamente 20 ml). Se neutraliza el hidrolizado con ácido ortofosfórico y se filtra sobre papel de filtración rápida en un buchner con ayuda de vacío, lavando el residuo con solución lavadora caliente, al hidrolizado ya filtrado se le checa el pH (pH = 7) se afora a 50 ml.

Se toman 3 alícuotas de 2 ml cada una del hidrolizado (uno de los tubos nos servirá como blanco), adicionara uno de los tubos 7.5 ml de ácido clorhídrico concentrado, mientras que a los otro dos se les adiciona 7.5 ml de p-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido, se agitan y se dejan en reposo 15 minutos en la oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo se les adiciona 0.5 ml de nitrito de sodio, se agita nuevamente se deja en la oscuridad por 15 minutos para que desarrolle la coloración; por último se lee en el espectrofotómetro a 590 nm, usando el tubo del blanco para ajustar a cero el espectrofotómetro.

Se corre al mismo tiempo una curva estandar de triptofano de 0 a 100 µg, tomando alícuotas de 0.0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.6, 2.0 ml de la solución estandar de triptofano y llevando a 2 ml con agua destilada.

Cálculos:

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

Donde:

t = μg de triptofano, obtenido por interpolación

A = Aforo

a = Alicuota

m = mg de muestra

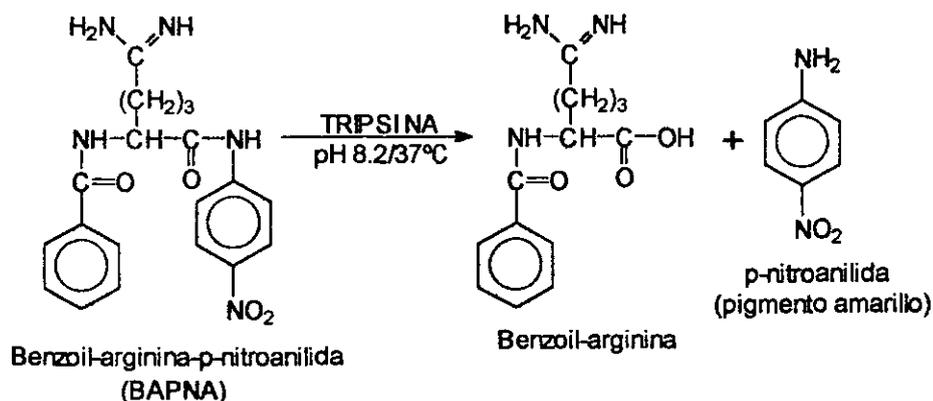
% = por ciento de proteína en la muestra

COMPONENTES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS

INHIBIDORES DE TRIPSINA.

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

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Material y Reactivos:

- *Potenciómetro CORNING Mod. 10
- * Parrilla con agitación magnética THERMOLYNE Mod. SP-13025
- * Baño maría GRANT Mod. SE10
- * Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER Mod.340
- * Mezclador de tubos LAB-LINE Mod. SUPER-MIXER
- * NaOH 0.01N
- * Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 y 0.05M (a)
- * Solución BAPNA (b)
- * Acido acético al 30%
- * Solución estandar de tripsina (c)
- * HCl 0.001N

Preparación:

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

b. Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): disolver 100 mg de BAPNA en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido, la disolución es más rápida si se calienta en baño de agua a 37 °C, se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado a 37 °C. Esta solución se prepara el mismo día de su uso y se mantiene a 37 °C.

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

Procedimiento:

PREPARACION DEL EXTRACTO:

1. Pesar 1 gramo de muestra (finamente molida y desengrasada cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) en un vaso de precipitado; adicionar 45 ml de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a 9.6 ± 0.2 y aforar a 50 ml con NaOH 0.01N.
2. Transferir a un vaso de precipitados y agitar mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 horas y media a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo retirar el magneto y dejar reposar el extracto durante media hora.
3. Decantar el sobrenadante y eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60%, esto ayuda a reducir la desviación estandar.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD:

1. Preparar 10 tubos de ensayo como se muestra en el cuadro 1. Agregar la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0 ml con agua destilada.
2. Adicionar a todos los tubos 2 ml de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vortex. A los blancos se les adiciona además 1 ml de ácido acético para detener la reacción.
3. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar incubar durante 10 min para que entren en contacto inhibitor y enzima.
4. Adicionar a cada tubo 5 ml de solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar los tubos en el baño de agua para incubarlos durante 10 min. Debe controlarse estrictamente el tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA para lo cual puede emplearse un cronómetro.
5. Detener la reacción enzimática añadiendo 1 ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.
6. Es frecuente la formación de precipitado o el enturbiamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min y después se filtra primero el sobrenadante y posteriormente la porción residual a través de papel Whatman # 1. El filtrado deberá estar translúcido.

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

TABLA 2

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

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

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

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

Cálculos:

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de los inhibidores de

Tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.). La lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

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

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

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

Donde:

R = U.T. de la referencia

A3 = U.T. del tubo 3

m = peso de la muestra en gramos

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

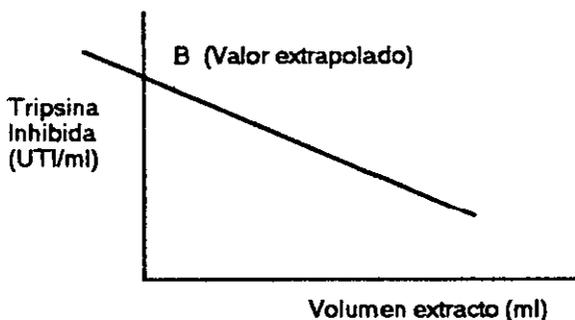
$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.

Gráfica U.T.I / ml vs. ml de extracto



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

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

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

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

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

Donde:

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

F = Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilucion(es) realizada(s). Cuando se tiene el extracto directo F=1.

HEMAGLUTININAS

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Fundamento: La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza protéica hacia los eritrocitos. Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de microdiluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual con un dispositivo específico, para ello se requiere que los eritrocitos sean sensibilizados mediante una proteasa. En el presente estudio se llevó a cabo la determinación semicuantitativa de hemaglutininas con eritrocitos de hamster.

