

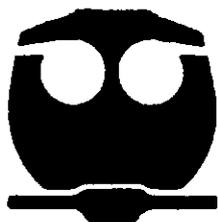


**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**EVALUACION BROMATOLOGICA Y TOXICOLOGICA  
DE LA FRACCION PROTEINICA DE LA SEMILLA DE  
CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*)**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ALFREDO MARTINEZ PALOMINO



MEXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. ANGELA SOTELO LOPEZ
Vocal	Prof. PEDRO VALLE VEGA
Secretario	Prof. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
1er. Suplente	Prof. LUCIA CORNEJO BARRERA
2do. Suplente	Prof. INES MIRANDA MARINEZ

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

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

Asesor: M. en C. Bernardo Lucas Florentino



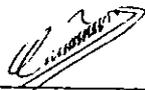
---

Supervisor técnico: Q.F.B. Leticia Gil Vieyra



---

Sustentante: Alfredo Martínez Palomino



---

## *Dedicatorias*

A mis padres, María Luisa  
Palomino y Porfirio Martínez por  
su amor y comprensión.  
**Saben que los amo.**

A mis hermanos, María Luisa y  
Humberto por su cariño y apoyo.  
**Los quiero mucho.**

A mis abuelos, Julián Martínez† y  
José Paz Palomino† por ser un  
ejemplo a seguir.  
**Los llevo siempre en mi corazón.**

A todos mis amigos, por los  
grandes momentos que pasamos  
juntos. **Soy afortunado por contar  
con su amistad.**

A mis asesores, Bernardo Lucas y  
Leticia Gil por la oportunidad de  
realizar este trabajo. **Mil gracias.**

A todas aquellas personas que he  
conocido en todo este tiempo,  
y que de alguna u otra forma han  
sido importantes en mi vida para  
llegar a éste momento.  
**No los defraudaré.**

# ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. ANTECEDENTES	4
1. Las semillas de leguminosas	4
2. El cacahuanano	10
3. Estudios de toxicidad	15
4. Las proteínas	19
5. Obtención de concentrados de proteína	26
IV. METODOLOGÍA	29
1. Diagrama general de investigación	29
2. Material y métodos	30
2.1 Limpieza y selección de la semilla	30
2.2 Determinación de parámetros físicos	30
2.3 Caracterización bromatológica de la semilla	31
2.4 Desengrasado de la semilla	34
2.5 Caracterización bromatológica de los preparados	34
2.6 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales	42
2.7 Destoxificación del material	56
2.8 Obtención del concentrado proteínico	60
2.9 Evaluación de toxicidad aguda	62

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
1. Parámetros físicos de la semilla	66
2. Parámetros bromatológicos	67
3. Valor energético de la semilla de cacahuanano	70
4. Toxicología analítica	71
5. Digestibilidad <i>in vitro</i>	74
6. Composición de aminoácidos y calificación química	76
7. Destoxificación del material	78
8. Toxicidad aguda	80
VI. CONCLUSIONES	84
VII. BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	92

## I. INTRODUCCIÓN

En México, el hambre y la desnutrición continúan siendo un problema debido a la poca disponibilidad de alimentos y a las condiciones económicas actuales de la población, provocando un alto porcentaje de desnutrición proteico-calórica que es más grave en el medio rural que en el medio urbano y afecta mayoritariamente a los grupos de la población más vulnerables como los niños, mujeres embarazadas, lactantes y ancianos. La Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural de 1996, evaluó el estado de nutrición de los niños menores de 5 años; las cifras de desnutrición son del orden del 43% en el área rural indígena y marginada, 26% tienen una forma leve de desnutrición y en 17% la desnutrición va de moderada a severa; lo que se traduce en una alta tasa de mortalidad infantil [1].

Esto ha llevado a realizar investigaciones encaminadas hacia la búsqueda de nuevo material biológico con potencial proteico-calórico, los cuales sean de buena calidad nutricional; dichos estudios se han enfocado principalmente a las leguminosas, primeramente por su elevado contenido en proteínas, y también por ser buenas fuentes de hidratos de carbono, minerales y vitaminas, y algunas de lípidos [2].

México cuenta con una gran biodiversidad de recursos debido a su amplio mosaico de ecosistemas, y las leguminosas silvestres que son muy abundantes en todo el territorio nacional podrían ser utilizadas tanto para la alimentación animal, como

humana. Sin embargo, estos recursos están subaprovechados, tal es el caso del cacahuanano (*Glinicidia septium*) que es un árbol perteneciente a ésta familia.

El cacahuanano es muy interesante desde la perspectiva de contener compuestos con propiedades medicinales y alelopáticas protectoras [3]; la "alelopatía" es un proceso biológico presente tanto en los ecosistemas naturales como en los agroecosistemas y ha sido propuesta como un alternativa potencial en el manejo de los componentes del agrosistema, entre ellos las malezas [4]. En un estudio realizado a la semilla de cacahuanano, se detectó una alta concentración de canavanina, un aminoácido no proteico que exhibe propiedades aleloquímicas protectoras[5, 6]. También a esta leguminosa se le tiene en alta estima para la elaboración de forrajes o piensos de alta calidad para el ganado [7], ya que el contenido de proteína de sus hojas es superior al 20%; pero el aprovechamiento de las semillas como fuente potencial de proteína para la alimentación humana ha sido poco estudiada.

Estudios previos realizados a la semilla de cacahuanano, revelan que ésta leguminosa tiene un alto contenido de proteína y grasa [5], por lo que se podría considerar a esta planta como una auténtica oleaginosa y fuente potencial de proteína. En este trabajo se trata de caracterizar esta parte de la planta desde el punto de vista alimenticio y toxicológico, como una alternativa a las fuentes de proteína clásicas.

## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general.

- Evaluar la calidad nutritiva e inocuidad de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano (*Giricidia sepium*).

### 2. Objetivos particulares.

- Confirmar el alto contenido de proteína y grasa en la semilla de cacahuanano, y determinar su densidad calórica.
- Medir el contenido de inhibidores de tripsina, lectinas, taninos, fitatos y nitratos en la semilla de cacahuanano.
- Determinar el contenido de nitrógeno no proteínico en la semilla de cacahuanano, y al a vez cuantificar el aminoácido no proteínico canavanina.
- Corroborar la toxicidad aguda de la semillas de cacahuanano por vía oral en ratones y correlacionar con la presencia de los tóxicos que contenga la semilla.
- Determinar la composición de aminoácidos de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano, así como su posible biodisponibilidad a través de la determinación de la digestibilidad *in vitro*.
- Obtener un concentrado proteínico que esté exento de los factores tóxicos y antinutricionales presentes en la semilla de cacahuanano, en particular de canavanina.
- Confirmar el adecuado proceso de destoxificación mediante la determinación de los factores tóxicos residuales y la realización del ensayo de toxicidad aguda en el concentrado.

### III. ANTECEDENTES

#### 1. Las semillas de leguminosas.

Las *Leguminosae* constituyen una de las familias botánicas más amplias del reino vegetal, pues comprende 650 géneros aproximadamente, que incluyen alrededor de 18000 especies distribuidas en la mayoría de los ambientes de todo el mundo, en especial en las regiones tropicales y semitropicales. Los taxónomos han dividido las legumbres en tres familias afines [8]:

- ◊ *Caesalpinaceae* contiene aproximadamente 2800 especies, la mayoría de las cuales son árboles de sabanas tropicales y bosques de África, América del Sur y Asia.
- ◊ *Mimosaceae* también abarca aproximadamente 2800 especies, y son predominantemente árboles pequeños y arbustos de las regiones tropicales semiáridas de África, América y Australia.
- ◊ *Fabaceae* contiene más de 12000 especies, son principalmente las hierbas y los arbustos pequeños distribuidos mundialmente.

Las semillas maduras y secas de especies de la familia *Fabaceae*, se conocen con el nombre de leguminosas, derivado del fruto en legumbre que las contiene y se han usado en la agricultura desde tiempos antiguos, ya que se encuentran entre las primeras fuentes de alimento para el hombre.

El fruto de las leguminosas es muy característico, siendo una vaina generalmente alargada, seca en su madurez con cavidades donde puede alojar de una a varias hileras de semillas; si la vaina se abre espontáneamente se denomina dehiscente, en tanto que si no se abre es indehiscente [9].

Una característica propia de las semillas de leguminosas es su alto contenido de proteína, nutritivamente son de 2 a 3 veces más ricas en proteína que los granos de cereal, y muchas de las semillas también contienen grasa. Por lo tanto, es sorprendente que no exista una explotación más amplia de ésta familia botánica de alto valor nutritivo. Una limitación al uso de las leguminosas es que la mayoría de éstas, se hallan bien protegidas contra la depredación de animales como el ganado e incluso el hombre, y otros organismos (bacterias, insectos, hongos); ésta protección consiste en la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos tóxicos y/o antinutricionales, los cuales actúan como disuasivo al ataque de sus depredadores.

La naturaleza y principal acción de las toxinas y sustancias antinutritivas ha sido tema de varias revisiones [10, 11, 12]. Hay compuestos que pueden producir efectos tóxicos en animales como los nitratos y la canavanina; también hay algunos compuestos que deprimen la utilización de los componentes del alimento tales como taninos, inhibidores de proteasas, fitatos y hemaglutininas:

- **Nitratos:** Se puede encontrar un alto contenido de éstas sustancias químicas en algunas plantas debido a que éstas son fijadoras de nitrógeno y al uso de fertilizantes. Se puede tener toxicidad por nitratos en primer lugar por una ingestión masiva de éstos compuestos (envenenamiento), y en segundo lugar si los mismos se transforman en nitritos por la microflora digestiva, provocando metahemoglobinemia en lactantes (síndrome del bebé azul) y también en algunos adultos. También pueden actuar como pro-cancerígenos, ya que tienen la capacidad de formar compuestos cancerígenos (nitrosaminas o nitrosamidas), al reaccionar con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o amidas [13, 14].
- **Canavanina:** El ácido 2-amino-4-guanidoxi butírico (canavanina) es un aminoácido básico no proteico potencialmente tóxico análogo de la arginina, que se encuentra presente en al menos 1500 especies de la familia *Leguminosae*, almacenado de forma libre en la fracción no proteica de las semillas. Es tóxico porque compite en su incorporación dentro de las vías biosintéticas de formación de proteínas, síntesis de macromoléculas, glucoproteínas, ARN y ADN; su incorporación equivocada en las proteínas lo convierte en un potente inhibidor del crecimiento para muchos sistemas microbianos, pudiendo ser letal debido al mal funcionamiento de su metabolismo [6, 15]. La canavanina exhibe propiedades aleloquímicas protectoras altamente efectivas hacia una gran variedad de plagas, predadores herbívoros, e inclusive la protege de enfermedades y de otras plantas que compiten con ella. Hay pocos reportes de sus efectos en células de organismos superiores.

- **Taninos:** Son una clase de compuestos polifenólicos solubles en agua presentes en la mayoría de las plantas comestibles, incluyendo granos como sorgo, mijo, cebada, frijol, soya, chícharos, algarrobo, y frutas como manzanas, plátanos, uvas, duraznos, peras y fresas [16]. Se consideran nutricionalmente indeseables porque forma un complejo proteína-tanino que tiene lugar cuando los grupos fenólicos de los taninos se oxidan a quinonas, pudiendo formar enlaces covalentes entre los grupos amino épsilon de las lisinas y de las argininas en las cadenas peptídicas, precipitándolas y reduciendo el valor nutricional del alimento. Los taninos se pueden unir además a las enzimas digestivas impidiendo su libre acción y también se unen con las proteínas de la mucosa intestinal disminuyendo la absorción de nutrientes, afectando la utilización de vitaminas y minerales [17].
- **Inhibidores de proteasas:** Son sustancias antinutritivas de naturaleza proteica ampliamente distribuidas en los alimentos de origen vegetal (leguminosas, cereales, frutas y verduras), que interfieren inhibiendo la actividad de las proteasas, que son las enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos permitiendo su asimilación. Los inhibidores tienen uno o más péptidos de unión (sitio reactivo), los cuales interaccionan con el sitio reactivo de la enzima; esta inhibición se traduce en una reducción de la digestión proteica y por consecuencia también de su asimilación [18]. El inhibidor de tripsina (IT) es uno de los más abundantes, y dada su naturaleza proteica los IT son fácilmente desnaturalizados e inactivados mediante el tratamiento con calor [19].

- **Ácido fítico:** Es el ácido inositol hexafosfórico que se encuentra en elevadas concentraciones en las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas; es una estructura altamente reactiva, debido a que la molécula posee múltiples grupos fosfato reactivos capaces de formar complejos con cationes. Su acción fundamental es disminuir la absorción o biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mn, Mo, Fe y Zn (por formar sales insolubles con éstos); y también es una fuente inadecuada de fósforo no bioasimilable por el hombre, ya que nuestro organismo no produce la enzima fitasa necesaria para hidrolizar el ácido fítico y liberar el fósforo de este compuesto. Además forma complejos insolubles fitato-mineral-proteína, provocando la disminución de la solubilidad y digestibilidad de las proteínas en el organismo, así como la inhibición de enzimas digestivas como la pepsina, tripsina y  $\alpha$ -amilasa; bajo condiciones fisiológicas [20, 21].
  
- **Hemaglutininas:** Las lectinas (nombre por el cual también se les conoce) son un grupo de proteínas o glicoproteínas tóxicas presentes en la mayoría de las leguminosas comestibles, que además de presentar la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos sanguíneos, tienen actividad tóxica en pruebas de laboratorio con animales. Su acción tóxica consiste en que las hemaglutininas se unen con las proteínas de células epiteliales de la pared del intestino, ocasionando con esto una mala absorción de nutrientes, tales como hidratos de carbono y proteínas. Las hemaglutininas presentes en algunas especies se destruyen por los métodos de preparación culinarios utilizados corrientemente [10, 20].

Así hoy en día, unas cuantas semillas (aproximadamente 20) son de importancia comercial como fuente de alimento humano, las cuales son consumidas en estado seco, cocidas o en estado inmaduro [22]. Sin embargo, la presencia de sustancias tóxicas en las leguminosas no debe considerarse como una desventaja para su utilización segura a gran escala, dado que la mayoría raramente son consumidas en estado crudo, y con el estudio o conocimiento de técnicas de procesamiento adecuadas se pueden inactivar, reducir o eliminar por completo las toxinas.

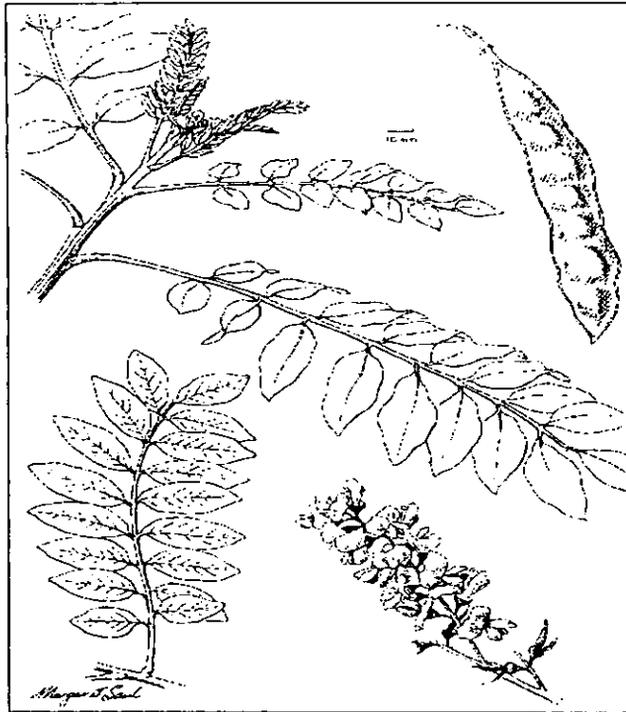
Entre los procedimientos empleados para mejorar la calidad nutritiva y mejorar el aprovechamiento de las propiedades alimenticias de las semillas de leguminosas, se tienen los siguientes [19]:

- El tratamiento con ácidos y calor.
- La fermentación.
- La inmersión (remojo).
- La germinación.
- La eliminación mecánica de las testas.
- La selección y manipulación genética.
- El aislamiento proteico por métodos químicos.

## 2. El cacahuanano.

El cacahuanano (*Gliricida sepium*) es un árbol perenne de tamaño medio y raíces profundas, perteneciente a la familia *Leguminosae* y subfamilia *Fabaceae*. Esta leguminosa se conoce en nuestro país como cacahuanano, cacahuananche (Mich., Gro., Sin. y Nay.), cocoite (Chis.), cocuite (Oax.), cocuite (Ver.), chanté (Chis.), flor de San José (S.L.P.), frijolillo (Méx.), jelelte (S.L.P.), laití (Chis.), lengua de perico, madre de cacao (Jal., Chis., Tab. y Q.Roo.), mata rata (Gro.), mata ratón (Chis.), muiti (Ver.), sayab (Yuc.), yaité (Chis.); mientras que en otros países se le conoce como balo o bala (Panamá), bien vestida o piñón florido (Cuba), kakawati (Filipinas) madre de cacao (Puerto Rico y Guatemala), madera negra (Honduras, Costa Rica y Panamá), madriado (Honduras y Nicaragua), mata ratón (Venezuela), madura (Trinidad), piñón de cuba (República Dominicana), palo de hierro (El Salvador), ratonera (Antillas); entre otros nombres vulgares [23, 24, 25].

