

00528  
36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

"EVALUACIÓN NUTRICIONAL Y TOXICOLÓGICA  
DEL EJOTE DE COLORIN (*Erythrina americana*)  
DESPUÉS DE SER SOMETIDO A UN  
PROCESO DE COCCIÓN"

**T E S I S**

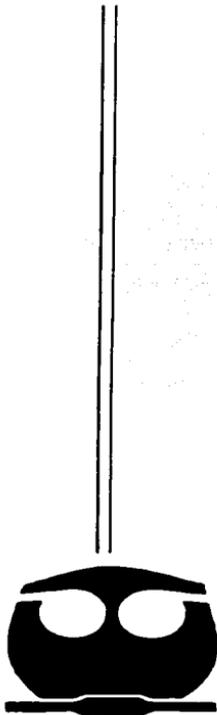
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A  
**NANCY ISABEL FLORES DEL VALLE**

MEXICO, D.F.

2003



EXAMENADO Y APROBADO  
FACULTAD DE QUÍMICA





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. Ángela Sotelo López

**Vocal**

Prof. Pedro Valle Vega

**Secretario**

Prof. Bernardo Lucas Florentino

**1er. Suplente**

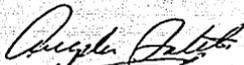
Prof. Lucía Cornejo Barrera

**2do. Suplente**

Prof. Enrique Martínez Manrique

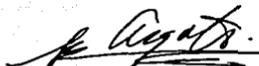
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111. Departamento de Farmacia. Conjunto E. Facultad de Química.  
Universidad Nacional Autónoma de México



M. en C. Ángela Sotelo López

Asesor



M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Supervisor Técnico



Nancy Isabel Flores Del Valle

Sustentante

## AGRADECIMIENTOS

A la vida por situarme en este espacio, a Dios y a mi familia por darme la oportunidad de ser Nancy Isabel y estar viviendo día con día.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por proveerme de los conocimientos para formar en mí a una profesionista.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el proyecto IN-202998, que brindó el apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Angela Sotelo, por su confianza al permitirme ser parte de este proyecto y concluir así esta etapa de mi vida.

A Rosita Argote y Lety Gil, sus consejos y comentarios fue la mejor guía para lograr este sueño, gracias por ser no sólo asesoras sino amigas.

Al M. en C. Bernardo Lucas, su paciencia y tiempo para aclarar mis dudas facilitaron el camino para llegar a un buen resultado.

Al M. en C. Lino Joel Reyes Trejo, gracias por sus consejos y su amistad.

Al personal del bioterio y del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, especialmente a Lucy Cornejo y Agustín Reyó, por las facilidades otorgadas por la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 111, Vero, Anita, Gerardo, Alfredo, Miguel, Norma, Iliana, Carlos y todos, en verdad todos los que me apoyaron en este proyecto cuando más lo necesité, además gracias por los momentos agradables que compartimos.

A la Señora Vicky Platas, sus comentarios aminoraban los días difíciles, además de tener siempre una sonrisa y un detalle para todos.

A mis amigos que son parte de mi vida, especialmente a los que me ayudaron a ser más agradable e inolvidable la vida universitaria:

- + Rosy, eres la mejor compañera de trabajo que haya encontrado en mi vida, gracias por tu apoyo y amistad a lo largo de todo este tiempo.
- + Amy, eres una gran y verdadera amiga.
- + Caly, gracias por escucharme cuando más lo necesité.
- + Ale, por tener la paciencia para bajarme de mi nube.
- + Juan, primo gracias por tu confianza.
- + los inseparables Olga y Bloy.

A Lety, Bety, María de Jesús y a todos mis amigos de la UAM que me animaron para presentar nuevamente el examen de admisión.

A Vero, Amalia, mi prima Rosy y mi primo Miguel por su tiempo para obtener las imágenes de este trabajo.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me brindaron su ayuda en la realización de este proyecto.