Material y Reactivos:

- * Agitador magnético con tacómetro THERMOLYNE
- * Centrifuga DYNAC
- * Tubos de centrifuga de 15 ml graduados PYREX
- * Incubadora BLUE-M
- * Espectrofotómetro COLEMAN Mod Junior IIA
- * Adaptador para celdas de 10 x 75 mm con abertura de 1 cm²
- * Filtro de vidrio de poro grueso
- * Microdilutor de 50 ml MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- * Pipeteador de gota de 50 ml DYNATECH
- * Placas para aglutinación tipo V

- * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
- * Sangre de hamster sensibilizada
- * Sangre de vaca sensibilizada
- * Solución salina al 1%
- * Solución salina al 0.9%
- * Solución anticoagulante (a)
- * Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b)
- * Tripsina de pancreas porcino SIGMA T-8128
- * Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005

Preparación:

a. Cuando la sangre se use de inmediato, se puede usar como anticoagulantes la heparina o citrato en las siguientes concentraciones:

15-20 UI de heparina por mililitro de sangre

0.1 ml de solución de citrato por ml de sangre

Si la sangre no se va a usar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es emplear la solución ALSEVER como anticoagulante en proporción 1:1. Esta solución es muy recomendable para mantener la sangre de hamster.

b. En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se emplea sangre de cualquier roedor (hamster, ratón, rata, etc.) se recomienda sensibilizar con pronasa al 0.2% en solución salina.

Procedimiento:

PREPARACION DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA:

1. Suspender 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (cuando sea necesario) en 10 ml de solución salina al 1%.
2. Extraer por agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el extracto a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
4. Filtrar el sobrenadante a través del filtro de vidrio de poro grueso, si es necesario se lava el residuo con solución salina al 1%.
5. Aforar el filtrado a 10 ml con solución salina al 1%.

PREPARACION DE LA SANGRE:

1. Una vez sangrado el animal, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga la solución anticoagulante, homogenizar suavemente.
2. Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga; lavar y centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos, 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es 1:5 aproximadamente. Si la sangre no está muy hemolizada es suficiente realizar dos lavados (el sobrenadante debe ser incoloro).
3. Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos y diluirlos al 4%, para lo cual se deben agregar 24 ml de solución salina al 0.9% por cada 1.0 ml de globulos rojos.

SENSIBILIZACION DE LOS GLOBULOS ROJOS:

1. Por cada 10 ml de suspensión de globulos rojos al 4% agregar 1 ml de solución de proteasa (para sangre de hamster se emplea pronasa al 0.2% y para sangre de vaca se emplea tripsina al 0.1%) y colocarlos en la incubadora a 37 °C durante 1 hora.
2. Transcurrido el tiempo de sensibilización centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos. Es importante realizar los tres lavados para eliminar completamente la enzima.
3. Después del último lavado resuspender el paquete de eritrocitos; por cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos sensibilizados se agregan 19 ml de solución salina al 0.9% (la suspensión queda al 5%). Cuando se observa que la sangre tiene algunos coagulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

AJUSTE DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS:

1. Tomar 1 ml de la suspensión de globulos rojos sensibilizados y agregar 4 ml de solución salina al 0.9%, homogenizar suavemente. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm; se ajusta a 100% de transmitancia usando solución salina al 0.9% como blanco.
2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de 25%±1 de transmitancia. Al final la suspensión debe quedar al 4% y dar dicha lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50 ml de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter, evitando tocar las paredes de los pozos.
2. Con un microdilutor tomar 50, ml del extracto de la muestra, se introduce en el pozo sin tocar las paredes y se gira, se saca del pozo y se introduce en el pozo siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto. Se recomienda checar que el volumen que toma el microdilutor sea el adecuado para lo cual se emplea una placa de prueba.
3. Con el pipeteador de gota se adicionan 50 μ l (una gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, se rota la placa en forma circular y se incuba a 37°C durante 1 hora.

LECTURA

Transcurrido el tiempo, colocar la placa en el dispositivo de lectura teniendo cuidado de no agitar la placa. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se considera positivo aquel pozo que presente una difusión de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación) y negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritrocitos en el centro. Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

SAPONINAS

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Fundamento: La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre eritrocitos de conejo. Se emplea un método de microtitulación (como en la determinación de hemaglutininas) en el cual

se pone en contacto un extracto metanólico de la muestra, resuspendido en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados.

MATERIAL Y REACTIVOS

- * Equipo para extracción de grasas Goldfisch LABCONCO
 - * Vasos de borde esmerilado KIMAX
 - * Rotavapor BÜCHI Mod R
 - * Incubadora BLUE-M
 - * Centrífuga DYNATECH
 - * Tubos para centrífuga de 15 ml graduados PYREX
 - * Placas para hemólisis tipo U
 - * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
 - * Microdilutores de 50 ml MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
 - * Pipeteadores de gota de 50 ml DYNATECH
 - * Eter de petróleo R.A.
 - * Mezcla metanol-agua 85:15
 - * Solución salina al 0.9%
 - * Eritrocitos de conejo sensibilizados (a)
 - * Pronasa al 0.2% (Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005) en solución salina al 0.9%
 - * Solución estandar de saponinas (saponina de quillaja BDH y digitonina SIGMA)
- (b)

- * Placas para hemólisis tipo U
 - * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
 - * Microdilutores de 50 ml MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
 - * Pipeteadores de gota de 50 ml DYNATECH
 - * Eter de petróleo R.A.
 - * Mezcla metanol-agua 85:15
 - * Solución salina al 0.9%
 - * Eritrocitos de conejo sensibilizados (a)
 - * Pronasa al 0.2% (Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005) en solución salina al 0.9%
 - * Solución estandar de saponinas (saponina de quillaja BDH y digitonina SIGMA)
- (b)

Preparación:

a. La preparación de la sangre de conejo se lleva a cabo de la misma forma que en la determinación de hemaglutininas, empleando pronasa al 0.2% para la sensibilización de los eritrocitos.

b. Solución estandar de saponinas: preparar una solución de saponinas al 0.5% en solución salina 0.9% empleando una mezcla 1:1 de saponina de quillaja y digitonina.