El cacahuanano crece bien en numerosos países tropicales donde existen condiciones de humedad y calor. En nuestro país, dicha leguminosa se encuentra ampliamente distribuida en las vertientes del Golfo de México, desde Tamaulipas a San Luis Potosí, norte de Puebla y Veracruz, hasta Yucatán; en tanto que en la vertiente del Pacífico se distribuye desde Sinaloa hasta Chiapas, e incluso se menciona que esta especie es originaria del Sur de México y Centro América [7].



Dentro de los usos tradicionales de esta planta se encuentran: forraje para la alimentación suplementaria de ganado doméstico (bovino, caprino, ovino, avícola) con alto contenido en proteínas e hidratos de carbono, sus flores hervidas o fritas son aptas para el consumo humano, como "cerca viva" de terrenos agrícolas, abono verde en los sembradíos, control de la erosión del suelo por ser una planta fijadora de nitrógeno, para dar sombra a cultivos delicados como cacao, café, té o vainilla; las ramas leñosas y la corteza se suelen secar para utilizarlas como leña, e incluso se menciona que la corteza, tallos tiernos y las hojas constituyen un excelente rodenticida. Se han descubierto cumarinas en éstas partes y se mencionan sus efectos hemorrágicos sobre el sistema vascular (arterial y venoso) hacia roedores [26, 27, 28].

Las propiedades tóxicas de la *Gliricidia sepium* son controvertidas pues su comportamiento es variable; estudios previos de las hojas, raíces, corteza y corazón de este árbol muestran que, los extractos orgánicos o fracciones parcialmente puras de éstas partes contienen una variedad de compuestos químicos con actividad biológica, como es la de pesticida hacia plagas: orugas, termitas, insectos, organismos marinos, hongos, otras plantas y malezas [29, 30].

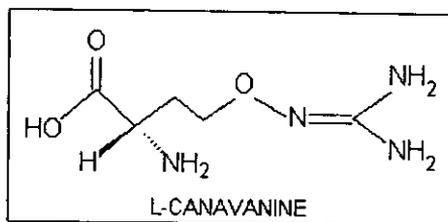
A continuación se presenta la distribución de los constituyentes químicos presentes el cacahuanano [31]:

<b>Localización</b>	<b>Compuesto</b>
Semillas	Aminoácidos y péptidos: - Canavanina
Hojas	Productos naturales aromáticos simples Benzopiranoïdes Flavonoides
Flores	Flavonoides
Tronco del árbol	Flavonoides: - Sepinol, sepiol, gliricidin, gliricidol
Hojas	Ácido gálico, ácido gentísico, ácido protocatechuico, ácido p-hidroxi benzoico, ácido $\beta$ -resorcílico, ácido vanillico, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido m-cumárico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinapínico, cumarina y myricitin.

Los constituyentes químicos de los extractos del cacahuanano pueden ser de interés terapéutico, ya que se pueden usar con fines benéficos dependiendo de la concentración atribuyéndosele amplias propiedades medicinales; por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea causada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, enfermedades causadas por protozoarios como la malaria, amibiasis y la enfermedad de "Chagas" causada por el *Trypanosoma cruzi*; como antifúngico en el tratamiento de infecciones en la piel (dermatosis) causada por hongos patógenos (*Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*), y también se han aislado recientemente una variedad de compuestos usados como poderosos agentes antitumorales [32, 33, 34].

Sobre esto último cobra un interés significativo la presencia de canavanina en la semilla del cacahuanano, porque al parecer este aminoácido no proteínico análogo de la arginina es tóxico en contra de virus (herpes simple), hacia bacterias (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*), hacia algas (*Chlamydomonas reinhardtii*), contra numerosos insectos y sus larvas (mosca *Phormia terranova*, langosta *Locusta migratoria*, gusano *Manduca sexta*), e inhibe el crecimiento celular en plantas y causa retardo en el crecimiento de sus raicillas (tomate, amaranto, berro, col, calabaza) [35, 36].

Investigaciones recientes sobre la canavanina, han demostrado su potencial valor como agente anticancerígeno hacia ciertas células tumorales *in vitro* e *in vivo*, usándolo solo, o combinado con otros tratamientos para lograr un efecto sinérgico; por lo que la síntesis de compuestos análogos derivados de la canavanina, parece ser un enfoque prometedor en el desarrollo de nuevos "compuestos con actividad biológica", como es la de antimicrobiana, pesticida y citotóxica [37, 38, 39].



### **3. Estudios de toxicidad.**

La toxicología es la ciencia que estudia las sustancias químicas y los fenómenos físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas (enfermedades) a los seres vivos y los mecanismos que las producen, además de los medios para contrarrestarlas y los procedimientos para detectar, identificar, determinar y valorar el grado de toxicidad de tales sustancias [40]. Los tóxicos o xenobióticos son agentes físicos o químicos que luego de penetrar en el organismo, pueden producir alteraciones del estado fisiológico o de la salud de un ser vivo, inclusive provocar la muerte (un agente xenobiótico es toda aquella sustancia que ingresa en el organismo procedente del exterior). Por lo tanto no hay sustancias atóxicas y cualquier sustancia puede actuar como tóxico, y su acción sobre un organismo evoluciona en función de las condiciones del sujeto, del ambiente, de la cantidad y tiempo que tarda la exposición a los mismos.

Cuando se pretende proponer una especie vegetal no convencional o poco conocida como fuente de nutrimentos, es necesario contemplar su toxicidad potencial debida a la presencia de sustancias tóxicas y factores antinutricionales, ya que algunos de ellos son muy comunes en los alimentos de origen vegetal. Para esto se han desarrollado técnicas usando animales de laboratorio (por ejemplo ratones, ratas, conejos y cuyos) para descubrir una amplia gama de toxinas potencialmente dañinas al hombre y otros animales monogástricos.

En los estudios toxicológicos de rutina los animales de laboratorio son sometidos a dosis y tiempos de tratamiento variables, que ponen de manifiesto los efectos producidos por el agente de prueba. Los estudios o ensayos toxicológicos se dividen en tres categorías [40]:

**1) Estudios de toxicidad aguda:**

Se lleva a cabo en una sola administración del agente, en un periodo de 24 horas. La evolución puede llevar a los animales de ensayo a la muerte, o a una recuperación total o parcial, donde podrían quedar secuelas o lesiones permanentes. La toxicidad aguda se expresa generalmente por la dosis de un xenobiótico en mg/kg necesaria para matar al 50% de los animales de experimentación, llamado también  $DL_{50}$ .

**2) Estudios de toxicidad subaguda:**

Ensayo de toxicidad a corto plazo también conocido como subcrónico, que implica administraciones diarias repetidas o 5 veces por semana, en un periodo de aproximadamente 10% de la vida del animal o tratamientos más cortos de 14 a 28 días, para roedores pequeños como el ratón. La toxicidad subaguda nos proporciona información sobre los efectos tóxicos principales de una sustancia, su reversibilidad o irreversibilidad y los órganos implicados. Durante el ensayo se realiza la observación clínica detallada de los animales, se evalúan el crecimiento ponderal, el consumo de alimentos y bebidas, además de un examen hematológico.

### 3) *Estudios de toxicidad crónica:*

Ensayos de toxicidad a largo plazo en los que la administración del agente tóxico se efectúa repetidamente durante toda la vida del animal, o por lo menos un porcentaje importante de ella; por ejemplo, en un ratón cuya vida es de 2 años, la administración será por un mínimo de 18 meses. La absorción de éstas pequeñas dosis no hace patente trastornos tóxicos, si se eliminan normalmente; pero la repetición de éstas dosis mínimas lleva a estados patológicos de sintomatología variadísima con el transcurso del tiempo, por la acumulación del producto dentro del organismo (normalmente en órganos y tejidos concretos) o por la suma de efectos lesivos.

Tradicionalmente se han venido clasificando a las sustancias en varias categorías, de acuerdo con su toxicidad aguda  $DL_{50}$  por vía oral [40]:

<b>Rango de toxicidad</b>	<b>Denominación usual</b>	<b>Dosis oral única en rata <math>DL_{50}</math></b>
1	Extremadamente tóxico	< 1 mg/kg p.c.
2	Altamente tóxico	1-50 mg/kg p.c.
3	Moderadamente tóxico	50-500 mg/kg p.c.
4	Ligeramente tóxico	0.5-5 g/kg p.c.
5	Prácticamente no tóxico	5-15 g/kg p.c.
6	Relativamente inocuo	> 15 g/kg p.c.

La mayor parte de los estudios de toxicidad son diseñados para determinar una dosis o concentración letal 50 de un químico, pero este estudio permite además de tener información sobre los riesgos a los que se expone el hombre después de una administración o exposición a una dosis especialmente elevada, determinar el efecto tóxico de una sustancia, el órgano(s) o sistema(s) blanco y reforzar las bases para establecer la dosis de los estudios a largo plazo. El método usado para estudiar la toxicidad aguda se basa en la relación dosis-respuesta para un grupo de animales experimentales, en el cual está involucrada la relación entre la dosis y el número de individuos que mueren como resultado de la exposición de un tóxico.

En este tipo de bioensayos, múltiples factores pueden influir sobre la respuesta tóxica al observar diferencias entre los individuos de una población; por lo que en la determinación experimental de la toxicidad aguda, se recurre a poblaciones animales homogéneas tomando en cuenta los siguientes factores [41]:

- A) **Factores dependientes del individuo** (especie animal utilizada en el experimento, raza o cepa, sexo, peso, edad, susceptibilidades individuales, estado fisiológico, estado patológico).
  
- B) **Factores dependientes de las condiciones de la administración** (vía de administración, naturaleza del vehículo, concentración de la sustancia, rapidez de la administración, factores ambientales, administración anterior).

#### 4. Las proteínas.

Las proteínas figuran entre las moléculas orgánicas más abundantes en la mayoría de los sistemas vivos. Las moléculas proteicas son de una diversidad extraordinaria con distintas funciones biológicas: enzimas, hormonas, anticuerpos, toxinas, proteínas de transporte y muchos otros tipos de proteínas estructurales. En cuanto a su estructura, todas son polímeros de aminoácidos dispuestos en secuencias lineales. El gran valor de los aminoácidos como bloques de construcción biológicos, radica en el hecho de que pueden unirse unos con otros mediante la formación de enlaces amida, comúnmente llamados enlaces peptídicos [42].

Todos los aminoácidos poseen la misma estructura fundamental: un átomo de carbono central enlazado con un grupo amino, con un grupo carboxilo, con un átomo de hidrógeno y con otro átomo o grupo de átomos. Teóricamente puede existir una gran variedad de aminoácidos diferentes, pero sólo se utilizan 20 tipos distintos para construir las proteínas, no importa que se trate de una célula bacteriana, una célula vegetal o una célula del cuerpo humano. Los 20  $\alpha$ -**aminoácidos** son: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, histidina y lisina.

Los vertebrados no pueden sintetizar los 20 aminoácidos. Los seres humanos pueden sintetizar en su organismo 12 de ellos, ya sea a partir de un esqueleto de carbono simple o a partir de otro aminoácido; los otros 8 que no pueden sintetizar y deben obtenerse de la dieta en cantidades adecuadas, se conocen como **aminoácidos esenciales o indispensables**. Para los seres humanos adultos los aminoácidos esenciales son la fenilalanina, la isoleucina, la leucina, la lisina, la metionina, la treonina, el triptófano, la valina; y en los primeros años de vida, también lo es la histidina [42].

Desde el punto de vista nutricional, se ha enfocado más en el requerimiento de aminoácidos esenciales y los niveles propuestos son aquellos considerados necesarios para mantener la salud y las necesidades fisiológicas de la mayor parte de individuos de un grupo de la población. El cuadro siguiente muestra los requerimientos diarios para lactantes y niños entre 2-5 años, según lo establece la FAO/OMS [43]:

<b>Aminoácido esencial (g/16 g N)</b>	<b>Requerimientos Lactantes</b>	<b>Requerimientos Niños 2-5 años</b>
Histidina	2.6	1.9
Isoleucina	4.6	2.8
Leucina	9.3	6.6
Lisina	6.6	5.8
Metionina + Cisteína	4.2	2.5
Fenilalanina + Tirosina	7.2	6.3
Treonina	4.3	3.4
Triptófano	1.7	1.1
Valina	5.5	3.5

Las diferentes fuentes de proteínas alimentarias tienen diferente calidad nutritiva; es decir, difieren en su capacidad para cubrir los requerimientos proteicos humanos según las necesidades del organismo. La **calidad nutricional** de las proteínas alimentarias (aquellas que son sabrosas, digestibles, no tóxicas y económicamente utilizables por el hombre) se debe evaluar en función de su composición de aminoácidos, su digestibilidad y también se debe tomar en cuenta la concentración o contenido total de proteínas en el alimento o dieta [44].

☆ **Concentración de proteínas.**

Se refiere a la abundancia de este nutriente en el alimento, y el contenido de proteína de un alimento o dieta se expresa generalmente como los gramos de proteína por 100 gramos de alimento. Las leguminosas han sido consideradas tradicionalmente como excelentes fuentes de proteína vegetal para el hombre, cuyas semillas han sido ampliamente utilizadas en nutrición, con niveles que oscilan entre 17% en las alubias y 42% en la soya [45]:

<b>Semilla de leguminosa</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Proteína (%)</b>
Frijoles	<i>Phaseolus vulgaris</i>	17-23
Garbanzos	<i>Cicer arietinum</i>	17-21
Chicharos	<i>Pisum sativum</i>	20-26
Lentejas	<i>Lens culinaris</i>	20-28
Habas	<i>Vicia faba</i>	26-34
Soya	<i>Glycine max</i>	38-42
Cacahuate	<i>Arachis hypogaea</i>	25-28

Las semillas de leguminosas tienen un alto contenido de proteína, pero debe tenerse en cuenta que un porcentaje significativo de la proteína cruda está constituido por compuestos nitrogenados no proteicos que constituyen la fracción de **nitrógeno no proteico**, que enmascara su verdadero valor nutritivo [46]. Este porcentaje varía según el tipo de leguminosa y se encuentra constituido principalmente por péptidos, aminoácidos libres y sustancias nitrogenadas de origen no proteico, como iones nitrato ( $\text{NO}_3$ ) y nitrógeno amido ( $\text{R-CO-NH}_2$ ).

#### ☆ **Digestibilidad de proteínas.**

Las proteínas de los alimentos deben ser digeridas para liberar los aminoácidos y dipéptidos que son absorbidos por el intestino delgado. La digestibilidad proteínica se refiere a la cantidad de proteína ingerida que el organismo transforma por el proceso digestivo en una forma que pueda absorber y podría utilizar para realizar una función biológica; es lo que se conoce como biodisponibilidad.

Los aminoácidos presentes en las proteínas de los alimentos no están siempre disponibles en su totalidad, debido a que la digestión de la proteína puede ser incompleta. Esta digestibilidad proteínica de los alimentos o dietas varía de acuerdo a las cualidades intrínsecas de este nutrimento, entre las cuales tenemos [44]:

- las diferencias biológicas existentes entre individuos puede afectar su capacidad para digerir las proteínas y absorber los aminoácidos, por ejemplo el estado fisiológico del consumidor;

- la presencia de componentes que pueden disminuir parcialmente la digestión, por ejemplo los inhibidores de tripsina, ácido fítico, polifenoles (taninos) o la fibra dietética;
- los cambios físico-químicos inducidos por el procesamiento de los alimentos, por ejemplo algunos alimentos refinados o cocidos se digieren mejor que en su forma natural o cruda;
- la estructura nativa de la proteína, por ejemplo la compactabilidad (el tamaño y extensión de la superficie) de la proteína, puede dificultar enormemente la acción de las enzimas digestivas y por lo tanto su proteólisis; y
- el origen de las proteínas, en general las proteínas de origen vegetal tienen una digestibilidad de 60-85%, mientras que las proteínas de origen animal, al igual que los cereales refinados tienen digestibilidad de 95%:

<b>Fuente de proteína</b>	<b>Digestibilidad verdadera (%)</b>
Leche, huevo, carne, pescado	95
Harina refinada de trigo	96
Aislado de soya	94
Arroz pulido	88
Harina de soya	86
Trigo entero	86
Harina de avena	86
Productos de maiz	85
Frijoles	69

La digestibilidad se determina mediante ensayos biológicos con ratas, ya que se ha establecido que la digestibilidad de las proteínas es similar en la rata y el humano; los métodos *in vivo* se basan en suministrar a los animales experimentales una dieta que contiene la muestra como única fuente de proteínas y se determina la cantidad digerida de nitrógeno mediante la diferencia entre lo ingerido y lo eliminado por heces. Sin embargo, se han desarrollado alternativas *in vitro* más rápidas, menos costosas y con suficiente sensibilidad para determinar la digestibilidad; todos éstos métodos se basan en digerir la muestra con enzimas proteolíticas en condiciones estandarizadas; difiriendo entre ellos el número y naturaleza de las enzimas utilizadas y la medida final que realizan [47].