## DEDICATORIAS

♥ *Mami:*

*Tú eres mi ejemplo de fortaleza en los peores momentos. Tú me dijiste un día: "Hija, yo sé que puedes lograr esto y mucho más". Nunca me has dejado que me derrumbe cuando he estado apunto de caer. Sin embargo, aquí tienes el resultado de nuestro sueño que tanto esfuerzo nos costó y después de todo es tuyo por que si no fuera por tí, yo no estuviera en este mundo. Te quiero.*

♥ *Abuelito Nacho:*

*Este triunfo es también tuyo, aunque ya no estés, tu recuerdo me dio las fuerzas para seguir adelante.*

♥ *Mi hermano Edgar:*

*Mamá siempre nos enseñó a compartir, por lo que este sueño es también tuyo.*

♥ *Abuelita Soledad:*

*Te agradezco las plegarias para que todo resultara bien, y estar al pendiente de mi vida.*

♥ *Tío Miguel:*

*Gracias por su apoyo, ya que siempre nos facilitó los libros y la información (se acuerda del Tratado de Guyton).*

♥ *Carlitos:*

*A lo largo de este tiempo me has enseñado que el amor es NOSOTROS. Agradezco al destino que uniera nuestros caminos por que sin tí mi brújula no encontraría el norte. Amor, este logro es también tuyo y considéralo como el SI de nuestro futuro.*

*Con todo mi cariño,  
Nancy*

# ÍNDICE

	Página
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>2 Generalidades</b>	<b>8</b>
2.1 Leguminosas	10
2.1.1 Aspectos nutricionales de las leguminosas	10
2.1.2 Aspectos toxicológicos de las leguminosas	11
2.1.2.1 Lectinas	12
2.1.2.2 Alcaloides	13
2.1.2.3 Inhibidores de tripsina	14
2.1.2.4 Taninos	15
2.2 Género <i>Erythrina</i>	17
2.2.1 Especie <i>Erythrina americana</i>	19
2.2.1.1 Aspectos tóxicológicos de la <i>Erythrina americana</i>	22
2.3. Análisis químico de un alimento	24
2.4 Calidad de las proteínas	25
2.4.1 Métodos químicos	26
2.4.1.1 Análisis de aminoácidos por HPLC	27
2.4.2 Métodos biológicos	28
2.4.2.1 Relación de la Eficiencia Proteica (REP)	29
2.4.2.2 Digestibilidad ( <i>in vivo</i> )	30
2.5 Tratamientos de destoxificación	31
2.5.1 Calidad de la cocción	32
<b>3 Metodología</b>	<b>36</b>
3.1 Recopilación de la materia prima	36
3.2 Preparación de la muestra	37
3.2.1 Muestras de referencia	37
3.2.2 Muestras en estudio	38
3.3 Caracterización bromatológica	39
3.4 Determinación de los factores antinutricionales y tóxicos	39
3.4.1 Determinación de lectinas	40
3.4.2 Cuantificación de alcaloides por titulación	44

3.4.3	Determinación de inhibidores de tripsina	47
3.4.4	Determinación de taninos	51
3.5	Evaluación de la calidad proteica	54
3.5.1	Calificación química (Chemical Score)	54
3.5.1.1	Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa, derivatización pre-columna	55
3.5.1.2	Cuantificación de Triptofano	64
3.5.2	Pruebas biológicas	68
3.5.2.1	Relación de la eficiencia proteica (REP)	69
3.5.2.2	Digestibilidad aparente (Da)	71
3.6	Recopilación de datos	73
3.7	Análisis Estadístico	73
<b>4</b>	<b>Resultados y Discusión</b>	
4.1	Caracterización bromatológica	75
4.2	Determinación de los factores antinutricionales y tóxicos	79
4.2.1	Lectinas	79
4.2.2	Alcaloides	80
4.2.3	Inhibidores de tripsina	82
4.2.4	Taninos	83
4.3	Evaluación de la calidad proteica	84
4.3.1	Composición de aminoácidos	84
4.3.2	Calificación química	86
4.3.3	Relación de la eficiencia química (REP)	87
4.3.4	Digestibilidad aparente (Da)	91
<b>5</b>	<b>Conclusiones</b>	92
<b>6</b>	<b>Bibliografía</b>	95
	<b>Anexos</b>	
A.	Preparación de reactivos específicos	102
B.	Información adicional del equipo de HPLC	104
C.	Técnica de distribución (culebra japonesa)	110
D.	Formato de registro de datos para la prueba biológica REP.	111