Procedimiento:

PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Pesar 7.5 g de muestra en un cartucho de celulosa. Colocar el cartucho en el extractor de grasas Goldfish y desengrasar con éter de petróleo (igual que en la determinación de grasa cruda).

EXTRACCION DE SAPONINAS

1. Sobre la muestra desengrasada y empleando el mismo extractor Goldfish, se lleva a cabo una extracción con 50ml de mezcla metanol-agua 85:15 durante 2 horas y colocando el control de temperatura al máximo. Debe emplearse un vaso de borde esmerilado limpio.
2. El extracto metanólico se transfiere del vaso a un matraz bola de 100 ml y se concentra con el rotavapor hasta sequedad. Es importante eliminar todo el metanol.
3. Resuspender el residuo del matraz bola con solución salina al 0.9%. Filtrar a través de papel Whatman No. 4 y aforar el filtrado a 100 ml con solución salina al 0.9%.

PREPARACION DE LAS PLACAS

Las placas tipo U se preparan de la misma manera como se preparan las placas para la determinación de hemaglutininas. En cada placa se aplica en una hilera del estándar de saponinas como control positivo, de la misma forma como se aplica el extracto de las muestras; y se siguen los mismos pasos hasta la incubación a 37°C durante 1 hora.

LECTURA

Transcurrido el tiempo de incubación se colocan las placas en el dispositivo para lectura, se consideran positivos aquellos pozos que se observen translúcidos (hemólisis) y negativos aquellos pozos donde se presente sedimentación de eritrocitos en el centro del pozo.

CALCULOS

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

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

$$\text{Mg de muestra} = \frac{\text{concentración del extracto.}}{2}$$

2

donde:

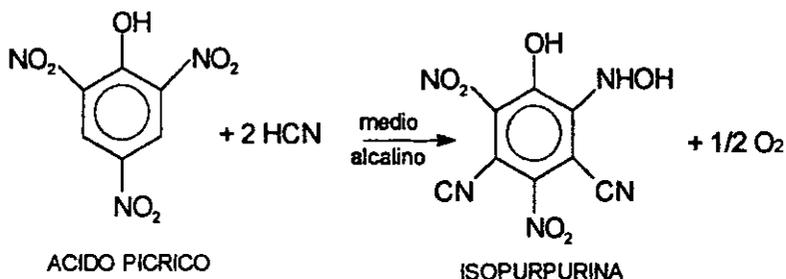
t = título de hemólisis.

Se reportan unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H. / mg de muestra)

. Por definición un microgramo del estándar de saponinas es equivalente a 10 unidades hemolíticas.

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS

Fundamento: El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una b-glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico, el HCN liberado reacciona con el ácido pícrico formando la isopurpina de color café rojizo, el color es directamente proporcional al contenido de HCN que a su vez proviene de los glucósidos cianogénicos presentes en la muestra. Con el método anterior, se pueden detectar hasta cantidades del orden de 5 microgramos de HCN que equivalen a 46 microgramos de glucósido cianogénico (referido a linamarina).



MATERIAL Y REACTIVOS

- * Baño de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENTS
- * Incubadora BLUE-M
- * Congelador comercial
- * Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod 340
- * Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX No. 9826
- * Solución de b-glucosidasa SIGMA G-8625 con activador (a)
- * Solución de picrato de sodio alcalinizada (b)
- * Papel indicador de HCN (c)
- * Solución estandar de HCN equivalente a 100 mg de HCN/ml (24.1mgKCN/100 ml)
- * HCl 0.5N
- * Amortiguador de fosfatos pH=7.0 (d)
- * Fécula de maíz comercial.

Preparación:

a. Solución de β -glucosidasa con activador: pesar 0.25 g de β -glucosidasa y disolverlos en buffer de fosfatos pH=7.0, agitando con cuidado para evitar la formación de espuma. Una vez disuelta la enzima se agregan 1.7 g de NaNO_3 que

actúa como activador de dicha enzima, aforar a 250 ml con buffer pH 7.0. La concentración final es de 1 mg de β -glucosidasa /ml y 0.08 M de NaNO_3 .

b. Solución de picrato de sodio alcalinizada: pesar 2.5 g de ácido pícrico y disolverlos en agua destilada, agregar 12.5 g de carbonato de sodio, agitar hasta su disolución, aforar a 500 ml con agua destilada.

c. Papel indicador de HCN: sumergir papel Whatman No. 2 en una solución de picrato de sodio alcalinizada (b), escurrir y secar en estufa a una temperatura de 55-60°C durante 30 minutos. Cuando esté seco, cortar tiras de 2x10 cm.

d. Amortiguador de fosfatos pH=7.0: se preparan dos soluciones como se indica a continuación:

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1 l)

B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de Na_2HPO_4

$7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1l)

Mezclar 39 ml de A y 61 ml de B y aforarlo a 200 ml. Finalmente se ajusta el pH a 7.0 empleando el potenciómetro.

Procedimiento:

LIBERACION DEL HCN DE LA MUESTRA

1. Pesar de 20 a 500 mg de muestra finamente molida en un tubo de cultivo Pyrex. Si no se tiene información sobre el contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra se pesan 500 mg. El ensayo se hace por duplicado.