#### ✧ **Composición de aminoácidos.**

La calidad de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidades de aminoácidos que contiene; éstas se utilizan mejor cuando contienen aminoácidos esenciales en cantidades proporcionales a los requerimientos de cada aminoácido. El aminoácido esencial presente en concentración más baja en relación a los requerimientos se denomina aminoácido limitante; ésta relación está definida como **calificación química** (CQ) y queda determinada por la siguiente expresión:

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de prueba}}{\text{mg de aminoácido en 1g de proteína de referencia}}$$

Las proteínas de origen animal generalmente tienen concentraciones relativamente altas de todos los aminoácidos esenciales y por lo tanto, una excelente CQ. Las proteínas de cereales son pobres en lisina y en algunos casos en triptófano y treonina, mientras que las leguminosas suelen ser deficientes en aminoácidos azufrados (metionina - cisteína) y en algunos casos también en triptófano [48]:

<b>Origen de la proteína</b>	<b>Aminoácido limitante</b>	<b>CQ</b>
<b>CEREALES</b>		
Maíz	Lisina, triptófano	49
Arroz	Lisina	77
Trigo	Lisina	52
<b>LEGUMINOSAS</b>		
Frijol	Azufrados	55
Soya	Azufrados	74
Garbanzo	Azufrados, triptófano	63
Haba	Azufrados, triptófano	44
Lenteja	Azufrados	49

## 5. Obtención de concentrados de proteína.

La tecnología alimentaria moderna permite un mejor aprovechamiento de las proteínas alimentarias de origen vegetal, mediante procedimientos tales como el aislamiento proteico por métodos químicos, que permite obtener productos con una elevada cantidad de proteína, además de que logra reducir o eliminar la mayor parte de los compuestos no deseados, como son los factores tóxicos y antinutricionales presentes en las semillas de leguminosas que disminuyen su valor biológico y el adecuado aprovechamiento de este nutriente [49].

Mediante la extracción de proteína se pueden elaborar concentrados (más del 60% de proteína en peso) y aislados (más del 90% de proteína en peso) de este nutrimento partiendo de distintas especies de leguminosas. Ya que éstos productos presentan **propiedades nutritivas** adecuadas, pueden ser empleados en la elaboración de diversos alimentos mejorando la digestibilidad proteica o en la suplementación con aminoácidos de los alimentos; y también son usados en numerosos procesos tecnológicos debido a las **propiedades funcionales** (son aquellas propiedades fisicoquímicas que les permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables) de sus proteínas: propiedades de hidratación, solubilidad, viscosidad, formación de geles, texturización, formación de pasta o masa, propiedades emulsificantes, propiedades espumantes, fijación de aromas, entre otras más [50].

El procedimiento que generalmente es empleado para obtener éstos derivados proteicos partiendo de semillas de leguminosas es el siguiente:

*Primero:*

Se comienza con una selección, limpieza, secado y molienda de las semillas para tener una harina, la cual se desengrasa por medio de prensado o mediante agentes químicos (disolventes orgánicos) bajo condiciones térmicas moderadas, para conservar las propiedades funcionales de la proteína. Al final de éstos pasos se obtiene una **harina enriquecida** con aproximadamente 50% de proteína en peso, estando presentes una parte de los factores antinutritivos [45].

*Segundo:*

Para obtener un producto aún más rico en proteína, las harinas enriquecidas son sometidas a una solubilización de los componentes no proteicos (hidratos de carbono solubles y sales minerales) en medio hidroalcohólico que es una mezcla de etanol-agua, en medio ácido (pH=4-5) o con agua caliente, aprovechando que las proteínas no son solubles bajo éstas condiciones. El uso de agua acidificada a pH menor del punto isoelectrico de las proteínas, minimiza el desplegamiento, la asociación y la pérdida de sus propiedades funcionales. Finalmente, el residuo se neutraliza, lava y seca para obtener un **concentrado de proteína** vegetal con un 60 a 75% de proteína en peso [50].

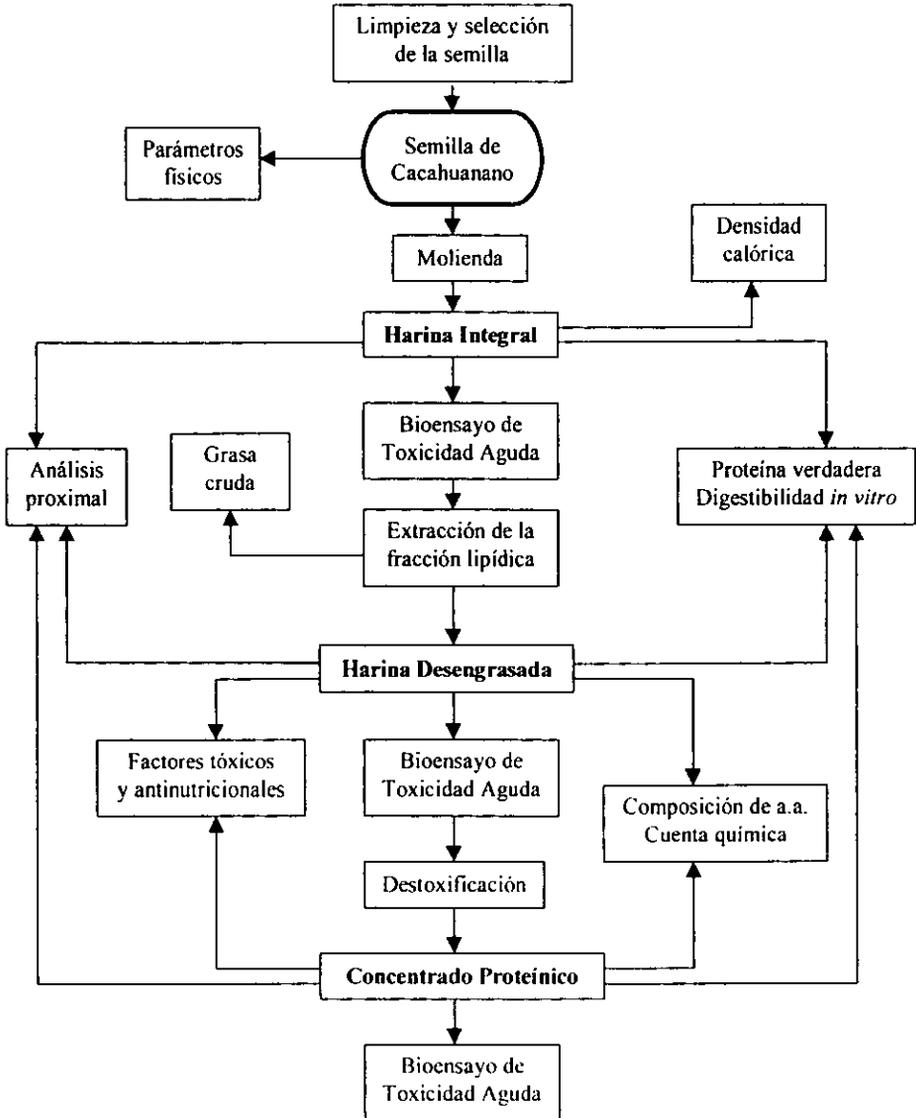
*Tercero:*

Otros productos de las semillas de leguminosas son los **aislados proteicos** (llamados también purificados o refinados de proteína vegetal), donde las harinas desengrasadas son sometidas a una solubilización de las proteínas en medio alcalino (pH=10-12). La solución se filtra y se centrifuga para separar los componentes no proteicos como polisacáridos insolubles, fibra y otros materiales insolubles. Después se realiza una precipitación selectiva de la proteína en el extracto acuoso por acidificación al alcanzar el pH del punto isoeléctrico de las proteínas, donde se eliminan los carbohidratos solubles (oligosacáridos) y las sales; obteniéndose un producto purificado con niveles superiores al 90% de riqueza proteica. Finalmente, el producto obtenido se centrifuga, se lava y es sometido a un proceso de secado por aspersion y/o liofilización [45].

Los aislados proteicos actualmente experimentan un aumento en su consumo, dado su elevado valor nutritivo, cualidades organolépticas aceptables y a sus mejores propiedades funcionales para su uso en la industria alimentaria en comparación con los concentrados; sin embargo, los aislados son más caros que los concentrados de proteína, debido al proceso adicional a la que son sometidos y a los productos químicos empleados en su obtención.

# IV. METODOLOGÍA

## 1. DIAGRAMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN.



## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

A continuación se describe cada uno de los bloques del diagrama de trabajo anterior, en donde se destacan los puntos más relevantes de cada actividad:

### **2.1 Limpieza y selección de la semilla.**

Contando con suficiente cantidad de semilla de cacahuanano recolectada en el tramo carretero Puerto Marqués (Gro.) – Pinotepa Nacional (Oax.), se procedió a separar manualmente el material extraño (piedras, semillas o granos extraños, material vegetativo) y las semillas dañadas física, química o biológicamente; en particular aquellas que muestran desarrollo de hongos [51]. El material seleccionado se homogeneizó para poder tomar muestras representativas que se usaron en los pasos subsecuentes.

### **2.2 Determinación de parámetros físicos.**

Con la finalidad de caracterizar la materia prima y poder compararla con otros lotes del mismo material biológico colectados en zonas distintas de la República, se determinaron los parámetros físicos que indicarán si se trata de la misma variedad. Estos son peso hectolítrico, que se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote de semilla limpia que ocupa un volumen establecido, el valor se expresa en kg/hL o g/100mL [51]; diámetro de las semillas, que se realizó con lotes de 30 semillas cada uno; y el número de semillas en un hectolitro (100L) o en 100mL.

## **2.3 Caracterización bromatológica de la semilla de cacahuanano.**

Con una muestra representativa del lote de semillas, se procedió a moler en un molino LABORATORY MILL mod. 4 y así obtener el material en forma de una harina integral (tamaño de partícula  $\leq 1\text{mm}$  de diámetro) a la cual se le practicó el análisis proximal y la densidad calórica.

### **2.3.1 Análisis proximal.**

Se llevó a cabo de acuerdo a los métodos del AOAC [52] con ligeras modificaciones y consta de:

- Humedad (H)
- Proteína cruda (P)
- Grasa cruda (G)
- Fibra cruda (F)
- Cenizas (C)
- Hidratos de carbono asimilables obtenidos teóricamente por diferencia:  
%Hidratos de carbono =  $100 - [\%H + \%P + \%G + \%F + \%C]$ .

### **2.3.2 Densidad Calórica.**

El contenido energético o densidad calórica de la semilla de cacahuanano, se determinó con la finalidad de ver si es un material con alto contenido calórico, similar a otros granos de leguminosas; usando una bomba calorimétrica balística, en la cual hay una conversión de la energía química en la producción de energía térmica, la cual se detecta por el cambio de temperatura [53].

Hay que tomar en cuenta que este aparato determina la energía liberada por la completa oxidación del alimento, mientras que en el cuerpo humano se pierde parte de esta energía por la digestibilidad y metabolismo de desaminación; por lo tanto, la energía determinada nos da el máximo potencial energético del alimento (calor de combustión) que por convención se conoce como energía gruesa o bruta.

Enseguida se muestran las fórmulas que pueden estimar con cierta aproximación términos energéticos biológicos a partir de la energía gruesa (EG) y de la composición química del alimento [53]:

- $TND = CPD + CCHOD + 2.25 CEE$
- $ED = TND \times 18.42$
- $EM = [(0.95-F) EG] - (31.4 \times N)$

Donde cada uno de los términos significa:

TND: total de nutrimentos digeribles.

EG: energía gruesa expresada en KJ/g.

ED: energía digerible expresada en KJ/g.

EM: energía metabolizable expresada en KJ/g.

N: nitrógeno expresado como g de nitrógeno / g de alimento.

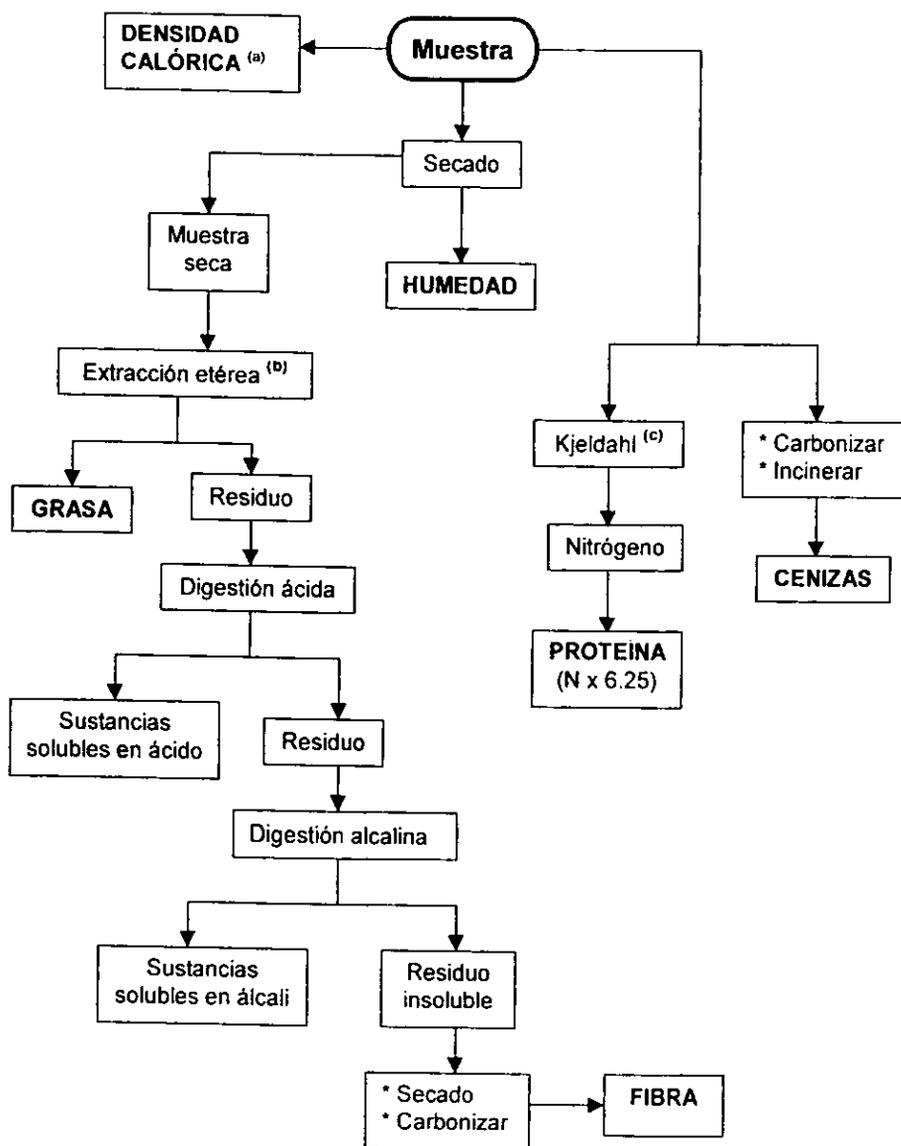
F: fibra cruda expresada como g de fibra / g de alimento.

CPD: contenido de proteína expresado como g de proteína / g de alimento.

CEE: contenido de grasa expresado en g de grasa / g de alimento.

CCHOD: contenido de carbohidratos expresados como g de carbohidratos / g de alimento.

A continuación se muestra un esquema que resume las actividades de este apartado:



(a) Se usó una bomba calorimétrica balística Gallenkamp mod. CBB-330-010L.

(b) Se extrajo la fracción lipídica utilizando éter de petróleo como disolvente.

(c) Se usó un digestor Tecator mod. ab 20/40 y microdestilador Tecator auto kjeltec No.1030.

## **2.4 Desengrasado de la semilla.**

Una vez confirmada la alta concentración de proteína y grasa de la semilla de cacahuanano, se fraccionó una cantidad mayor de 1 kg de material biológico entre 2mm a 3mm de tamaño de partícula en un molino LABORATORY MILL mod. 4 para posteriormente desengrasar la harina en un dispositivo tipo Soxhlet que procesa como mínimo 1kg de semillas, utilizando hexano grado QP como disolvente. A la harina desengrasada se le eliminó en su totalidad el disolvente y se obtiene un material con un contenido aproximado de 50% de proteína.

## **2.5 Caracterización bromatológica de los preparados.**

Fue necesario determinar el contenido de nitrógeno no proteínico de la semilla de cacahuanano, mediante la determinación de proteína verdadera; con el fin de conocer el contenido real de proteína. Si existe un alto nivel de N no proteínico, entonces se procederá a determinar a que compuesto corresponde.

A la harina desengrasada y concentrado proteínico además de determinar el contenido de nitrógeno proteico, también se determinó la composición de aminoácidos, la calificación química, la digestibilidad *in vitro* y el análisis proximal.

### 2.5.1 Nitrógeno proteínico (Proteína verdadera).

#### FUNDAMENTO:

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico y de la proteína soluble, y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de separar el nitrógeno no proteínico que puede contribuir en la determinación de nitrógeno por medio del método de Kjeldahl. Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta, ya que en la etapa de filtración se incluye junto con la proteína soluble precipitada [54].