# Capítulo 1. Introducción



# INTRODUCCIÓN

La alimentación es una de las necesidades biológicas principales que todo ser vivo debe satisfacer. Sin embargo, la situación alimentaria actual no es favorable debido a un desequilibrio entre la población y la producción de alimentos. (1) Aunado a esto, los productos proteínicos de origen animal (carne, leche, huevo, etc.) tienen un costo más elevado que los productos de origen vegetal como las tortillas y el frijol; lo cual incide en la población de bajos ingresos. (2, 3) De ahí que el hombre esté en una constante búsqueda de nuevas fuentes de alimento para sí mismo y sus animales domésticos que provean la mayoría de los nutrimentos indispensables para su dieta.

En nuestro país existe una gran biodiversidad vegetal con potencial para ser incorporados a la alimentación y así disminuir la dependencia de insumos cotidianos que tienden a tener un costo elevado. En este caso se encuentran las leguminosas, plantas con un amplio uso en la agricultura y, uno de los principales elementos en la dieta humana y animal debido a que los granos de éstas aportan proteína vegetal, que cuantitativamente es de dos a tres veces mayor que la contenida en cereales, además presentan glúcidos, algunas vitaminas y minerales. (4)

Las leguminosas son un grupo de más 12000 especies de las cuales sólo 20 son explotadas comercialmente, mientras que otras están en estudio, tal es el caso de la *Erythrina americana* (colorín); especie de la familia *Fabaceae* que figura en la flora silvestre nativa de México.

Las semillas de la *Erythrina americana* son ricas en proteína vegetal, la limitante para su consumo es el contenido de alcaloides, los cuales son relevantes por su actividad hipnótica y anestésica.

La mayoría de los estudios sobre la *Erythrina americana* se centran en el fruto maduro. Aunque, en el estadio de ejotes (frutos inmaduros) presenta un bajo contenido de tóxicos y factores antinutricionales en comparación con otros estadios de maduración (5), no ha sido evaluada su potencialidad como alimento.

Si bien algunos alimentos son consumidos de manera directa, la mayor parte sufren algún proceso para ser ingeridos, como es el caso de la cocción, procedimiento de mayor uso para hacer comestible a los alimentos como las leguminosas debido a que éstas presentan factores que reducen su digestibilidad, pero al aplicar un tratamiento térmico pueden ser eliminados, reducidos o inactivados.

El presente estudio es parte del proyecto dirigido a la valoración de la *Erythrina americana* como fuente de alimento. En éste sólo se enfocó a la evaluación de la calidad nutricional y toxicológica del ejote de *Erythrina americana*, tanto de la semilla como del fruto completo, después de ser sometido a un tratamiento térmico (cocción) y la posterior separación del líquido de cocimiento para eliminar los factores antinutricionales y tóxicos contenidos en ellos, con el fin de incrementar su calidad nutricional.

El propósito de estudiar por separado la semilla del ejote y el ejote completo es identificar un posible efecto de la fibra aportada por la vaina en la calidad nutricional, y así determinar el mejor aprovechamiento del fruto inmaduro de esta leguminosa.

Para definir la calidad nutricional y toxicológica del ejote integro y de su semilla, se realizó el análisis proximal de las muestras, de igual manera, se determinó los factores antinutricionales y tóxicos encontrados comúnmente en esta leguminosa; además de, evaluar la calidad de la proteína tanto química como biológicamente.

Los resultados de estos análisis proporcionan los elementos básicos para determinar su potencialidad como alimento, con lo que se pretende proyectar al ejote de la *Erythrina americana* cocido sin el líquido de cocción como un alimento dirigido, inicialmente a la alimentación animal y en un futuro para la alimentación humana de alto valor nutritivo y bajo costo.

# Objetivos



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# OBJETIVOS

## GENERAL:

Conocer la eficacia de la cocción como método de detoxificación en el ejote y la semilla inmadura de la *Erythrina americana*, y evaluar la calidad nutricional de estos después de ser sometidos a cocción y posterior eliminación del líquido de cocción.