2. Adicionar 5 ml de solución de β -glucosidasa (fría) procurando humedecer toda la muestra. Homogenizar.

3. Colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo sin tocar las paredes y cerrar hermeticamente con el tapón de rosca. (FIG. 1)

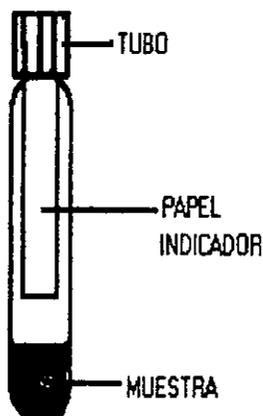


FIG.1

4. Colocar los tubos en el baño de agua que ya debe estar a una temperatura de 40 °C y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 rpm por espacio de 4 horas.
5. Transcurrido el tiempo, colocar los tubos en el congelador durante 30 minutos.
6. Sacar los tubos del congelador y destapar para adicionar 1 ml de HCl 0.5N (frío). Volver a tapar los tubos. Homogenizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador. Si se usan los tapones adecuados, la tira de papel quedará adherida al tapón y no se presentarán problemas de manipulación.
7. Colocar los tubos en la incubadora por espacio de 30 minutos a 60 °C. Transcurrido el tiempo sacarlos y en ese momento se puede realizar visualmente la

detección cualitativa. Aquellos tubos que presenten una coloración café-rojiza se consideran positivos y se procederá a realizar la detección cuantitativa

DETERMINACION CUANTITATIVA.

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

Cuando sea necesario se puede hacer otra adición de agua, para extraer por completo el pigmento.

La solución filtrada se lee en el espectrofotómetro a 520 nm, previamente ajustado a 100% de transmitancia con el blanco correspondiente (todos los reactivos excepto la muestra).

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

TABLA 3
TUBOS PARA LA CURVA ESTANDAR

ml de solución estandar	fécula de maíz (mg)	ml buffer pH 7.0	4 hrs → 40 °C →	HCl 0.5N (frío)
0.0	500	5.0		1.0
0.05	500	5.0		1.0
0.10	500	5.0		1.0
0.20	500	5.0		1.0
0.40	500	5.0		1.0
0.60	500	5.0		1.0

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

Cálculos

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

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

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

Donde:

X= mg de HCN

D=número de veces que se adicionaron 20 ml de agua (dilución)

m= mg de muestra

ALCALOIDES

DETERMINACION CUALITATIVA.

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

MATERIAL Y REACTIVOS

- * Rotavapor BÜCHI Mod R
- * Matraces bola de 100 ml PYREX
- * Papel filtro Whatman No 4
- * Parrilla de agitación CORNING Mod PC-351
- * Estufa de vacío LAB-LINE
- * Acido nítrico 30% o $d=1.180$
- * Acido sulfúrico 1%
- * Acido silicotungsténico ($4H_2O-SO_2-12WO_2-22H_2O$)
- * Metanol R.A.
- * Sulfato de sodio anhidro
- * Reactivo de Mayer (a)
- * Reactivo de Wagener (b)
- * Reactivo de Dragendorff (c)
- * Reactivo de Sonnenschein (d)
- * Reactivo de Hager (e)
- * Reactivo de Scheibler (f)

• Reactivo de Acido Silicotungsténico (g)

Preparación

a. Reactivo de Mayer: disolver 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua y aparte disolver 5.0 g de KI en 10 ml de agua. Reunir las dos soluciones y aforar a 100 ml con agua destilada

b. Reactivo de Wagner: disolver 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 ml de agua; aforar a 100 ml con agua destilada.

c. Reactivo de Dragendorff: disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de HNO_3 al 30% ($d=1.18$) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones y se deja reposar 24 horas. Decantar y aforar a 100 ml con agua destilada.

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

Aforar a 300 ml con agua destilada. Se obtiene una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

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

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

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

Procedimiento

1. Pesar de 2 a 4 g de muestra seca y molida, adicionar 40 ml de metanol, agitar y dejarla toda la noche.
2. Al día siguiente calentar durante 4 horas a 50 °C en baño de agua con agitación interrumpida.
3. Filtrar el extracto y lavar el residuo con 20 ml de metanol. Transferir el filtrado a un matraz bola de 100 ml y con ayuda del rotavapor evaporar el metanol hasta sequedad.
4. Resuspender el residuo con 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1%, agitar.
5. Repartir el residuo resuspendido en 7 porciones empleando una pipeta Pasteur y ensayar cada porción con cada uno de los reactivos de alcaloides, a continuación se presenta un cuadro de los reactivos y el precipitado característico que forman al ponerse en contacto con soluciones aciduladas que contienen alcaloides.

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

Debido a la frecuencia de reacciones falsas-positivas con los reactivos comunes de alcaloides, solo se considera como positiva la presencia de este tipo de compuestos, cuando cualquiera de las fracciones A y B den reacción positiva con los 7 reactivos referidos anteriormente. Hay que mencionar que el reactivo de Hager (ácido pícrico) debido a su baja sensibilidad, cuando da reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar, considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

DETERMINACION DE DIGESTIBILIDAD PROTEINICA "IN VITRO" .

Fundamento: La técnica está basada en la simulación de la digestión. Para ello se pone en contacto la muestra con pepsina en medio ácido y posteriormente con pancreatina, realizandose así una digestión enzimática semejante a la que es llevada a cabo en los monográstricos.

Material y Reactivos:

*Baño de agua con agitación y control térmico LAB- LINE INSTRUMENTS

*Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX

No 9826

*Digestor TECATOR Mod. AB-20/40

*Destilador KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER

*Tubos para digestión de 75 ml TECATOR

*Balanza analítica

*Pepsina al 0.3% en HCl 0.1 N

*Pancreatina al 4% en buffer de fosfatos pH = 8.0 ± 0.1

*Na OH 0.2N

*Papel WHATMAN No 542

*Mezcla digestiva (a)

*Sulfato de sodio R.A.

*Peróxido de Hidrógeno al 30%

*Hidróxido de sodio al 60%

*Acido bórico con indicadores (b)

*Acido clorhídrico 0.001N

*Buffer de fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 (c)

(a) y (b). Se preparan igual que para proteína cruda

(c). Se preparan dos soluciones.

A: Pesar 27.8 g de fosfato monobásico de sodio, disolver y aforar en un litro de agua destilada. La solución resultante es 0.2M.

B: Pesar 53.65 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado, disolver y aforar a un litro con agua destilada. La solución resultante es 0.2N.

Tomar 5.3 ml de A y 94.7 ml de B, llevar a 190 ml , ajustar el pH y aforar a 200 ml.