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Digestor TECATOR mod. ab 20/40.
- Microdestilador TECATOR AUTO KJELTEC No. 1030.
- Agitador magnético THERMOLYNE mod. sp-13025.
- Papel Whatman #50 o #542.
- Tubos de digestión especiales TECATOR.
- HCl 2N.
- $K_2SO_4$  (RA).
- Solución de  $H_2O_2$  al 30%.
- Solución precipitante (disolver 5 g de tungstato de sodio, 1.51 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  en 20 mL de agua destilada; añadir 22 mL de HCl 2N, mezclar y aforar a 50 mL con agua destilada).
- Mezcla digestiva (mezclar por 30 minutos 3 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 300 mL de  $H_2SO_4$  concentrado y 100 mL de  $H_3PO_4$ ).
- Solución de ácido bórico al 1% con indicadores (disolver 20 g de ácido bórico en 2 L de agua destilada, agregar 20 mL de verde bromocresol -100 mg en 100 mL de metanol- y agregar 14 mL de rojo de metilo -100 mg en 100 mL de metanol-).

#### PROCEDIMIENTO:

##### \* Proceso de precipitación:

Pesar de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y desengrasada, extraer con 5 mL de agua caliente durante 15 minutos con agitación magnética. Agregar 2 mL de solución precipitante y dejar reposar 10 minutos, filtrar en papel Whatman #50 o #542 usando 25 mL de agua caliente con ligera succión.

\* Proceso de digestión:

Colocar el papel filtro con el precipitado en el tubo de digestión, más 0.5 g de  $K_2SO_4$ , 5 mL de mezcla digestiva, y digerir a  $370^\circ C$  por 15 minutos. Después retirar del digestor y esperar a que se enfríe para añadir 3 mL de  $H_2O_2$  al 30% y seguir calentando hasta que digestión se complete.

\* Destilación y titulación:

Después de la digestión se dejan enfriar los tubos para agregarles 25 mL de agua destilada, se coloca el tubo en el microdestilador para que la destilación y la titulación se efectúen automáticamente.

Además de introducir los tubos conteniendo la muestra, se debe de preparar de igual manera un blanco; donde se sustituya la muestra por glucosa o sacarosa.

CÁLCULOS:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL muestra} - \text{mL blanco}) \times \text{NHCl (meq/mL)} \times 0.014 \text{ (gN/meqN)} \times 100}{\text{g muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína Verdadera} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

### **2.5.2 Determinación de aminoácidos.**

A los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano se les determinó la composición de aminoácidos. La cuantificación de los aminoácidos de la proteína en estudio se realiza previa hidrólisis ácida de la proteína con HCl 6N para obtener los aminoácidos libres, a 145°C por 4 horas en un digestor TECATOR mod. ab 20/40 y posterior separación cromatográfica en un autoanalizador de aminoácidos TECHNICON mod. NC-2P [55]. Para tener completo el perfil de aminoácidos indispensables, fue necesario cuantificar por separado el triptófano, lo cual se realiza mediante una hidrólisis básica y su posterior cuantificación espectrofotométrica .

#### **FUNDAMENTO:**

Primero se hidrolizan todos los enlaces peptídicos para liberar los aminoácidos individuales, el hidrolizado se carga en una columna de resina de intercambio iónico. La fuerza con que los distintos aminoácidos se fijan a la resina depende de si poseen carga positiva o negativa, lo que esta dado por el pH de la solución (se ajusta a un pH de  $6.8 \pm 0.2$ ). Una vez fijados los aminoácidos a la resina, se pasan por la columna amortiguadores de pH creciente; la solución que sale de la columna se analiza para determinar los aminoácidos que contiene y su cantidad a través de una reacción colorimétrica con ninhidrina.

El resultado es una carta (aminograma) donde el área que aparece debajo de cada pico es proporcional a la cantidad de cada aminoácido que había en la proteína original. Previamente se corre un estándar de aminoácidos, para de este aminograma poder obtener el área de cada uno de los aminoácidos; además se inyecta una cantidad constante y conocida de norleucina que se usa como estándar interno.

## CÁLCULOS:

A continuación se tienen los cálculos para expresar el contenido de aminoácidos en mg del aminoácido / g de nitrógeno en la muestra:

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

$$\text{mg aa/g N} = \frac{(A_{aa} \times E_{Naa} \times \mu M \times P_{Maa} \times A)}{A_{Nm} \times a \times \text{mgNm}}$$

Donde cada uno de los términos significa:

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

$B_{aa}$  = Base de la mitad del pico

$h_{aa}$  = Altura del pico desde la línea base

$E_{Naa}$  = Equivalentes de norleucina del aminoácido correspondiente

$\mu M$  = Micromoles del aminoácido en el estándar

$P_{Maa}$  = Peso molecular del aminoácido

$A$  = Aforo al que se llevó el hidrolizado en mL

$A_{Nm}$  = Área de norleucina en el aminograma de la muestra

$a$  = Alicuota inyectada en mL

$\text{mgNm}$  = Miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada

### 2.5.3 Determinación de triptófano.

#### FUNDAMENTO:

El triptófano es el único aminoácido que no se puede leer conjuntamente en un autoanalizador de aminoácidos, ya que la hidrólisis ácida destruye éste aminoácido; por lo que se recurre a una hidrólisis alcalina [56] con LiOH 4N a una temperatura de a 145°C en un digester TECATOR mod. ab 20/40. El hidrolizado ajustado a un pH de 6.8 ± 0.2, se lleva a un volumen final de 25 mL y se cuantifica el aminoácido por medio de una técnica colorimétrica en donde se aprovecha que el anillo de indol de los residuos de triptófano dan un compuesto colorido con p-dimetilamino benzaldehído [57].

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- HCl concentrado.
- Solución estándar de triptófano 0.05 mg/mL.
- Solución de p-dimetilamino benzaldehído al 0.5% en HCl concentrado (DMAB).
- Nitrito de sodio al 0.2%.

#### PROCEDIMIENTO:

\* Se toman 3 alícuotas de 2 mL cada una del hidrolizado y a uno de los tubos se le adiciona 7.5 mL de HCl concentrado (blanco de la muestra), en tanto que a los otros dos se les agregan 7.5 mL de DMAB, se agitan y se dejan 15 minutos en reposo en la oscuridad.

\* Después de este tiempo a los tres tubos se le pone 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitan y se dejan otros 15 minutos en reposo; leer a 590 nm contra el blanco.

#### CÁLCULOS:

\* Hacer una curva estándar de 0 a 100 µg tomando 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mL de la solución estándar; aforar los tubos con agua destilada a 2 mL y adicionar 7.5 mL de DMAB, agitar y dejar 15 minutos en la oscuridad.

\* Después agregar 0.5 mL de nitrito de sodio, agitar y dejar nuevamente 15 minutos en reposo; leer a 590 nm contra el blanco.

\* Reportar en g triptófano/100 g N (16 g N), tomando en cuenta el aforo y la dilución usada, así como el % de proteína en la muestra.

#### **2.5.4 Calificación química.**

##### **FUNDAMENTO:**

Se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína estudiada, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia; en este caso, se toma como referencia las necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO. El aminoácido que se encuentra en menor cantidad con respecto al estándar, es el aminoácido limitante, puesto que determina la utilidad de la proteína [58].

##### **PROCEDIMIENTO:**

\* La calificación química para cada aminoácido se calcula mediante la siguiente relación.

El % de aminoácidos se expresa como g de a.a./100 g de proteína.

$$CQ = \frac{\% \text{ a.a. problema}}{\% \text{ a.a. estándar}} \times 100$$

## 2.5.5 Digestibilidad *in vitro*.

### FUNDAMENTO:

La evaluación de la calidad proteica de los alimentos se puede realizar a partir de la digestibilidad de las mismas, que constituye la proporción de aminoácidos que son factibles de ser liberados. El método se basa en digerir la muestra con enzimas proteolíticas en condiciones estandarizadas y la posterior medición del cambio de pH para determinar la digestibilidad [52].

### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Frascos de digestibilidad.
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Baño de temperatura controlada GRANT mod. LR-22493.
- Baño de calentamiento y recirculación VWR Scientific Products mod. 1112.
- Solución A: disolver 227040 BAEE unidades de tripsina (tipo IX), 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimotripsina (tipo II) y 0.520 L-leucina  $\beta$ -naftilamida unidades de peptidasa porcina intestinal en 10 mL de agua destilada.
- Solución B: disolver 65 caseína unidades de proteasa bacteriana en 10 mL de agua destilada.
- HCl 0.1N.
- NaOH 0.1N.

### PROCEDIMIENTO:

\* Se parte de una cantidad de muestra que contenga *10 mg de N* a la cual se le adiciona 10 mL de agua destilada y se mantiene en agitación durante 1 hora a una temperatura de 37°C.

\* A continuación se ajusta el pH a  $8.0 \pm 0.03$  con HCl o NaOH 0.1N, según sea el caso.

\* Inmediatamente se adiciona 1 mL de la solución A que debe estar a 37°C y se deja 10 minutos exactos con agitación a 37°C.

\* Transcurrido el tiempo se añade 1 mL de la solución B que debe estar a 37°C y se deja 9 minutos exactos con agitación a 55°C.

\* Pasado el tiempo se coloca la muestra en un baño a 37°C durante 1 minuto e inmediatamente se mide el valor de pH (medir pH exactamente a los 20 minutos después de haber adicionado la solución A).

#### CÁLCULOS:

\* El porciento de digestibilidad se obtiene al sustituir el valor de pH obtenido en la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

## **2.6 Determinación de factores tóxicos y antinutricionales.**

Se determinaron los posibles factores tóxicos y antinutricionales naturales que se presentan con cierta frecuencia en las semillas de leguminosas y que pudiera contener el material biológico (semilla), en particular los siguientes: canavanina, taninos, nitratos, lectinas, inhibidores de tripsina y fitatos. Esta fase del trabajo también se aplicará al preparado purificado, en particular el aminoácido canavanina, para confirmar el adecuado proceso de destoxificación.

### **2.6.1 Canavanina.**

#### FUNDAMENTO:

La metodología empleada es la propuesta por Fearon y Bell [59] con ligeras modificaciones [60], la cual se basa en que los compuestos que tienen el grupo "guanidoxi" como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de pentacianoaminoferrato, produciendo un color rojo-magenta al trabajar en un rango bien definido de pH (6.5-7.0). La coloración obtenida se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

## MATERIAL Y REACTIVOS:

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Potenciómetro CORNING mod. 430.
- Baño de temperatura controlada GRANT mod. LR-22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Papel Whatman # 4 o equivalente.
- HCl 0.1N.
- NaOH 1N.
- Sal sulfatada de canavanina (SIGMA C-9758).
- Solución estándar de canavanina (100µg/mL).
- Amortiguador de fosfatos pH 7.0.
- NaOH 5N.
- Pentacianoaminoferrato al 1% (PCAF).

## PROCEDIMIENTO:

\* A 100-150 mg de muestra finamente molida y desengrasada, se le agregan 20 mL de HCl 0.1N para realizar la extracción durante toda una noche con agitación de 200 r.p.m.

\* Al día siguiente filtrar el extracto sobre papel filtro doble (Whatman # 4 o equivalente) con ayuda de vacío, y ajustar el filtrado cerca de la neutralidad con NaOH 1N (rango de 6.5-7.0).

\* En caso de que se forme un precipitado o se enturbie la solución, conviene filtrar nuevamente y el filtrado ajustado es llevado a un volumen de 25 mL.

\* Tomar de ésta solución 3 alícuotas de 0.5mL c/u, a las cuales se le adicionan 9.1 mL de buffer pH 7.0 y 0.4 mL de PCAF; se llevan a un baño de 30°C por espacio de 25 minutos.

\* Después de dicho tiempo se procede a leer la coloración obtenida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

## CÁLCULOS:

\* Para la realización de los cálculos es necesario correr una curva estándar que tenga una concentración de 0 a 300 µg de canavanina, como la siguiente:

Concentración de canavanina (µg)	Solución estándar de canavanina (mL)	Amortiguador pH 7.0 (mL)	PCAF (mL)		
0 blanco	0.0	9.6	0.4	Incubación 30°C 25 min.	Lectura a 550nm
20	0.2	9.4	0.4		
50	0.5	9.1	0.4		
100	1.0	8.6	0.4		
150	1.5	8.1	0.4		
200	2.0	7.6	0.4		
300	3.0	6.6	0.4		

† Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

\* Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de canavanina y reportar como % de canavanina.

### 2.6.2 Taninos.

#### FUNDAMENTO:

Adaptación del Método ISO 9648 de 1998 basado en la reducción del ion férrico debido a los polifenoles y la formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas. Se realiza una extracción de los taninos presentes en la muestra con dimetilformamida y agitación, para después centrifugar y adicionar citrato férrico amoniacal y amoniaco a una alícuota de sobrenadante para desarrollar color y leer absorbancia de la solución obtenida a 525 nm [13].

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Tubos para centrifuga de 50 mL con tapón.
- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Baño de temperatura controlada GRANT mod. LR-22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.

- Solución estándar de ácido tánico (0.2g de ácido tánico en 100 mL de agua desionizada).
- Amoníaco (0.232 g de hidróxido de amonio aforados en 100 mL de agua desionizada).
- Dimetilformamida al 75% v/v (DMF).
- Citrato férrico de amonio (prepara 24 horas antes de usarse 0.35 g de citrato férrico de amonio aforados en 100 mL de agua desionizada).

#### PROCEDIMIENTO:

- \* Pesar de 0.3 a 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y extraer con 20 mL de DMF con agitación magnética por 1 hora.
- \* Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, enjuagando con 3 mL de la solución de DMF y llevar a la marca de aforo con este reactivo.
- \* Transferir al tubo de centrifuga y se procede a una centrifugación por 10 minutos a 2700 r.p.m. y luego se decanta el sobrenadante que debe homogenizarse.
- \* Tomar tres alicuotas del extracto y trabajarlos de la siguiente manera:

Tubo	Extracto (mL)	Agua (mL)	Citrato férrico amoniacal (mL)	Amoníaco (mL)		
1 blanco	1	6	1	0	Incubación 30 ± 1°C 10 ± 1 min.	Lectura a 525 nm
2	1	5	1	1		
3	1	5	1	1		

† Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

#### CÁLCULOS:

- \* Para la realización de los cálculos es necesario correr una curva estándar que tenga una concentración de 80 a 560 µg de ácido tánico; para lo cual se preparan 7 matraces volumétricos de 25 mL y se añade 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL respectivamente de la solución estándar de ácido tánico, llevando a la marca de aforo con DMF; obteniéndose una escala de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg de ácido tánico.
- \* Después se prepara la curva estándar que tenga una concentración de 0 a 560 µg de ácido tánico como la siguiente:

Tubo	Solución de ácido tánico de 2-14mg (mL)	Agua (mL)	Citrato férrico amoniacal (mL)	Amoníaco (mL)		
0 blanco	(‡)	5	1	1	Incubación 30 ± 1°C 10 ± 1 min.	Lectura a 525 nm
1	1	5	1	1		
2	1	5	1	1		
3	1	5	1	1		
4	1	5	1	1		
5	1	5	1	1		
6	1	5	1	1		
7	1	5	1	1		

(‡) En vez de solución de ácido tánico se agrega 1mL de DMF al 75%.

† Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

\* Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de taninos y reportar como % de ácido tánico.

### 2.6.3 Nitratos.

#### FUNDAMENTO:

Método de Cataldo y col. donde se realiza una extracción con agua de nitratos en tejidos vegetales, posterior centrifugación y desarrollo de color en sobrenadante (formación de un complejo) por nitración de ácido salicílico, que tiene su máximo de absorción a 410 nm en solución alcalina. La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presente [61].

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Centrifuga CLAY-ADAMS mod. Dynac™.
- Tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL con tapas herméticas.
- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.

- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- Papel Whatman # 542.
- Mortero con pistilo.
- Solución patrón de nitrato (nitrato de potasio R.A.) de 10 mg/mL.
- Solución de ácido salicílico (R.A.) al 5% m/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.
- NaOH 2M.
- Carbón activado R.A. (usar en muestras cuyo extracto esté muy pigmentado).

#### PROCEDIMIENTO:

- \* La determinación se hace por triplicado.
- \* Pesar de 0.1 a 0.5 g de muestra finamente molida y desengrasada para triturarla en un mortero con 25 mL de agua destilada y 0.45 g aproximadamente de carbón activado, hasta obtener una papilla homogénea.
- \* Transferir cuantitativamente a un tubo de centrifuga enjuagando con agua destilada para llegar a un volumen final de 30 mL y centrifugar 1 hora a 2700-3000 r.p.m.
- \* Decantar el sobrenadante y filtrarlo con ayuda de vacío sobre papel Whatman #542.
- \* Se homogeneiza el extracto de la muestra y se trabaja de la siguiente forma:

Tubo	Extracto (μL)	Solución de Ácido salicílico (mL)		Solución de NaOH (mL)		
1 blanco	100	(‡)	Incubación 30°C 20 ± 1 min.	9.5	Incubación 30°C 15 ± 1 min.	Lectura a 410 nm
2	100	0.4		9.5		
3	100	0.4		9.5		
4	100	0.4		9.5		

(‡) En vez de solución de ácido salicílico se agrega 0.4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

† Mezclar perfectamente (por 15 segundos) el contenido de los tubos después de cada adición.