Procedimiento:

1. Pesar aproximadamente 0.750 g de proteína (máximo 2 g de muestra).
2. Agregar 20 ml de pepsina al 0.3 % en HCl 0.1 N. Dejar en agitación a 37°C por 3 horas.
3. Transcurridas las 3 horas, adicionar 10 ml de NaOH 0.2N para neutralizar.
4. Agregar 20 ml de pancreatina al 4% en buffer de fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 . Dejar con agitación a 37°C durante 24 horas.
5. Al día siguiente filtrar cuantitativamente a través de papel Whatman 542, utilizando 25 ml de agua destilada caliente y con ayuda de ligero vacío. Determinar las proteínas del residuo por el método del Kjeldahl (como se realizó para la determinación de proteína cruda, solamente que aquí es necesario agregar 9 ml de mezcla digestiva), de manera simultanea se corren los blancos (todos los reactivos excepto la muestra).

Cálculos:

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

Donde:

P.T. muestra = Proteína total de la muestra.

P.T. residuo = Proteína total del residuo.

DIGESTIBILIDAD RUMINAL "IN VITRO".

Fundamento: La técnica está basada en la simulación de la digestión de los rumiantes. Para ello se pone en contacto la muestra con líquido ruminal; de esta

forma se desarrolla una digestión bacteriana y posteriormente con pepsina ácida se realiza una digestión enzimática.

Material y Reactivos:

*Baño de agua con agitación y control térmico LAB- LINE INSTRUMENTS

*Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No 9826

*Balanza analítica

*Papel WHATMAN No 541

*Solución amortiguadora de McDungall (a)

*Solución de pepsina ácida (b)

*Solución amortiguadora, líquido ruminal (c)

*Solución de ácido clorhídrico 6N

*Solución de cloruro de magnesio al 4%

*Solución de ácido clorhídrico 3N

*Bióxido de carbono

-Líquido ruminal.(d)

(a). Para la solución amortiguadora se preparan dos soluciones.

Solución 1:Disolver 3.7g de fosfato dibásico de sodio y 9.8g de bicarbonato de sodio, aforar con agua desionizada a 1 litro

Solución 2: se pesan los siguientes reactivos en mencionadas proporciones:

Cloruro de sodio 4.7g

Cloruro de potasio 5.7g

Cloruro de calcio 0.4g

Cloruro de magnesio 0.6g

Se llevan a un volumen de 100 ml.

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

(b).0.2 g de pepsina se disuelven en 1 ml de ácido clorhídrico 6N, esta relación debe ser por tubo.

(c) Solución amortiguadora-líquido ruminal:se obtiene el líquido ruminal de una vaca fistulada, filtrando el líquido a través de una gasa (para retener el alimento que el líquido ruminal pudiera arrastrar consigo). Es importante mantener la temperatura del líquido ruminal (38°C) y ambiente anaerobio. Para tratar de conservar las condiciones del rumen, el líquido ruminal se puede transportar en un recipiente termo al cual se le insufla CO₂ para mantener condiciones anaerobias. Se ajusta el pH de la solución amortiguadora a 7 (cada tubo requiere de 5 ml de solución amortiguadora ajustada), se adiciona 1 ml de la solución de cloruro de magnesio al 4% por cada litro de solución amortiguadora a utilizar. Tomar 5 ml de esta solución ajustada y se mezclan con 15 ml de líquido ruminal (esta relación es por tubo). Introducir en un baño de agua a 38°C la solución amortiguadora-líquido ruminal se le burbujea CO₂ por espacio de 5-8 minutos.

Procedimiento:

1. Pesar 0.25g de muestra finamente molida en cada tubo (la determinación se hace por triplicado)
2. Adicionar a cada tubo 20 ml de la solución amortiguadora - liquido ruminal a 38°C, tapar los tubos con el tapón e introducirlos al baño de agua previamente calentado a una temperatura de 38°C.
3. Tapar el baño donde están los tubos para mantener las condiciones de oscuridad del rumen, accionar la agitación y dejarlos durante 48 horas.

4. Transcurrido este tiempo, sacar los tubos del baño, adicionarles 0.05 ml de ácido clorhídrico 3N, para detener la digestión bacteriana, enseguida adicionarle a cada tubo 1 ml de la solución de pepsina ácida , agitar suavemente los tubos para mezclar bien la pepsina, tapar e introducirlos al baño nuevamente, dejarlos durante 48 horas.

4. Al término de este tiempo sacar los tubos del baño y filtrar (con ayuda de vacío) su contenido sobre papel Whatman 541 previamente puesto a peso constante a 100°C , lavar el residuo con agua destilada y finalmente introducir el papel con el residuo en la estufa para la eliminación de la humedad a 100°C, hasta peso constante, de manera simultánea se corren blancos (todos los reactivos excepto la muestra).

Cálculos:

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

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

Donde

%Digestibilidad = % de digestibilidad de la muestra

M.S. = Gramos de muestra seca.

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

M.S.blanco = Peso del residuo seco del blanco en gramos

Capítulo V.

RESULTADOS Y DISCUSION:

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados del análisis químico proximal (en base húmeda y seca respectivamente) de vaina y semillas de *Acacia bilimekii*.

En la semilla el resultado más interesante fue el contenido de proteína cruda, ya que se observó un valor del 35.5% (en base seca) valor superior al presentado por la mayoría de las leguminosas, mismo que se encuentra alrededor del 20%. Así mismo los porcentajes de extracto etéreo (6.51%) y de fibra cruda (13.07%) obtenidos en la semilla fueron mayores a los reportados para otras especies de leguminosas.

Con respecto a los hidratos de carbono asimilables y cenizas, se obtuvieron valores similares a los encontrados en la literatura para las leguminosas (13, 17).

Los componentes mayoritarios de la vaina fueron la fibra cruda y los carbohidratos asimilables ya que en conjunto representan el 85.62% del peso en seco de la muestra, por lo que la vaina representa una fuente rica en este tipo de nutrimentos para rumiantes principalmente.

Tabla 4 : Análisis proximal de *Acacia bilimekii* g / 100 g de muestra. Datos en base húmeda.