#### CÁLCULOS:

- \* Se realiza una curva patrón con escala de concentraciones de 6-60 μg de nitrato.
- \* En un tubo de centrifuga adicionar 3 mL de la solución patrón de nitrato de 10 mg/mL, 0.45 g aproximadamente de carbón activado y 27 mL de agua destilada.

\* Homogeneizar y centrifugar 1 hora a 2700-3000 r.p.m.

\* Se decanta el sobrenadante y se filtra con papel Whatman doble del # 542 con ayuda de vacío y se homogeneiza. Así se obtiene una solución de nitrato de concentración 1 mg/mL.

\* Se procede a trabajar la curva patrón con el filtrado como sigue:

Tubo	Solución patrón de nitrato 1 mg/mL (μL)	Agua (μL)	Solución de Ácido salicílico (mL)		Solución de NaOH (mL)		
1 blanco	0	100	0.4	Incubación 30°C 20 ± 1 min.	9.5	Incubación 30°C 15 ± 1 min.	Lectura a 410 nm
2	6	94	0.4		9.5		
3	10	90	0.4		9.5		
4	30	70	0.4		9.5		
5	40	60	0.4		9.5		
6	60	40	0.4		9.5		

† Mezclar perfectamente (por 15 segundos) el contenido de los tubos después de cada adición.

\* Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón, determinar el contenido de nitratos y reportar como % de nitratos.

#### 2.6.4 Acido fítico.

##### FUNDAMENTO:

La metodología empleada es la propuesta por Haug y Lantzsch, la cual se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato presente en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe (III) en exceso, el cual forma un complejo con el fitato. Se cuantifica el Fe(III) residual que el ácido fítico no alcanza a complejar mediante una reacción colorida con la 2,2-bipiridina, fácilmente medible espectrofotométricamente [62].

## MATERIAL Y REACTIVOS:

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Tubos para centrifuga con tapón.
- Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- HCl 0.2N.
- Sulfato férrico de amonio•12H<sub>2</sub>O.
- Ácido tioglicólico.
- Fitato de sodio.
- Solución férrica (pesar 0.2 g de sulfato férrico de amonio•12H<sub>2</sub>O, disolver en 100 mL de HCl 0.2N y aforar a 1 L con agua desionizada).
- Solución de 2,2-bipiridina (pesar 1 g de 2,2-bipiridina, medir 1 mL de ácido tioglicólico y aforar a 100 mL con agua desionizada).
- Solución estándar de fitatos 1.5 mg/mL (se utiliza la sal sódica del ácido fitico la cual tiene una pureza del 94% y una humedad del 8.3%; por lo que hay que pesar 0.1714 g de fitato de sodio y aforar a 100 mL con agua desionizada).

## PROCEDIMIENTO:

- \* Se pesan de 0.04-0.12 g de muestra finamente molida y desengrasada, y se le adicionan 20 mL de HCl 0.2N, para someter a una agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- \* Una vez transcurrido el tiempo, el extracto se centrifuga a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colecta el sobrenadante.
- \* Obtenido el extracto de la muestra, se toma una alícuota de 1 mL que se coloca en un tubo de ensayo, se adiciona 1 mL de solución férrica y se tapa con una canica.
- \* A partir de este paso para la corrida del blanco y de los estándares, se toma 1 mL de agua (para el blanco), o de c/u de los estándares (3-30 µg P/mL ) y se sigue con el análisis desde el punto anterior.
- \* Los tubos se ponen en un baño de agua a ebullición por 30 minutos cuidando que el agua cubra totalmente el nivel del líquido dentro de los tubos.
- \* Transcurridos los 30 minutos hay que esperar que los tubos se enfríen. Una vez que han alcanzado la temperatura ambiente, se les agregan 2 mL de solución de 2,2-bipiridina y se mezcla perfectamente el contenido.

\* Se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 segundos exactos después de haber agregado la 2,2-bipiridina a cada tubo.

\* Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero y después se lee la absorbancia del blanco, la de las muestras problema y los estándares. Cada una de éstas se le resta por separado al blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva.

**CÁLCULOS:**

\* Las soluciones de la curva patrón se preparan diluyendo la solución de referencia de fitato con HCl 0.2N en un rango de 3-30 µg de fósforo fitico/mL.

\* El fitato de sodio y/o ácido fitico contienen 6 átomos de fósforo (peso molecular = 30.97 g/mol), por lo que  $6 \times 30.97 = 185.82$  g de P/mol. El peso molecular del ácido fitico es de 660 g/mol y el peso molecular del fitato de sodio es de 923.8 g/mol.

\* La solución patrón contiene 1.5 mg de fitato/mL, o sea:

$$\frac{1500 \mu\text{g fitato de sodio}}{\text{mL}} \times \frac{185.82 \mu\text{g P}}{923.8 \mu\text{g fitato de sodio}} = 301.72 \mu\text{g P/mL}$$

Tubo	mL de solución estándar (301.72 µg P/mL)	Aforar a (mL)	Concentración final µg P/mL
1	1	100	3.0172
2	2	100	6.0344
3	4	100	12.0688
4	6	100	18.1032
5	8	100	24.1376
6	10	100	30.1720

\* Realizar la curva patrón, regresión lineal, interpolar los datos y obtener la concentración del analito presente en la muestra como % de ácido fitico.

## 2.6.5 Inhibidores de tripsina.

### FUNDAMENTO:

La técnica es la utilizada por Kakade y col. que se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. Y después se determina la actividad proteolítica remanente por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual produce una coloración debida a la producción de p-nitroanilina que se lee en el espectrofotómetro a 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra [63].

### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Potenciómetro CORNING mod. 430.
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- Papel filtro Whatman #1.
- NaOH 0.01N.
- HCl 0.001N.
- Hidroximetil-amino-metano (TRIS).
- Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA).
- Solución amortiguadora e TRIS pH 8.2 / 0.05M (6.05 g de TRIS y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 900 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1 L).
- Solución BAPNA preparada el mismo día (100 mg de BAPNA se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C).
- Solución estándar de tripsina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina SIGMA # T-8253 y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N).
- Acido acético al 30%.

### PROCEDIMIENTO:

a) Preparación del extracto.

\* Se pesa 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de ésta suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y se afora a 50 mL.

\* A continuación se procede a agitar la suspensión mecánicamente por espacio de 2½ horas a 300 r.p.m.

\* Después de dicho tiempo se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.

\* El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40-60% (esto es indispensable para reducir la desviación estándar relativa).

b) Determinación de la actividad.

\* A continuación se muestra una tabla que muestra la serie de tubos que se deben preparar para poder determinar la actividad inhibitoria de la muestra.

Clave	ML Extracto	mL Agua	mL Std. Tripsina a 37C	Ácido acético 30%		mL BAPNA a 37°C		Ácido acético 30%
B1	1.8	0.2	2.0	1 mL	Baño a 37°C	5	Baño a 37°C	--
1	1.8	0.2	2.0	--		5		1 mL
B2	1.4	0.6	2.0	1 mL		5		--
2	1.4	0.6	2.0	--		5		1 mL
B3	1.0	1.0	2.0	1 mL		5		--
3	1.0	1.0	2.0	--		5		1 mL
B4	0.6	1.4	2.0	1 mL		5		--
4	0.6	1.4	2.0	--		5		1 mL
BR	0	2.0	2.0	1 mL		5		--
R	0	2.0	2.0	--		5		1 mL

† Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

\* La reacción enzimática se detiene por la adición del ácido acético al 30%; el cual debe homogenizarse inmediatamente. Cuando por la adición del ácido acético al tubo de reacción se enturbie o forme un precipitado, es necesario filtrar el contenido a través de papel filtro Whatman #1 y cerciorarse que el filtrado sea transparente.

\* La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primeramente ajustar el aparato a cero de absorbancia con su respectivo blanco.

#### CÁLCULOS:

\* La lectura de absorbancia (A) se pasa directamente a unidades de tripsina,  $U.T. = A \times 100$ .

\* Tendremos entonces una serie de valores de U.T., los cuales al restarles el dato de referencia (tubo con 0.0 mL de extracto), obtendremos los respectivos valores de unidades de tripsina inhibidas (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas.

\* Si se traza en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL) contra el volumen del extracto y se observa una correlación lineal negativa, donde el valor extrapolado es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real.

\* Reportar las unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra (U.T.I./mg muestra).

### **2.6.6 Lectinas.**

#### FUNDAMENTO:

La detección se basa en el poder aglutinante que tienen ciertas glicoproteínas hacia eritrocitos sensibilizados provenientes de hámster mediante una proteasa; ya que los glóbulos rojos de ésta especie reconocen mejor a las lectinas (son más sensibles). Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual [64].

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- Tubos de centrifuga de 15 mL graduados PYREX.
- Incubadora BLUE-M.

- Espectrofotómetro COLEMAN mod. Junior IIA.
- Adaptador para celdas de 10x75 mm con abertura de 1 cm<sup>2</sup>.
- Filtro de vidrio de poro grueso.
- Microtitulador de 50 mL MICROTITR KIT.
- Pipeta de gota de 50 mL DYNATECH.
- Placas para aglutinación tipo V.
- Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS.
- Solución salina 1%.
- Solución salina 0.9%.
- Tubos capilares con solución anticoagulante de heparina.
- Solución anticoagulante (heparina).
- Sangre de hámster sensibilizada.
- Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005 al 0.2% en solución salina.
- Tripsina de páncreas porcino SIGMA T-8128.

#### PROCEDIMIENTO:

##### a) Preparación del extracto de la muestra.

\* Se pesa 1 g de muestra finamente molida y desengrasada en 10 mL de solución salina al 1% y se extrae con agitación magnética durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

\* Después se centrifuga el extracto a 1400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble y se filtra el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de poro grueso.

\* Si es necesario se lava el residuo con solución salina al 1% y se afora el filtrado a 10 mL con la misma solución salina.

##### b) Preparación de la sangre.

\* Una vez sangrado los hámster, se coloca la sangre en un matraz pequeño que contenga la solución anticoagulante y se homogeneiza suavemente.

\* Se trasvasa la sangre con anticoagulante a los tubos de centrifuga, se lava y se centrifuga 3 veces con solución salina al 0.9%, a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. La relación sangre-solución salina es de 1:5 aproximadamente.

\* Después del último lavado, el sobrenadante debe ser incoloro para poder medir en el tubo de centrifuga la cantidad del paquete de eritrocitos que se diluyen al 4%. Para esto, se agregan 24 mL de la solución salina por cada 1 mL de glóbulos rojos.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos.

\* Por cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%, se agrega 1 mL de solución de proteasa y se incuba a 37° C/1 h.

\* Centrifugar para eliminar completamente la enzima sobrenadante y hacer 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.

\* Después del último lavado, se resuspende el paquete de eritrocitos para diluirlos al 5%. Para esto, por cada 1 mL de paquete de eritrocitos sensibilizados, se agregan 19 mL de la solución salina.

\* Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

d) Ajuste de la suspensión de eritrocitos.

\* Se toma 1 mL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y se mezcla con 4 mL de solución salina al 0.9%. Se ajusta el espectrofotómetro a 100% de transmitancia usando solución salina como blanco y se lee a 620 nm.

\* La suspensión debe diluirse hasta que la lectura sea de  $25\% \pm 1$  de transmitancia. Al final, la suspensión debe quedar al 4% y dar una lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

e) Preparación de las placas.

\* Usando una pipeta automática de 12 canales, se depositan 50mL de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter.

\* Con un microtitulador se toman 50  $\mu$ L del extracto de la muestra y se coloca en el primer pozo. El microtitulador se gira y se saca del pozo, para introducirlo en el siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto.

\* Con el pipeteador de gota se adicionan 50  $\mu$ L (1 gota) de eritrocitos sensibilizados en c/pozo de las diluciones. Se rota la placa en forma circular y se incuba a 37° C / 1 h.

## LECTURA:

\* Transcurrido el tiempo se coloca la placa (sin agitarla) en el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

\* Se considera positivo aquel pozo que presente una turbidez de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación). Se considera negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritrocitos en el centro.

\* Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

## **2.7 Destoxificación del material.**

Después de obtener la harina desengrasada se procedió a destoxificar el material a probar tratando de obtener un purificado proteico, también llamado concentrado de proteína. Para lograrlo, se utilizan las propiedades de solubilidad de las proteínas que componen al material en función del pH, primero solubilizando ésta fracción y después haciendo una precipitación selectiva [45].

### **2.7.1 Curva de solubilidad de la fracción proteínica.**

#### FUNDAMENTO:

Una proteína con valores de pH superiores o inferiores a su punto isoelectrico, tiene una carga negativa o positiva, y las moléculas de agua interaccionan con éstas cargas contribuyendo a su solubilización. Si se representan en función del pH las variaciones de la solubilidad de la proteína, se obtiene una curva en la que el punto mínimo corresponde al punto isoelectrico (PI).

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Bomba de agua.
- Frascos de vidrio para digestibilidad.

- Potenciómetro CORNING mod. 430.
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025.
- NaCl 0.2N.
- NaOH 2N.
- HCl 2N.

#### PROCEDIMIENTO:

\* Se pesa 1 g de harina y se coloca en un frasco de digestibilidad para agregarle 20 mL de NaCl 0.2N a 0°C.

\* Se ajusta el pH adicionando NaOH 2N o HCl 2N hasta los pH deseados, que en este caso fueron: 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 y 13; los cuales se mantienen en agitación constante durante 30 minutos a 0°C.

\* Después de transcurrido el tiempo, se deja reposar de 30-60 minutos para poder tomar alícuotas de 20-30  $\mu$ L del sobrenadante (según la cantidad de proteína esperada) y se determina el % de proteína soluble en cada muestra por el método de Lowry.

\* Se traza la gráfica de % de proteína soluble vs pH para poder localizar el pH de máxima y mínima solubilidad (punto isoelectrico).

### **2.7.2 Selección del medio de filtración adecuado.**

#### FUNDAMENTO:

Una vez solubilizada la fracción proteínica más abundante es necesario filtrar la solución para eliminar la mayor cantidad de polisacáridos e impurezas, pero sin retener gran cantidad de la proteína.

#### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Papel Whatman #541.
- Papel filtro poro grueso.
- Tela pellón.
- Embudos buchner de filtración.
- Matraces kitasato.
- NaCl 0.2N.

#### PROCEDIMIENTO:

- \* Se pesa 1 g de harina y se coloca en un frasco de digestibilidad para agregarle 20 mL de NaCl 0.2N a 0°C.
- \* Se ajusta el pH al cual se obtuvo un mayor % de proteína soluble y se mantienen en agitación constante durante 30 minutos a 0°C.
- \* Después de transcurrido el tiempo, se toman 3 alícuotas del sobrenadante de 5 mL c/u, y se filtran con ayuda de vacío en papel Whatman #541, papel filtro grueso y tela pellón respectivamente.
- \* De cada filtrado se toman alícuotas de 10-20  $\mu$ L cada una por triplicado (según la cantidad de proteína esperada) y se les determina el % de proteína soluble por el método de Lowry.
- \* Por otro lado, los medios de filtración con los sólidos totales se secan y se pesan, para determinar la cantidad de sólidos retenidos.
- \* Finalmente el medio de filtración más adecuado es aquel que retenga la mayor cantidad de impurezas y permita el paso de la mayor cantidad de proteína posible.

#### **2.7.3 Determinación de proteína soluble por el método de Lowry.**

##### FUNDAMENTO:

Se basa en la reacción del fosfomolibdato en solución alcalina, con los residuos de tirosil de las proteínas; se utiliza  $\text{Cu}^{2+}$  para incrementar la sensibilidad de la reacción. El color azul que se forma es bastante estable y tiene un máximo de absorbancia a 650 nm [65].

##### MATERIAL Y REACTIVOS:

- Agitador mecánico tipo Vortex LAB-LINE mod. 1192.
- Baño regulador de temperatura GRANT mod. LR 22493.
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER mod. 340.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma cat. 2790).
- NaOH 1N.

- Solución estándar de albúmina bovina 360  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma cat. 3425).
- Solución I: disolver 2 g de tartrato de sodio y potasio, 100 g de carbonato de sodio en 500 mL de NaOH 1N y aforar a 1 L con agua destilada.
- Solución II: disolver 2 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 90 mL de agua destilada y aforar a 100 mL con NaOH 1N.
- Solución III: 1 volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu se diluye en 15 volúmenes de agua (se prepara el mismo día de la determinación).

#### PROCEDIMIENTO:

##### a) Curva estándar.

\* La curva de calibración o curva estándar cumple con la ley de Lambert y Beer en el rango de 36-324  $\mu\text{g}$  de proteína, para lo cual se debe realizar lo siguiente:

Tubo	$\mu\text{L}$ solución estándar	$\mu\text{L}$ agua	Concentración $\mu\text{g}$
Blanco	0	1000	0
1	25	975	9
2	50	950	18
3	75	925	27
4	100	900	36
5	200	800	72
6	300	700	108
7	500	500	180
8	700	300	252
9	900	100	324

\* Una vez ajustada la concentración de los tubos y el volumen a 1 mL, se añaden 0.9 mL de la solución I con agitación suave para permitir que se mezclen y se colocan en baño de agua a 50°C por 10 minutos.

\* Después de transcurrido el tiempo, los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente (21°C - 25°C). Ya fríos se les agrega 0.1 mL de la solución II y se conservan a temperatura ambiente por 10 minutos.

\* Después se agregan 3 mL de la solución III, que debe adicionarse de manera rápida y con cierta precisión para asegurar que se mezcle en cuestión de 1 a 2 segundos. Los tubos se colocan en baño de agua a 50°C por 10 minutos.

\* Se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente para poder realizar la lectura de la densidad óptica a 650 nm.

b) Determinación:

\* Se rotulan los tubos y se ajusta el volumen a 1 mL con agua destilada de acuerdo a la alícuota tomada.

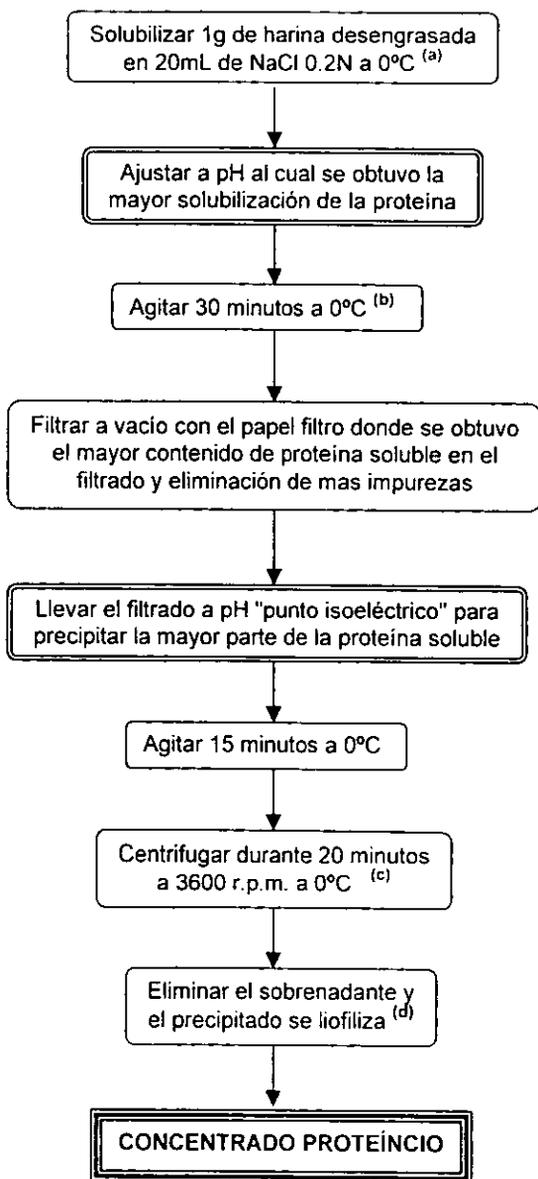
\* Las muestras problema se someten al mismo procedimiento de análisis que los estándares.

\* Realizar la curva patrón, regresión lineal, interpolar los datos y obtener la concentración de proteína soluble presente.

## **2.8 Obtención del concentrado proteínico.**

Una vez que se tienen los resultados de la curva de solubilidad de la fracción proteínica, la elección del medio de filtración adecuado y la determinación de proteína soluble por el método de Lowry, se procede a procesar el material (harina desengrasada de cacahuanano) a una mayor escala.

A continuación se presenta el diagrama de bloques para aislar la fracción proteica.



a) Relación harina/agua.

b) Se utilizó un homogeneizador CAFRAMO mod. RZR1.

c) Se utilizó una centrifuga BECKMAN J2-21.

d) Se utilizó un liofilizador LABCONCO Freeze Drying 4.5.

## **2.9 Evaluación de toxicidad aguda.**

Contando con la harina integral y la harina desengrasada de cacahuanano, se realiza el bioensayo de toxicidad aguda utilizando ratones machos y administrándoles oralmente dosis relativamente altas del material a probar.

### **FUNDAMENTO:**

Los estudios de toxicidad aguda implican una sola administración de la sustancia química y observar su efecto por un periodo de 24 a 72 horas. Se fundamenta en que cuando una sustancia es tóxica, después de la penetración al organismo a dosis relativamente elevadas, provoca trastornos de una o varias funciones que pueden llegar hasta la muerte.

### **MATERIAL Y REACTIVOS:**

- Ratones machos cepa CFW de 21-24 g de peso.
- Jaulas para ratones de acrílico con comederos y bebederos.
- Jeringas hipodérmicas de 1.0 mL.
- Agujas especiales para la administración oral.
- Balanza granataria.
- Papel especial "logaritmico-probabilidad".
- Solución salina 0.9% (vehículo).
- Harina integral, harina desengrasada y concentrado proteínico de cacahuanano.
- Harina integral y harina desengrasada de soya.

### **PROCEDIMIENTO:**

a) Distribución de los animales.

- Contando con la dotación de animales, se les suprime el alimento la noche anterior al bioensayo y solamente se les proporciona agua "ad libitum", ya que la administración se realiza con 12 horas de ayuno.
- Los ratones son pesados y marcados, para después repartirlos en los diferentes lotes con un mínimo de 5 ratones c/u, de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (Anexo I).

b) Preparación de la muestra.

- Es conveniente que el material de prueba se encuentre solubilizado para lograr una disolución y facilitar su administración. Se hace uso de un vehículo que no interfiera en la prueba que en este caso se utilizó solución salina al 0.9%.
- Por lo general los tóxicos deben administrarse por la misma vía a la que los seres humanos están expuestos, la ruta oral es la más común y es la que se utilizó en bioensayo.

c) Dosificación.

- Se debe administrar un volumen suficientemente "grande" para medirlo con facilidad, pero también debe ser lo bastante "pequeño" para no producir un traumatismo al animal.
- El volumen máximo permitido en ratones por vía oral es de 1mL, por lo tanto si definimos 1D como la dosificación de 0.01 mL/g de peso corporal, podremos administrar hasta una dosificación de 5D ( $5 \times 0.01 \times 20 \text{ g p.c.} = 1\text{mL}$ ).

d) Observaciones.

- Una vez administrado el material a probar se restituye el alimento y se observa el comportamiento de los animales durante las primeras 10 horas, a las 24, 48 y 72 horas.
- Durante el bioensayo se anota el grado de mortalidad de cada lote y se evalúan las características clínicas de lordosis, xifosis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis e hipotermia (Anexo II).

\* *Lordosis*: deformación de la columna vertebral, caracterizada por un movimiento ondulante del lomo.

\* *Xifosis*: curvatura dorsal de la columna vertebral caracterizado por un movimiento ondulante en la cadera.

\* *Ataxia*: irregularidad, perturbación de las funciones del sistema nervioso, trastornos de la coordinación de los movimientos.

\* *Piloerección*: se caracteriza por la erección del pelo.

\* *Erección caudal*: se caracteriza por la erección (rigidez) de la cola.

- \* *Agresividad*: hostilidad, carácter agresivo.
- \* *Aletargamiento*: disminución de la actividad del animal.
- \* *Excitación*: actividad anormal del organismo.
- \* *Disnea*: dificultad de respirar.
- \* *Cianosis*: coloración azul violácea de la piel, principalmente acentuada en las extremidades.
- \* *Hipotermia*: disminución de la temperatura normal.

## REALIZACIÓN DEL ENSAYO:

### Primera parte.

- > La primera parte consistió en la administración de una dosis de 15000 mg/kg p.c. de los materiales a probar (harina integral, desengrasada y concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano), la cual se encuentra entre los límites para que una sustancia se considere como prácticamente no tóxica y relativamente inocua; tomando como referencia y control la harina integral y desengrasada de soya.

Preparados de cacahuanano	Control	Dosis
Harina integral	Harina integral de soya	15000 mg/kg p.c.
Harina desengrasada	Harina desengrasada de soya	15000 mg/kg p.c.
Concentrado proteínico	Harina desengrasada de soya	15000 mg/kg p.c.

- > La dosificación seleccionada fue de 4D (0.04 mL / 1 g p.c.) para que el volumen administrado no fuera mayor de 1 mL, por lo que se preparó una suspensión de los materiales a probar con la siguiente concentración.

$$\frac{15000 \text{ mg sustancia}}{1 \text{ kg p.c. animal}} = \frac{15000 \text{ mg sustancia}}{1000 \text{ g p.c. animal}} = \frac{15 \text{ mg sustancia}}{1 \text{ g p.c. animal}}$$

$$\frac{15 \text{ mg sustancia}}{1 \text{ g p.c. animal}} \times \frac{1 \text{ g p.c. animal}}{0.04 \text{ mL}} = \frac{375 \text{ mg sustancia}}{\text{mL}}$$

γ Los mL administrados a los animales se calcula de la siguiente manera.

$$\text{mL administrados} = \frac{0.04 \text{ mL}}{1 \text{ g p.c.}} \times \text{peso animal (g)}$$

### Segunda parte.

- γ Después de administrar la dosis de 15000 mg/kg p.c., se observó 100% de mortalidad en los animales (durante las 72 horas) en la harina integral y desengrasada de cacahuanano, por lo que se procedió a determinar su DL<sub>50</sub>.
- γ Las DL<sub>50</sub> fueron determinadas de acuerdo a las siguientes dosis, siguiendo el mismo procedimiento usado en la primera parte del bioensayo. Esto se realizó para poder encontrar un rango de administración que nos pudiera dar como mínimo 3 puntos para poder determinar el rango entre el 0% y el 100% de mortalidad.

<b>Preparado de cacahuanano</b>	<b>Lote</b>	<b>Dosis</b>
Harina Integral	Lote 1	750 mg/kg p.c.
	Lote 2	1500 mg/kg p.c.
	Lote 3	5000 mg/kg p.c.
	Lote 4	6000 mg/kg p.c.
	Lote 5	8000 mg/kg p.c.
	Lote 6	10000 mg/kg p.c.
	Lote 7	15000 mg/kg p.c.
Harina Desengrasada	Lote 1	750 mg/kg p.c.
	Lote 2	1500 mg/kg p.c.
	Lote 3	5000 mg/kg p.c.
	Lote 4	7500 mg/kg p.c.
	Lote 5	10000 mg/kg p.c.
	Lote 6	15000 mg/kg p.c.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Parámetros físicos de la semilla.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros físicos determinados (diámetro de la semilla, peso hectolítrico, número de semillas en 1 hL). Se observa homogeneidad en los lotes adquiridos para este estudio y además, no mostraron diferencia estadística significativa en cuanto al peso hectolítrico, con los lotes de la zona costera del estado de Guerrero, pero si las hay con los lotes procedentes de Pochutla, Oaxaca.

De acuerdo a los resultados obtenidos de ésta evaluación y comparándolos con los demás lotes, podemos decir la semilla con la cual se trabajó se trata de la misma variedad al lote procedente de Guerrero.

**TABLA 1.** Parámetros físicos hechos a la semilla de cacahuanano.

Lote	Diámetro de la semilla (cm)	Peso hectolítrico (g/100 mL)	Número de semillas en 100 mL
Estudio actual	1.11 ± 0.08	71.05 ± 0.52 <sup>a</sup>	438.75 ± 27.06 <sup>a</sup>
Oaxaca	--	68.53 ± 1.28 <sup>b</sup>	315.66 ± 19.86 <sup>b</sup>
Guerrero	--	71.6 ± 0.42 <sup>a</sup>	539.0 ± 1.41 <sup>c</sup>

† Letras iguales en columnas indican que no hay diferencia estadística significativa.

‡ Letras diferentes en columnas indican que existe diferencia estadística significativa.

## 2. Parámetros bromatológicos.

Como se puede observar en la Tabla 2, los resultados del análisis proximal confirman que la semilla de cacahuanano tiene un alto contenido de grasa cruda y de proteína cruda reportado en la literatura [5, 66], siendo de 21% y 44% respectivamente. Esto nos permite considerar a ésta semilla como una auténtica proteaginoso, superando inclusive a la soya [67] y además también es una buena fuente de grasa; sin embargo, también tiene un alto contenido de fibra.

**TABLA 2.** Análisis proximal de la semilla de cacahuanano (g/ 100 g muestra).

Parámetro <sup>(a)</sup>	Harina Integral de Cacahuanano	Harina Integral de Soya <sup>(b)</sup>
Humedad	6.10 ± 0.03	8.00
Proteína cruda (N x 6.25)	44.27 ± 0.52	40.00
Grasa cruda	21.11 ± 0.25	18.00
Cenizas	3.91 ± 0.01	4.60
Fibra cruda	8.47 ± 0.75	3.50
Carbohidratos (por diferencia)	16.14	25.90

a) Valor promedio de la determinación por triplicado.

b) Leguminosa incluida con fines comparativos.

En la Tabla 3 se presenta el análisis bromatológico de la harina integral, la harina desengrasada y del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano. Al extraer la grasa, la concentración de proteína cruda se incrementa hasta un 59%, mientras que el purificado proteínico tiene un 77% de proteína cruda; esto los hace una excelente fuente de proteína vegetal.

**TABLA 3.** Análisis proximal de los diferentes preparados (g/ 100g muestra).

Parámetro <sup>(a)</sup>	Harina integral	Harina desengrasada	Concentrado proteínico
Humedad	6.10 ± 0.03	6.59 ± 0.38	4.61 ± 0.01
Cenizas	3.91 ± 0.01	5.04 ± 0.05	8.19 ± 0.01
Grasa cruda	21.11 ± 0.25	0.46 ± 0.005	0.92 ± 0.10
Proteína cruda (N x 6.25)	<b>44.27 ± 0.52</b>	<b>59.68 ± 0.23</b>	<b>77.51 ± 0.46</b>
Fibra cruda	8.47 ± 0.75	8.44 ± 0.38	1.31 ± 0.47
Carbohidratos (por diferencia)	16.14	19.79	7.46

a) Valor promedio de la determinación por triplicado.

En la Tabla 4 se presenta el resultado de la determinación del nitrógeno proteínico en los diferentes preparados; este parámetro debe tomarse en cuenta, ya que una proporción importante de la proteína cruda está constituida por compuestos nitrogenados no proteicos que pueden enmascarar el verdadero valor nutritivo de las leguminosas, entre ellas el cacahuanano [66, 68].

**TABLA 4.** Nitrógeno total (NT), Nitrógeno proteínico (NP) y Nitrógeno no proteínico (NNP) de los diferentes preparados.

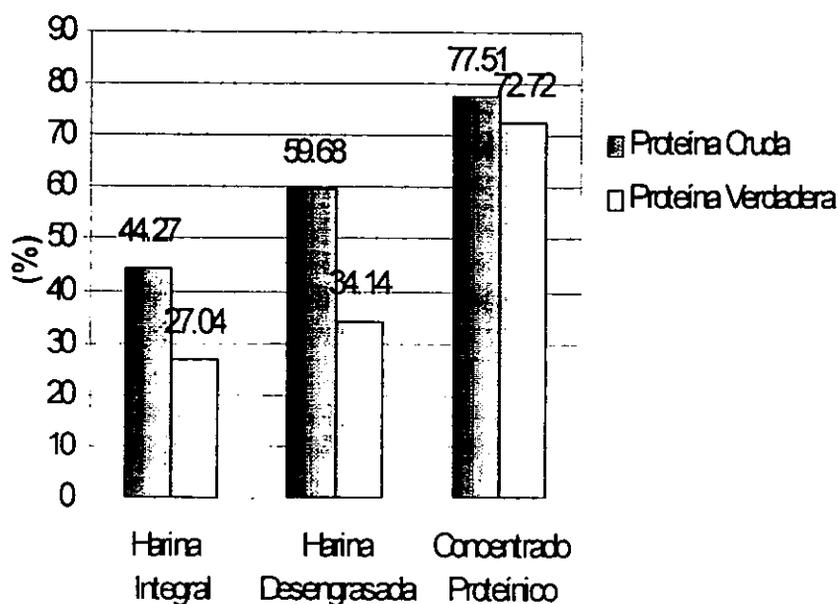
Determinación <sup>(a)</sup>	Harina integral	Harina desengrasada	Concentrado proteínico
NT	7.08	9.55	12.40
NP	4.33	5.46	11.54
NNP <sup>(b)</sup>	38.92	42.79	6.17

a) Valor promedio de la determinación por triplicado expresado en %.

b)  $NNP = [(NT-NP)/NT] \times 100$

Como se puede observar en la Gráfica 1, existe un alto contenido de nitrógeno no proteínico en la semilla de cacahuanano que reduce significativamente la concentración de proteína original; por consiguiente, en realidad se está partiendo de un material con un menor contenido de proteína del reportado inicialmente. El concentrado proteínico como era de esperar, resultó con el mayor porcentaje de proteína verdadera.

**GRÁFICA 1.** Contenido de proteína verdadera y proteína cruda de los diferentes preparados (g/100 g muestra).



### 3. Valor energético de la semilla de cacahuanano.

La semilla de ésta leguminosa tiene un alto contenido de proteína y grasa, lo que contribuye a su elevado valor energético, que fue de 22.63 KJ/g . En la tabla 5 se presentan los valores energéticos de diversos granos usados como alimentos [67] y se hace la comparación con el cacahuanano; como se puede ver es un grano de alto valor energético que lo hace importante para su posible uso en nutrición.