DETERMINACION	SEMILLA	VAINA
HUMEDAD	9.74	9.64
CENIZAS	4.79	4.73
EXTRACTO ETÉREO	5.88	0.47
FIBRA CRUDA	11.80	47.41
PROTEÍNA CRUDA	32.04	7.80
HIDRATOS DE CARBONO ASIMILABLES*	35.75	29.75

*Hidratos de Carbono asimilables calculados por diferencia.

Tabla 5 : Análisis proximal de *Acacia bilimekii* g / 100 g de muestra. Datos en base seca

DETERMINACION	SEMILLA	VAINA
CENIZAS	5.31	5.23
EXTRACTO ETereo	6.51	0.52
FIBRA CRUDA	13.07	52.47
PROTEINA CRUDA	35.50	8.63
HIDRATOS DE CARBONO ASIMILABLES*	36.61	33.15

*Hidratos de carbono asimilables calculados por diferencia.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de proteína verdadera de la vaina y la semilla del tehuistle.

En esta determinación se comprueba que la semilla de *Acacia bilimekii* es una rica fuente de proteína, pero la cantidad del nitrógeno determinado por el método Kjeldahl no siempre corresponde al nitrógeno proteico, por lo que hizo interesante la cuantificación de los demás compuestos que aportan nitrógeno en esta determinación tales como los alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteínicos principalmente.

Es importante mencionar que durante la determinación de proteína verdadera, al poner en contacto la harina de la semilla con agua se liberaron sustancias aromáticas, esto posiblemente limite el uso del fruto maduro de forma directa, por lo que se hace necesario un tratamiento térmico para eliminar este factor no deseado.

Tabla 6 : Contenido de proteína cruda, proteína verdadera y nitrógeno no proteínico en las muestra de *Acacia bilimekii* (g / 100g de muestra).

Muestra : Semilla.

	Base húmeda	base seca
Proteína cruda (%)	32.04	35.50
Proteína verdadera(%)	24.69	27.35
Nitrógeno no proteico(%)	22.94	22.96

En la semilla encontramos que la diferencia entre el nitrógeno proteico y el no proteico se puede deber, a la escasa presencia de aminoácidos raros en la muestra como se verá mas adelante.

Muestra : Vaina.

	Base húmeda	Base seca
Proteína cruda (%)	7.80	8.63
Proteína verdadera (%)	5.91	6.54
Nitrógeno no proteico(%)	24.23	24.22

En la tabla 7 observamos el contenido de tóxicos y factores antinutricionales tanto en la vaina como en la semilla de *Acacia bilimekii*.

En la vaina las saponinas se presentaron en mayor proporción obteniéndose un valor de 256.84 U.H./mg de muestra, la semilla presentó un valor de 85.61 U.H./mg de muestra los cuales son valores altos si se comparan con los valores reportados para la haba (42.1U.H./mg de muestra) y alfalfa (21.3 U.H./mg de muestra) (53) . Este resultado concuerda con lo obtenido para las hemaglutininas en donde se observó hemólisis pero no aglutinación por lo que no podemos asegurar la presencia o no de hemaglutininas

Tabla 7 : Contenido de factores antinutricionales y tóxicos de *Acacia bilimekii*.

	Semilla	Vaina
Hemaglutininas. (Título)	No detectadas por este método	No detectadas por este método
Inhibidores de tripsina. (UTI / mg de muestra)*	13.31	No detectados
Saponinas. (U.H./mg de muestra)	85.61	256.84
Alcaloides	Negativa	Negativa
Glucósidos cianogénicos. (mg HCN/100g de muestra)	No detectados	No detectados.

*UTI = Unidades de tripsina inhibida.

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

Los inhibidores de tripsina se presentaron en mayor cantidad en la semilla y el valor obtenido es de 13.31 UHI/ mg de muestra, por lo que se hace necesario un tratamiento térmico ligero para disminuir la cantidad de este tipo compuestos, ya que los valores reportados para *Vicia faba*, (haba) que es de 42.70 UTI/mg de muestra (11). Los glucósidos cianogénicos no se detectaron por el método utilizado en este trabajo experimental.

En la tabla 8 se visualiza la composición aminoacídica de la semilla de *Acacia bilimekii* en donde se observó que la muestra tiene un contenido de isoleucina y leucina más bajo que el patrón de la F.A.O., con respecto a la cantidad de treonina vemos que la diferencia entre las cantidades reportadas de nuestra referencia con la muestra no es muy grande.

Las proteínas de *Acacia bilimekii* presentaron un contenido menor de aminoácidos aromáticos que la proteína de referencia, por lo que podemos decir que la

semilla no es rica en este tipo de compuestos pero tiene un score químico de más de 80 para este tipo de compuestos.

La cantidad de lisina que contiene la semilla de esta leguminosa tiene un score de 71.14, con esto podemos asegurar que la semilla del tehuistle se puede suplementar con cereales, pudiendose obtener de esto proteína de mejor calidad.

Los aminoácidos azufrados se presentaron en menor cantidad, principalmente la cisteína, la cual no fué detectada por método de intercambio iónico utilizado en este desarrollo experimental, la bibliografía reporta que las leguminosas en general son deficientes en este tipo de aminoácidos. Otro aminoácido que se presentó en baja cantidad en esta muestra es el triptófano, observandose un valor por debajo del esperado, ya que las leguminosas tienen cantidad considerable de este aminoácido, suficiente como para suplementar la deficiencia de los cereales.

En resumen podemos decir que la calidad de la proteína es buena si se suplementa con cereales, ya que es deficiente en aminoácidos azufrados y triptofano, pero tiene cantidades considerables de lisina y en los demás aminoácidos esenciales.

En el aminograma se observaron dos picos en el registro cuyos tiempos de retención no corresponden a ninguno de los aminoácidos conocidos por lo que se supone la existencia de aminoácidos no proteicos.

Tabla 8 : Contenido de aminoácidos dispensables e indispensables en semilla de *Acacia bilimekii* (g /16g de N).

	Semilla	Patrón F.A.O*	Score Químico
Acido aspártico	9.46		
Acido glutámico	12.90		
Serina	5.07		
Prolina	2.87		
Alanina + Glicina	5.72		
Histidina	2.58		
Arginina	12.99		
Isoleucina	2.66	4.0	66.50
Leucina	6.69	7.04	95.03
Lisina	3.87	5.44	71.14
Treonina	3.37	4.0	84.25
Triptofano	0.29	0.96	30.21
Valina	3.68	4.96	74.19
Metionina	0.95		
Total de Azufrados**	1.00	4.72	19.15
Fenilalanina	2.79		
Total de Aromáticos***	5.35	6.08	87.99

*Contenido de aminoácidos reportados para la proteína patrón de la FAO (54).

**Total de azufrados = Metionina + Cisteina.

***Total de aromáticos = Fenilalanina + Tirosina.

Como última determinación se realizó la prueba de digestibilidad "in vitro" con la finalidad de conocer que porcentaje de la proteína es digerible para los animales monogástricos, aunque de antemano se supuso que el porcentaje de digestibilidad sería bajo, dado al contenido tan alto de fibra. Con esto se confirmó que esta semilla no es recomendable para alimentación de animales monogástricos (ver tabla 9). La

digestibilidad utilizando líquido ruminal arrojó valores por encima de los reportados en la bibliografía , ya que los valores por arriba del 45% de digestibilidad, se considera buen forraje(48). Por lo que creemos que es factible la utilización de este fruto en forma íntegra para la alimentación animal, previa eliminación de los inhibidores de tripsina presentes en las semillas, ya que se vio en este estudio que son los compuestos que limitan la utilización directa del tehuistle.

Tabla 9 : Comparación de la Digestibilidad in vitro y la digestibilidad con líquido ruminal de la semilla del Tehuistle.

Muestra	"In vitro" (%)	Con líquido ruminal (%)
Vaina	19.29	45.92
Semilla	51.42	71.09

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

Capitulo VI

Conclusiones:

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis químico proximal podemos asegurar que la semilla del tehuistle representa una buena fuente de proteína. Esta proteína es deficiente en aminoácidos azufrados y presenta una cantidad considerable de aminoácidos aromáticos, pero el contenido de triptofano resultó bajo para ser una leguminosa, contiene también una cantidad importante de lisina, con lo cual la suplementación con cereales es factible para mejorar la calidad de la proteína.

En cuanto a factores tóxicos y factores antinutricionales en la semilla del tehuistle solamente se detectó inhibidores de tripsina en cantidad moderada, sustancia que limita la utilización directa de esta semilla en la alimentación animal por lo que se podría hacer necesario un tratamiento térmico para disminuir la concentración de estos compuestos.

Los buenos resultados obtenidos en la digestibilidad in vitro con líquido ruminal hace que esta semilla sea una fuente alternativa en la alimentación para rumiantes.

Capítulo VII:

BIBLIOGRAFIA:

- 1.-Rzedowski, J. (1988). La Vegetación de México. Noriega Editores. pp. 9-11, 202-252. México, D.F.
- 2.-Ayersa, R. (1989). Forrajeros y cultivos adecuados para la región chaoeña semiárida. Oficina Regional de la F.A.O. Para América Latina y el Caribe. pp 81-83. Santiago de Chile.
- 3.-Rappols, J. H. ; Russel. (1986). Antropogenic pressores at impact on marginal neotropical semiarids ecosystem. The case of south Texas. pp. 91-99.
- 4.-González, B. E. (1987). Evaluación de la calidad nutritiva de la *Acacia saligna* como recurso forrajero. Tesis. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlán. Estado de México.
- 5.-Rajaram, M. ; Janarddhanan, K. (1992). Nutritional and chemical evaluation of raw seed of *Canavalia gladiata* (jacq). D. C. and foder crops in India. Plant foods of human nutrition. 42: 329-336.
- 6.-Duke. (1981). Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press. PP. 311-315. New York.
- 7.-Hernández, P. R. ; Rivero, R.A. (1989). Plantas medicinales de los géneros *Acacia* y *Mimosa* utilizados en la medicina tradicional mexicana. Tesis. Facultad de Química. U.N.A.M. México, D.F.
- 8.-Ochoa, E. S. (1984). Uso potencial del ensilaje de huizache, (*Acacia farnesiana*, L. Willd), en la alimentación de la cabra. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. México, D.F.

- 9.-Smarrt, J. (1990). Grain legumes. Evolution and genetic resource. Cambridge. University Press. pp. 3-8. Cambridge.
- 10.-Instituto Nacional de la Nutrición. (1980). La alimentación en el medio rural de México; segunda encuesta nacional de alimentación. INN. Div. Publicaciones. México, D.F.
- 11.-International Legume Database and Information and Service. (ILDIS). & Chapman. (1994). Phytochemistry Dictionary of the Leguminosae. Vol 1 (Plants and Dairy Costituents). Chapman & Hall. pp. XX- XLV.
- 12.-Miranda, F. ; E., Hernández. (1963). Tipos de vegetación de México y su clasificación. Sociedad Botánica de México. No. 28: 45-66.
- 13.-Aykroyd, W. R. (1977). Las leguminosas en la alimentación humana. F.A.O.: Estudios sobre Nutrición # 19. pp 1-19, 70-96, 114-127. Roma.
- 14.-Gómez, L. F., Signoret, Poillon, J., Abuin, Moreiras, M. (1970). Mezquites y huizaches. Algunos aspectos de la economía, ecología, y taxonomía de algunos géneros de *Prosopis* y *Acacia* en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales. A.C. pp. 149-186. México, D.F.
- 15.-Daisy, E. Ray. (1979). Legumbres alimenticias. Edit. Acribia Zaragoza. pp. 9-15.
- 16.-Badui, S. (1981). Química de Alimentos. Alhambra. pp 41-44, 108-114, 364-367. México, D.F.
- 17.-Bowman, D. E. (1944). Fractions derived from soybeans and navy beans which retard the tryptic digestion of casein. Experimental Process for Biological Medical. 57: 139-140.
- 18.-Egan, Harold. (1993). Análisis químico de los alimentos de Pearson. Cía. Editorial Continental Mexicana. S.A. de C.V. pp- 13-19. México, D.F.