**TABLA 5.** Valor energético del cacahuanano, de otras leguminosas y cereales.

Semilla	Nombre científico	Densidad calórica (KJ / g)
Cacahuanano	<i>Gliricidia sepium</i>	22.63
Arroz	<i>Oryza sativa L.</i>	15.38
Maíz amarillo	<i>Zea mays L.</i>	14.36
Grano de trigo	<i>Triticum sativum Lam</i>	15.48
Cacahuete crudo	<i>Arachys hypogacea L.</i>	19.60
Frijol negro	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	13.39
Semilla de lenteja	<i>Ervum lens L.</i>	13.76
Semilla de soya	<i>Glycine max</i>	16.52

El término de EG no tiene un valor práctico desde el punto de vista alimenticio debido a que la cantidad de energía que obtiene el cuerpo del alimento es menor que la energía producida cuando se quema el alimento en la bomba calorimétrica. Por lo anterior, se determinó la energía digerible (ED) y la energía metabolizable (EM), que son término de mayor aplicación ya que proporcionan la energía biodisponible del alimento [53]; los valores obtenidos fueron 19.87 KJ/g para la ED y 17.35 KJ/g para la EM, la cual todavía sigue siendo de consideración.

#### 4. Toxicología analítica.

En la Tabla 6 se muestra el resultado de los factores tóxicos y antinutricionales presentes en la semilla de cacahuanano. Para el caso de los *inhibidores de tripsina* se considera un contenido significativo cuando se obtiene un valor  $>10$  UTI/mg de muestra y para las *lectinas* un título  $\geq 10$  también se considera un contenido alto de este factor antinutricional [64]; el nivel de inhibidores de tripsina y lectinas en la semilla, en ningún momento rebasan los valores antes mencionados.

El contenido de *ácido tánico* en la semilla de cacahuanano es de 1.34%, muy similar al contenido de dicha sustancia en el frijol común de color negro con 1.26% y colorado con 1.42% [70]. Por otro lado, la dosis diaria admisible (DDA) para el ácido tánico es de 500 mg/kg p.c./día [13], esto implica que un hombre adulto entre 18-65 años con un peso de 68 kg, puede ingerir hasta 3.4 g/día, sin que se presenten efectos adversos en la salud; calculando la cantidad de semilla cruda que debe ingerir la persona para producir un efecto tóxico en ella, se tiene que hay que consumir más de 2 kg para sobrepasar la DDA, y por consiguiente no representa riesgo alguno.

En lo que respecta al *ácido fítico*, los alimentos con un contenido de 400 mg/100g son considerados alimentos desmineralizantes [64], por lo que la semilla de cacahuanano se encuentra dentro de ésta clasificación al contener 1790 mg/100g. Dicha semilla supera en contenido de ácido fítico a otras leguminosas como las alubias, las lentejas y la soya; con un contenido de 269, 295 y 402 mg/100g de semilla respectivamente [11].

Para el caso de la **canavanina**, no se ha establecido el nivel máximo permitido; sin embargo, este aminoácido no proteínico se encuentra presente en cantidad significativa (10%) en la semilla, siendo superior inclusive al contenido en la semilla de "Jack bean" (*Canavalia ensiformis*) que es la materia prima de donde se aísla este aminoácido, donde la concentración varía entre 2.02 y 4.86 % [69].

**TABLA 6.** Toxicología analítica de la semilla y concentrado proteínico de cacahuanano.

Factor <sup>(a)</sup>	Tipo	Semilla de cacahuanano	Concentrado proteínico
Canavanina (g/100g de muestra)	Tóxico	10.33	1.09
Nitratos (expresado como % de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Tóxico	0.12	0.03
Lectinas (Título de hemaglutinación)	Enterotoxina	2	Negativo
Inhibidores de tripsina (UTI/mg muestra)	Antinutricional	1.63	1.85
Taninos (expresado como % de ácido tánico)	Antinutricional	1.34	0.99
Fitatos (expresado como % de ácido fítico)	Antinutricional	1.79	1.09

a) Valor promedio de la determinación por triplicado.

Para los **nitratos** la DDA es de 3.65 mg/kg p.c./día [13], por lo que un adulto de 68 kg de peso, puede ingerir 248.2 mg de nitratos diarios, y tendría que ingerir arriba de 206 g de semilla de cacahuanano crudo para rebasar la DDA de dicha sustancia para producir un efecto tóxico. En el concentrado proteínico se eliminó casi totalmente la presencia de nitratos después del proceso de destoxificación.

Después de la destoxificación, no solamente se logró disminuir significativamente la concentración de nitratos en el concentrado proteínico, sino también el contenido de canavanina y ácido tánico; mientras que los inhibidores de tripsina y las lectinas permanecieron con niveles similares a los de la semilla de cacahuanano, los cuales siguen siendo bajos. Sin embargo, no se logró eliminar el ácido fítico en el concentrado, cuyo contenido fue de 1090 mg/100g y que todavía es un valor alto; por lo que se recomienda hacer algunas mejoras en el proceso de destoxificación de la semilla.

En el preparado proteínico purificado, se trató en particular de eliminar la alta concentración de canavanina presente en la semilla; la determinación de este aminoácido por el método colorimétrico [59, 60] arrojó un valor de 1%, que todavía se puede considerar de riesgo si tomamos en cuenta que en un estudio anterior el sulfato de canavanina por vía intraperitoneal en ratones tiene una  $DL_{50}$  de 5550 mg/kg p.c. [6]. Por esta razón, se procedió a confirmar el nivel de este aminoácido en los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano, mediante la determinación por cromatografía de intercambio iónico [68]; ya que éste método es más confiable y hay menor posibilidad de sobrestimar dicho aminoácido. Los valores de la determinación por ambos métodos se muestran en la Tabla 7, donde se puede observar que en el concentrado proteínico la canavanina está ausente de acuerdo al análisis cromatográfico.

**TABALA 7.** Determinación de canavanina en los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano.

Determinación	Harina integral	Harina desengrasada	Concentrado proteínico
Método colorimétrico	10.33 %	13.10 %	1.09 %
Método cromatográfico	9.90 %	12.56 %	-- (†)

† No detectable (límite de detección 0.025  $\mu$ M).

## 5. Digestibilidad *in vitro*.

En la Tabla 8 se encuentran los valores de la digestibilidad *in vitro* de la proteína de la harina integral, harina desengrasada y aislado proteínico de la semilla de cacahuanano. El concentrado proteínico presentó una buena digestibilidad *in vitro*, similar a la soya [44]; con 83% y 86% respectivamente.

**TABLA 8.** Digestibilidad *in vitro* de la proteína de los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano.

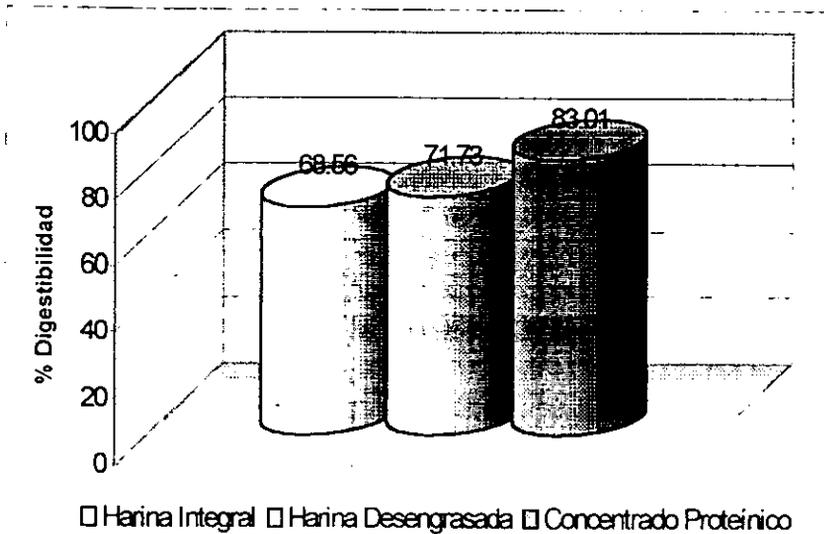
Preparado	% de digestibilidad †
Harina Integral	68.56 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
Harina Desengrasada	71.73 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
Concentrado Proteínico	83.01 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>

† Valor promedio de la determinación por duplicado.

‡ Letras diferentes en columnas indican que existe diferencia estadística significativa.

En la Gráfica 2 se muestra como el proceso de purificación aumenta considerablemente la digestibilidad *in vitro* de la proteína aislada, ya que en un principio la semilla de cacahuanano tiene un mayor contenido de factores antinutricionales y fibra, que disminuyen la biodisponibilidad de la fracción proteica y podrían afectar su digestión; de ahí el alto aprovechamiento (biodisponibilidad) de la proteína del concentrado proteínico.

**GRÁFICA 2.** Digestibilidad *in vitro* de los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano.



## 6. Composición de aminoácidos y calificación química.

En la Tabla 9 se presenta la composición de aminoácidos (a.a.) de la harina desengrasada y del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano, al igual que las necesidades de a.a. requeridas para lactantes y preescolares de 2-5 años de edad, sugeridas por la FAO/OMS/ONU (1985).

**TABLA 9.** Composición de a.a. de la harina desengrasada y concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano (g a.a. / 16 g N).

Aminoácido <sup>(a)</sup>	Harina Desengrasada	Concentrado Proteínico	Necesidades Lactantes	Necesidades Preescolares
Acido aspártico	5.50	8.87	-	-
Ácido glutámico	11.49	13.79	-	-
Arginina	10.38	12.09	-	-
Fenilalanina+Tirosina <sup>(b)</sup>	7.51	7.08	7.2	6.3
Glicina / Alanina <sup>(c)</sup>	6.86	6.33	-	-
Histidina	3.20	3.09	2.6	1.9
Isoleucina	4.61	3.57	4.6	2.8
Leucina	6.85	7.78	9.3	6.6
Lisina	5.54	4.33	6.6	5.8
Metionina+Cisteína <sup>(d)</sup>	2.86	4.07	4.2	2.5
Prolina	5.10	4.91	-	-
Serina	5.38	4.03	-	-
Treonina	5.31	2.85	4.3	3.4
Triptófano <sup>(e)</sup>	0.65	0.57	1.7	1.1
Valina	3.78	5.03	5.5	3.5

a) Valor promedio de la determinación por duplicado.

b) Total de aromáticos.

c) Cuantificación conjunta.

d) Total de azufrados.

e) Determinado espectrofotométricamente previa hidrólisis alcalina.

Contando con la composición química de a.a. indispensables, se calculó la calificación química (**CQ**) de la proteína de la harina desengrasada y concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano, de acuerdo al patrón de la FAO/OMS/ONU (1985) donde se hace una distinción hacia que grupo de la población se dirige. Se encontró que para los lactantes el triptófano es el limitante, al igual que para los preescolares de 2-5 años de edad (Tabla 10).

**TABLA 10.** CQ de la proteína de la harina desengrasada y concentrado proteínico de cacahuanano.

Aminoácido	Harina desengrasada		Concentrado proteínico	
	Lactantes	Preescolares	Lactantes	Preescolares
Histidina	> 100	> 100	> 100	> 100
Isoleucina	> 100	> 100	93.00	> 100
Leucina	84.06	87.30	> 100	> 100
Lisina	95.81	80.35	78.66	65.96
Metionina+Cisteína <sup>(a)</sup>	77.65	96.20	> 100	> 100
Fenilalanina+Tirosina <sup>(b)</sup>	> 100	> 100	> 100	99.30
Treonina	> 100	> 100	79.44	74.05
<b>Triptófano</b>	<b>43.63</b>	<b>49.69</b>	<b>40.10</b>	<b>45.67</b>
Valina	78.41	90.79	> 100	> 100

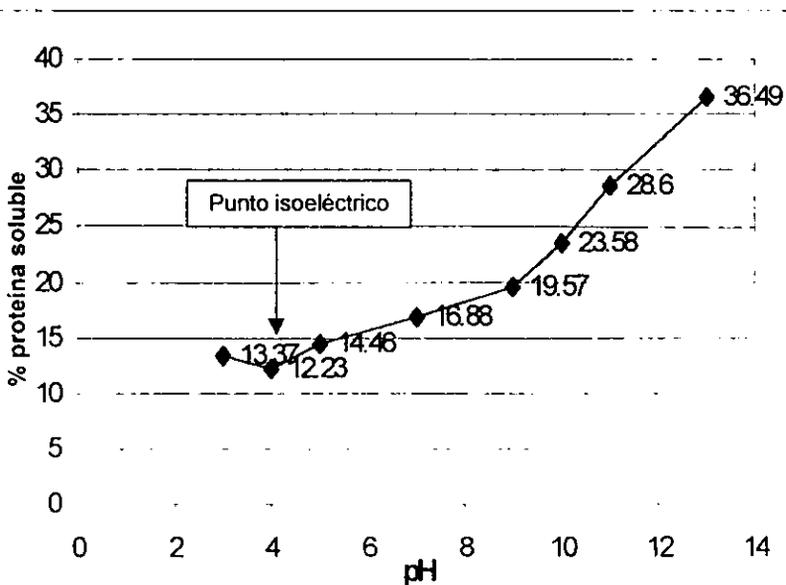
a) Total de azufrados.

b) Total de aromáticos.

## 7. Destoxificación del material.

En la Gráfica 3 se muestra la "curva de solubilidad" de la proteína de la semilla de cacahuanano, donde se aprecian los valores de solubilidad de acuerdo con las condiciones de pH del medio. Este perfil de solubilidad en función del pH nos indica que a pH 13 se obtiene la mayor cantidad de proteína soluble y a pH 4 se obtiene la menor cantidad de proteína soluble, que es el "punto isoeléctrico". Estas son las condiciones óptimas para aislar y purificar la fracción proteínica más abundante a partir de la harina desengrasada de cacahuanano.

**GRÁFICA 3.** Curva de solubilidad de la fracción proteínica de la semilla de cacahuanano.



En Tabla 11 se presenta las pruebas para seleccionar el medio de filtración de la proteína solubilizada; se probaron tres diferentes medios de filtración a los cuales se les determinó el contenido de proteína soluble en el filtrado y la cantidad de residuo que quedó atrapado en el medio de filtración.

**TABLA 11.** Medios de filtración para la proteína soluble del cacahuanano.

<b>Medio de filtrado</b>	<b>mg proteína / ml filtrado</b>	<b>g de impurezas en filtro</b>
Tela pellón	25.78	0.1495
Papel filtro poro grueso	24.15	0.1118
Papel Whatman #541	19.79	0.1311

Del cuadro anterior se observa que el medio de filtración más adecuado para el aislamiento de la fracción proteínica es la tela pellón, porque retienen una mayor cantidad de impurezas que los otros dos medios de filtración y porque permite el paso de mayor cantidad de proteína soluble.

Contando con los resultados de la curva de solubilidad de la fracción proteínica, la elección del medio de filtración adecuado, se procedió a procesar la harina desengrasada de cacahuanano, trabajando con 200 g de material, obteniéndose rendimientos de 30% a 35%.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## **8. Toxicidad aguda.**

Esta prueba se realizó con la finalidad de averiguar si los diferentes preparados de la semilla de cacahuanano (harina integral, harina desengrasada, y concentrado proteínico), poseían acción tóxica aguda al administrarse en ratones. El estudio se dividió en dos partes; primero una prueba que consistió en la administración de una dosis de 15000 mg/kg p.c., que es la dosis máxima para que una sustancia sea considerada prácticamente no tóxica; y la segunda parte del estudio sirvió para determinar la  $DL_{50}$  de los preparados, si después de la administración de 15000 mg/kg p.c. existía mortalidad en los animales de experimentación.

### **\* Los resultados de la primera parte fueron los siguientes:**

En el bioensayo de toxicidad aguda con la harina integral y la harina desengrasada, se observó la muerte de todos los animales dentro de las primeras 24 horas con una dosis oral de 15000 mg/kg p.c., lo que nos indica que ambos materiales no se pueden proponer como una fuente alternativa o complementaria en la alimentación [40].

También se realizó el estudio de toxicidad aguda con el concentrado proteínico, no observándose ningún signo de toxicidad en los animales hasta una dosis oral de 15000 mg/kg p.c., por lo que resulta un material relativamente inocuo a corto plazo [40] y se debe continuar con estudio para demostrar su inocuidad a mediano y largo plazo.

\* Los resultados de la segunda parte se muestran en las Tablas 12 y 13:

A los resultados obtenidos se les efectuó un análisis estadístico con la prueba de  $(CHI)^2$ , se trazó la gráfica de dosis-efecto (dosis en mg/kg p.c. contra % de mortalidad) sobre el papel especial log-probit, los valores de 0 y 100% de mortalidad fueron corregidos por las fórmulas propuestas por Miller y Tainter; y de la gráfica correspondiente se calculó el valor de la  $DL_{50}$  por interpolación. En la prueba estadística, la  $(CHI)^2$  experimental  $<$   $(CHI)^2$  crítica, por lo que hay homogeneidad en los datos y por lo tanto la línea provisional se considera adecuada y definitiva.