- 19.-Schottelius, B. A.(1975). Fisiología. Ed. Interamericana 17. Edición. pp 314, 488-492. México, D.F.
- 20.-Wiseman, J. and Cole, D. J. A. (1988). European legumes in diets for non ruminants. Recent advances in animal nutrition. Edited by Butterworthspp 13-37. London.
- 21.-Harper, A. E. (1973). Aminoacids of nutritional importance in toxicants occurring naturally in foods. Comite on foods protection. Ed. Nat. Academy of Science 2a. Edition. pp 130-152. Washington D.C.
- 22.-Liener, I. E. (1980). Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press. 2nd. Edition. pp. 23-102, 434-441. New York.
- 23.-Lindner, E. (1980). Toxicología de los alimentos. Acribia. pp. 1-39. Zaragoza.
- 24.-Jaffé, W. G. (1968). Factores tóxicos en leguminosas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 18, 205-218.
- 25.-Jaffé, W. G.(1973) Toxic proteins and peptides. in toxicants occurring naturally in Foods. Comite on food protection . National Academy of Science. 2a. Edition. pp 108-123. Washington D.C.
- 26.-Liner, I. E. (1975). Effects of antinutritionaland toxic factor on utilization of legume proteins. In protein nutritional quality of foods and feeds. Friedman, M. Ed. Marcer Dekker. Inc. Vol. 2. pp 523-550. New York..
- 27.-Jaffé, W. G. ; Brucker. (1972). Toxicidad y especificidad de las diferentes fitohemaglutininas de frijoles. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 22: 267-281.
- 28.-Fabre, R., and Truhant, R. (1976). Tratado de toxicología. Paraninfo S.A. Vol. 1. pp 48-60, 311-332. Madrid.

- 29.-Feeney, R. E., Means, G. E., and Bigler, J. C. (1969). Inhibition of human trypsin, plasmin and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 244. pp 1957-1960.
- 30.-Liener, I. E. (1953). Soyin a toxic protein from the soybean. Inhibition of rat growth. *Journal of Nutrition.* 18: 527.
- 31.-Haborme, B., Bouter, D., Turner, B. I. (1971). *Chemotaxonomy of the leguminosae.* Academic Press. pp 1-25. London.
- 32.-Conn, E. E. (1980). Cyanogenetic glycosides. in toxicants occurring naturally in foods. *Comite on food protection National Academy of Science.* 2a Ed. pp 299-308. Washington. D.C.
- 33.-Merk, R.(1976). *The Merk Index.* 9th . edition. pp 8120.
- 34.-George, A.J. (1965) *Legal status and toxicity of saponins . Food Cosmet. Toxicol.* 38: 85-91.
- 35.-Ishaaya, I.; Birk, y. (1965). Soybean Saponins IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. *Journal of. Food Science.* 30: 118-120.
- 36.-Dominguez, X. A. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica.* Ed. Limusa. México. pp 42-43, 211-228
- 37.- Pelletier, S. W. (1970). *Chemistry of the alkaloids.* Reinhold Book Corporation. New York. Pp 1-9.
- 38.-Church, D. C. (1974). *Fisiología Digestiva y Nutrición de Rumiantes.* Acribia. Zaragoza, España. Pp 1-8, 215-224, 227-248, 253-263, 266-277.
- 39.-Erich, K. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist...*, AOAC. 15th Edition Arlington, Vol I y II, 17-18, 40-62,69-83, 1012.

- 40.-Guerrero, J. A., Sigales, M. L. (1982). Determinación de proteína verdadera y aminoácidos raros en leguminosas. Tesis Facultad de Química. U.N.A.M. México. pp21-24
- 41.-Henry, R. J., D. C. and Winkelman, M. D. (1974). Clonical chemistry (principles and technics). Harper Rau publisher. New York. pp 389-404.
- 42.-Lucas, B. ; Sotelo, A. (1984). Aminoacid determination in pure protein, foods and feeds using two diferent acid hidrolisis methods. Anal. Biochem. 123: 349-356.
- 43.-Lucas, B., Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies temperature, and hydrolisis times on tryptophan determination of pure proteins and foods. Anal. Biochem. 109, 192-197.
- 44.-Rama Dao, M. V., Krishnan, C. K. (1974). Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. J. Food Science and Technology. 11, 213-216
- 45.-Kakade, M. L. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products Cereal. Chemistry, 51: 376-382.
- 46.-Jaffé, W. G. ; Level, A. González. (1974). Isolation and partial characterization of beans phytohemaglutinis. Phytochemistry. 13: 2685-2693.
- 47.-Lucas, B. ; Sotelo, A. (1984). A useful modification of the hemaglutination method for the screning of lectins in legume seeds. Recent Advances of Research in Antinutritional Factos in Legume Seeds. Wageningen Pers. EAAP Publication 70:71-74.
- 48.-Muñoz, Rivera, M. (1979). Determinación de saponinas taninos y acción antibiótica en algunas plantas silvestres. Tesis Facultad de Química. U.N.A.M. México D.F.
- 49.-Lucas, B. ; Sotelo, A. (1984). A Simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosydes in wild and cultivated seds. Nutr. Rep. Int. 29: 711-719.

- 50.-Abish, E.; Reichstein, T. (1960). Alkaloid screening (micromethod). *Helv. Chem. Acta* 43: 1844-1861.
- 51.-Akbson, W.B. ; Stathman, M (1964). A pepsin-pancreatin digestidex of protein quality. *Journal of Nutrition*. 83: 257-261.
- 52.-Tejada, de Hernández, Irma. (1992). Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. pp. 311-317.
- 53.- Girón, M.C. (1992). Determinación semicuantitativa de saponinas en alimentos en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis. Facultad de Química. U.N.A.M. pp. 92-93. México D.F.
- 54-Food Agricultural Organization/World Health Organization Energy and protein Requirements. (1973).Thechnical Report Series No. 552. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52. WHO, Genova , FAO Rome.