La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) para la harina integral de cacahuanano fue de 8200 mg/kg p.c. y para la harina desengrasada de cacahuanano la  $DL_{50}$  fue de 6600 mg/kg p.c., indicando mayor toxicidad con respecto a la semilla completa. Ambos preparados se pueden considerar como prácticamente no tóxicos a corto plazo [40].

**TABLA 12.** Toxicidad aguda por vía oral de la harina integral de la semilla de cacahuanano.

Dosis (mg/kg p.c.)	Relación Muertos/Tratados	% Respuesta observado (corregido)	% Respuesta esperado (gráfica)
750	0/5	--	--
1500	0/5	--	--
5000	0/7	0.0 (3.57)	3.0
6000	1/5	20.0	14.0
8000	3/5	60.0	44.0
10000	6/8	75.0	70.0
15000	5/5	100.0 (95.0)	96.5

**TABLA 13.** Toxicidad aguda por vía oral de la harina desengrasada de la semilla de cacahuanano.

Dosis (mg/kg p.c.)	Relación Muertos/Tratados	% Respuesta observado (corregido)	% Respuesta esperado (gráfica)
750	0/5	--	--
1500	0/5	0.0 (5.0)	1.9
5000	1/5	20.0	34.0
75000	2/5	40.0	58.0
10000	5/6	83.33	76.0
15000	5/5	100.0 (95.0)	90.0

De acuerdo a estudios anteriores la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) en ratones vía intraperitoneal para el sulfato de canavanina es de 5550 mg/kg p.c., por lo que se encuentra entre los límites de ligeramente tóxico y prácticamente no tóxico; mientras que para un extracto metanólico de ésta semilla su  $DL_{50}$  es de 1200 mg/kg p.c., indicando que es un material altamente tóxico [6]. En otra investigación realizada en ratas con carcinoma de colon se determinó una  $DL_{50}$  de 6770 mg/kg p.c. [38].

Por lo anterior, la fuerte toxicidad de la semilla de cacahuanano no se debe exclusivamente a la presencia de canavanina, sino que ésta toxicidad es causada por la presencia de otros factores que se han encontrado en diferentes partes de la planta (hojas, corteza, tronco) y pudieran estar presentes también en la semilla; como pudieran ser la cumarina y algunos derivados próximos encontrados en cantidades significativas en las hojas [3, 28], los cuales tienen la acción de retardar el tiempo de coagulación de la sangre, debilitando las paredes capilares (haciendo que se rompan)

provocando hemorragias fatales, apareciendo una debilidad rápidamente progresiva y dificultad respiratoria [71, 72]. El cuadro clínico descrito anteriormente se presentó en la mayoría de los animales tratados con harina integral y desengrasada, donde las características clínicas más frecuentes fueron disnea, ataxia, aletargamiento y hemorragias frecuentes en el tracto gastrointestinal, por lo que se recomienda un estudio para confirmar la presencia de compuestos cumarínicos en la semilla.

## VI. CONCLUSIONES

- Se confirma que la semilla de cacahuanano tiene un alto contenido de proteína y grasa, por lo que se le puede considerar como una fuente potencial de proteína, sin embargo dicho material presenta un contenido significativo de nitrógeno no proteínico.
- La proteína de la harina desengrasada y del concentrado proteínico de la semilla de cacahuanano son deficientes en el aminoácido triptófano para lactantes y preescolares.
- El concentrado proteínico presentó una buena digestibilidad *in vitro*, lo que posiblemente permita un alto aprovechamiento de la proteína aislada.
- La semilla de cacahuanano presentó un contenido sumamente alto del aminoácido no proteínico canavanina, lo que la hace sumamente interesante, ya que algunos investigadores le han asociado a este aminoácido actividad citotóxica hacia células cancerosas.
- La harina integral y la harina desengrasada de la semilla de cacahuanano mostraron toxicidad a corto plazo, con una DL<sub>50</sub> de 8200 mg/kg p.c. y 6600 mg/kg p.c., respectivamente.

- El proceso de destoxificación de la semilla de cacahuanano elimina completamente la canavanina y reduce significativamente el contenido de los demás tóxicos determinados, con excepción de los fitatos.
  
- Se obtuvo un purificado de proteína (concentrado proteínico), el cual resultó ser relativamente inocuo en el estudio de toxicidad aguda, lo que permite que se continúe su estudio para considerarla como una fuente potencial de proteína alimentaria.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural 1996. INNSZ, México, D.F., pág. 51-58, 1996.
2. Hawthorn, J. Fundamentos de ciencia de los alimentos. Acribia, Zaragoza, pág. 141-143, 1983.
3. Ramamoorthy, M. and Paliwal, K. Allelopathic compounds in leaves of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. and its effect on *Sorghum vulgare* L. *Journal of Chemical Ecology*, 19(8):1691-1701, 1993.
4. Alán, E. y Barrantes, U. Efecto alelopático del madero negro (*Gliricidia sepium*) en la germinación y crecimiento inicial de algunas malezas tropicales. *Turrialba*, 38(4):271-278, 1988.
5. Sotelo, A., Lucas, B., Blanc, F. and Giral, F. Chemical composition of seeds of *Gliricidia sepium*. *Nutrition Reports International*, 34(3):315-322, 1986.
6. Ramírez, S.M.G. Aislamiento de canavanina presente en cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 11-18, 1985.
7. Nochebuena, G. y O'Donovan, B.P. Valor nutritivo del forraje rico en proteínas de *Gliricidia sepium*. *Revista Mundial de Zootecnia*, 57(Ene-Mar):48-49, 1986.
8. McIvor, J.G. and Bray, R.A. (Editores) *Genetic Resources of Forage Plants*, CSIRO, Melbourne, pág. 17-37, 1983.
9. Sotelo, A. Leguminosas silvestres, reserva de proteínas para la alimentación del futuro. *Información Científica y Tecnológica*, 3(54): 28-32, 1981.
10. Belitz, H.D. and Grosch, W. *Food chemistry*. Springer Verlag, Berlín, pág. 536-545, 1987.
11. Partearroyo, M.A., Fernández-Quintela, A. y Cid, C. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal y su significado en la alimentación humana. *Alimentaria*, 267(Nov):115-120, 1995.
12. Liener, I.E. *Toxics constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, New York, pág. 1-23, 1980.

13. Hidalgo, A.G. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar Nitratos y Taninos en muestras vegetales. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 4-18,29,115-119, 1999.
14. Farré, R.R. y Frígola, C.A. Nitratos: aspectos bromatológicos, toxicológicos y analíticos. *Alimentaria*, 179(Ene-Feb):15-21, 1987.
15. Mori, K. (Editor). *Comprehensive natural products chemistry*. Vol. 8, Pergamon, Oxford, U.K., pág. 146,147,346,347, 1999.
16. Chung, K-T., Wei, Ch-I. and Johnson, M.G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, 9(1998):168-175, 1998.
17. Lindner, E. *Toxicología de los alimentos*. Acribia, 2ª edic., Zaragoza, pág. 82-84, 1995.
18. Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina I: Características y significado en la alimentación humana. *Alimentaria*, 279(Ene-Feb):27-31, 1997.
19. Martínez, B. y Rincón, F. Inhibidores de tripsina II: Efectos del procesado y métodos de determinación. *Alimentaria*, 279(Ene-Feb):33-38, 1997.
20. Valle, V.P. *Toxicología de alimentos*. OPS - OMS, 2ª edic., Edo. de Mex., pág. 6,17, 1991.
21. Martínez, C. Ros, G., Periago, M.J., López, G., Ortuño, J. and Rincón, F. Phytic acid in human nutrition. *Food Science and Technology International*, 2(4):201-209, 1996.
22. Sinha, S.K. *Las leguminosas alimenticias*. Vol. 3, FAO: Estado de producción y protección vegetal, Roma, pág. 1-8, 1978.
23. Del Amor, R.S. y Mendieta, R.M. *Plantas medicinales del estado de Yucatán*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB), Xalapa, Ver., pág. 158, 1981.
24. Martínez, M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., pág. 193,1122, 1987.
25. Little, E.L. and Wadsworth, F.H. *Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands*. United States Department of Agriculture, Washington, pág. 196,197, 1964.

26. Chadhokar, A.P. *Gliricidia maculata* una leguminosa forrajera promettedora. *Revista Mundial de Zootecnia*, 44(Oct-Dic):36-43, 1982.
27. Kojima, K., Zhu, X-B. and Ogihara, Y. Saponins from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, 49(5):885-888, 1998.
28. Griffiths, L.A. On the co-occurrence of coumarin, o-coumarinic acid, and melilotic acid in *Gliricidia sepium* and *Dipleryx odorata*. *Journal of Experimental Botany*, 13(38):169-173, 1962.
29. Herath, H.M.T.B., Dassanayake, R.S., Priyadarshani, A.M.A., De Silva, S., Wannigama, G.P. and Jamie, J. Isoflavonoids and pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, 47(1):117-119, 1997.
30. Rastrelli, L., Cáceres, A., De Simone, F. and Aquino, R. Studies on the constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and roots: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4):1537-1540, 1999.
31. Galvez, R.J. Análisis fitoquímico y toxicológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 15-18, 1999.
32. Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobón, E., Samayoa, B.E., Jauregui, E., Peralta, E. and Carrillo, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(2):85-88, 1995.
33. Berger, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter, C.M. and Kubelka, W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(2):107-115, 1998.
34. Cáceres, A., López, B., Juárez, X., Del Aguila, J. and García, S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections: 2 Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 40(3):207-213, 1993.
35. Miersh, J., Grancharov, K., Pajpanova, T., Tabakova, S., Stoev, S., Krauss, G-J. and Golovinsky, E. Synthesis and biological activity of canavanine hydrazide derivatives. *Amino Acids*, 18(1):41-59, 2000.
36. Rosenthal, A.G., Dahlman, L.D., Crooks, P.A., Na Phuket, S. and Trifonov, L.S. Insecticidal properties of some derivatives of L-canavanine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(10):2728-2734, 1995.

37. Swaffar, D.S., Ang, C.Y., Desai, P.B. and Rosenthal, G.A. Inhibition of the growth of human pancreatic cancer cells by the arginine antimetabolite L-canavanine. *Cancer Research*, 54(23):6045-6048, 1994.
38. Thomas, D.A., Rosenthal, G.A., Gold, D.V. and Dickey, K. Growth inhibition of a rat colon tumor by L-canavanine. *Cancer Research*, 46(6):2898-2903, 1986.
39. Ding, Y., Matsukawa, Y., OhtaniFujita, N., Kato, D., Dao, S., Fujii, T., Naito, Y., Yoshikawa, T., Sakai, T. and Rosenthal, G.A. Growth inhibition of A549 human lung adenocarcinoma cells by L-canavanine is associated with p21/WAF1 induction. *Japanese Journal of Cancer Research*, 90(1):69-74, 1999.
40. Repetto, M. *Toxicología fundamental. Científico-Médica*, 2ª edic., Barcelona, pág. 19-21,26-29, 1988.
41. Fabre, R., Truhaut, R. y Granier-Doyeux, M. *Compendio de toxicología. Vol. I*, Ediciones de la Biblioteca, Caracas, pág. 79-92, 1962.
42. Curtis, H. *Biología. Médica-Panamericana*, 4ª edic., México, D.F., pág. 87-89, 754,755, 1992.
43. FAO/WHO/UNU. *Energy and protein requirement. Report of a Joint*, 1985.
44. Torún, B., Menchú, M.T. y Elías, L.G. *Recomendaciones dietéticas diarias del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. INCAP-OPS*, Guatemala, pág. 16-25, 1994.
45. Fernández-Quintela, A., Larralde, J., Maraculla, M.T., Marcos, R. y Martínez, J.A. *Leguminosas y concentrados de proteína: nuevas perspectivas y aplicaciones. Alimentaria*, 239(Ene-Feb):59-63, 1993.
46. Periago, M.J., Ros, G., Martínez, M.C. y Rincón, F. *El contenido de nitrógeno no proteico en legumbres de la dieta mediterránea como factor limitante de su valor nutritivo. Alimentaria*, 234(Jul-Ago):51-54, 1992.
47. Hernández, T., Hernández, A. y Martínez, C. *Calidad de proteínas: conceptos y evaluación. Alimentaria*, 274(Jul-Ago):27-37, 1996.
48. Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Perez-Lizaur, A.B. y Arroyo, P. *Nutriología médica. Médica-Panamericana*, 2ª edic., Edo. de Mex., pág. 462,463, 2000.
49. Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T. y Martínez, J.A. *Obtención y caracterización de concentrados de proteína a partir de leguminosas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(3):285-297, 1993.

50. Fennema, R.O. Química de los alimentos. Acribia, Zaragoza, pág. 315-317, 367-371, 1993.
51. Serna, S. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT, México, D.F., pág. 80-83, 1997.
52. Herlich, K. (Editor). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Published by A.O.A.C. Inc., 15ª edic., Arlington, Vol. I pág. 17-18, 40-62, 69-83, Vol. II pág. 1097, 1098, 1990.
53. Lloyel, I.E., McDonald, B.E. y Crampton, E.W. Fundamentos de nutrición. Acribia, Zaragoza, pág. 334-351, 1982.
54. Alvarez, U.I. Evaluación nutritiva de diferentes preparados proteínicos de la almendra de calabaza (*Curcubita pepo*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 36-38, 42-47, 2001.
55. Lucas, B. and Sotelo, A. Aminoacids determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. Analytical Biochemistry, 123:349-356, 1982.
56. Lucas, B. and Sotelo, A. Effect of different alkalies, temperature and hidrolisis times on tryptophan determination of pure proteins. Analytical Biochemistry, 109:192-197, 1980.
57. Rao, R., Tara, M. and Krishnan, C. Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. Journal of Food Science and Technology, 2:213-216, 1974.
58. Alvarado, H.E. Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 42, 43, 1999.
59. Fearon, W.R. and Bell, E.A. Canavanine: detection and occurrence in *Colutea* arborences. Biochemical Journal, 59:221-224, 1955.
60. Rosenthal, G.A. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. Analytical Biochemistry, 77(1):147-151, 1977.
61. Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. and Youngs, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 6:71-80, 1975.

62. Haug, W. and Lantzsch, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal and products. *Jornal of the Science of Food and Agriculture*, 34:1423-1426, 1983.
63. Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E. and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51:376-382, 1974.
64. López, E.M. Determinación de factores tóxicos en varios almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 34-39,73,77, 2000.
65. Hartree, E.F. Determination of a protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48:422-423, 1972.
66. Petzke, K.J., Ezeagu, I.E., Proll, J., Akinosoyinu, A.O. and Metges, C.C. Aminoacid composition, available lysine content and in vitro protein digestibility of selected tropical crop seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(2):151-196, 1997.
67. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Tablas de Composición de Alimentos. Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos, México, D.F., pág. 1,15,29,33,37,41, 1996.
68. Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A. True protein content and non-protein aminoacids present in legumes seeds. *Nutrition reports International*, 37(3):545-553, 1988.
69. Ramírez, M.O. y Ortiz, B.L. Características químicas y nutricionales del grano de cinco genotipos de *Canavalia ensiformis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 47(3):234-236, 1997.
70. Bressani, R., De Mora, D.R., Flores, R. y Gómez-Brenes, R. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo y cocido, y efecto que éstos provocan en la digestibilidad de la proteína. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, XLI(4):569-583, 1991.
71. Garner, R.J. *Toxicología veterinaria*. Acribia, 3ª edic., Zaragoza, pág. 275-278, 1970.
72. Radeleff, R.D. *Toxicología veterinaria*. Academia, Leon, pág. 204-207, 1967.

## ANEXOS

### I. Distribución de los animales.

El método de la "culebra japonesa" consiste en ordenar los pesos corporales de los animales empleados en orden decreciente, para lo cual se hace una tabla con el número de columnas de acuerdo a los lotes que se van a trabajar y se van acomodando los pesos en dirección horizontal del mayor al menor (simulando el movimiento de una culebra). Para asegurarse que el método de distribución utilizado es adecuado, se debe determinar la media, la cual debe ser semejante para los diferentes lotes.

Lote 1 (g)	Lote 2 (g)	Lote 3 (g)	Lote 4 (g)	Lote 5 (g)
227	226	225	219	217
198	200	204	208	213
196	195	190	189	186
--	--	--	--	---

## II. Observación de los animales.

La observación del comportamiento individual de los animales se realiza en una hoja especial como la siguiente.

<b>TOXICIDAD AGUDA</b>															
Especie:		Clave:		Cepa:		Fecha		Peso inicial:		Peso final:		Sexo:		Edad:	
Descripción:															
Vehículo:															
Concentración:															
Vía:															
Administración:															
Dosis:															
Hora:															
(*)	Lordosis	Xifosis	Ataxia	Piloerección	Erección caudal	Agresividad	Aletargamiento	Excitación	Disnea	Cianosis	Hipotermia				
1 h															
2 h															
3 h															
4 h															
5 h															
6 h															
7 h															
8 h															
9 h															
10 h															
11 h															
12 h															
24 h															
48 h															
72 h															
Observaciones:															
(*) Observación visual del sintoma clínico contra el control respectivo: 0=normal, 1=leve, 2=moderada, 3=marcada o drástica.															