## PARTICULARES:

- a) Definir la composición bromatológica del ejote y la semilla inmadura de la *Erythrina americana* antes y después del cocimiento.
- b) Cuantificación de los siguientes factores tóxicos y antinutricionales en las muestras:
  - « Lectinas
  - « Alcaloides
  - « Inhibidores de Tripsina
  - « Taninos
- c) Evaluar la calidad proteica de las muestras por:
  - ◆ un método químico:
    - Calificación Química
  - ◆ dos métodos biológicos:
    - Relación de la Eficiencia Proteica (REP)
    - Digestibilidad aparente (Da)

# Capítulo 2. Generalidades



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# GENERALIDADES

## 2.1 Leguminosas.

Las leguminosas son el tercer grupo botánico más grande, perteneciente a la familia de las *Fabaceae*, comprende alrededor de 12 000 especies distribuidas en el mundo, siendo predominantes las plantas y los pequeños arbustos; son consideradas de los primeros cultivos comestibles practicados por el hombre por constituir una de sus fuentes principales de alimento.

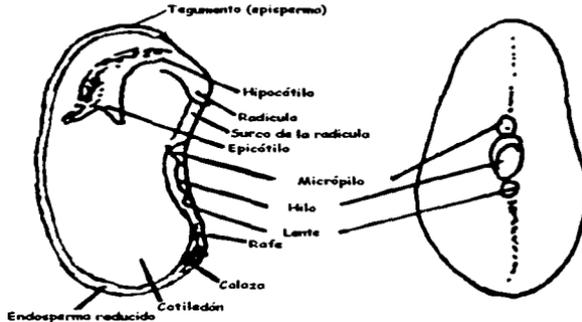


Fig. 2.1 Esquema de una semilla de leguminosa, en su madurez.

Los frutos de las leguminosas típicamente *legumbres*, de donde procede el nombre de la familia, se dan en vaina que al madurar se seca. Algunas leguminosas silvestres al secarse, su vaina es dehiscente, es decir, que se abre por sí misma en dos cáscaras simétricas a lo largo de una línea de sutura dorsal en cuyo margen van adheridas las semillas. (6) Las semillas de las leguminosas son exalbuminosas, con el

tegumento o *episperma* formado por la *testa* y *endopleura*; *hilo* característico para cada especie (Fig. 2.1); las semillas presentan la característica de perder fácilmente la humedad al madurar, además de la presencia de tegumentos bastantes impermeables, logrando así almacenarlas sin peligro. (7)

Aunque la principal utilidad de las leguminosas de grano reside en las semillas, estas plantas no se restringen al campo de la alimentación, sino que muchas de ellas son usadas en la agricultura como:

⊗ *forraje y ensilados.*

- ⊗ *abono verde:* son plantas que se incorporan al suelo cuando aun están verdes, o un poco después de la floración con el objetivo de enriquecer los suelos (para regenerar la materia orgánica, agrega material nitrogenado); pero en épocas recientes el término abonos verdes se ha usado mas ampliamente y puede referirse a plantas cuya vegetación se deja en el suelo estando verde o en estado seco con el propósito de abonar el suelo pueden ser sembrados en el terreno o traídos de otro lugar. Además, protege al suelo de la erosión.
- ⊗ *cultivos protectores:* son aquellas plantas que se siembran para cubrir el suelo, sin importar si en el futuro serán o no incorporadas. Así, aunque se usen para cubrir y proteger la superficie del suelo, también pueden ser incorporadas como abonos verdes. Además, el término cultivos de cobertura incluye plantas sembradas entre las calles de huertos de frutales o durante el período entre un cultivo y otro, con el objetivo de proteger la tierra de la erosión y lixiviación, incrementan la fertilidad mediante la remineralización del suelo; así también, acumulan el nitrógeno debido a la fijación simbiótica de éste por las bacterias del género *Rhizobium*, las cuales forman nódulos en las raíces de las plantas transformando el nitrógeno atmosférico en amoniaco. (8, 9)

### 2.1.1 Aspectos nutricionales de las leguminosas.

El hombre aprovecha diversas partes de las leguminosas para su alimentación; sin embargo, es mayor el consumo de las semillas maduras (secas), de acuerdo con las características de cada especie también se utilizan otras partes de la planta. Así, por ejemplo, las vainas inmaduras (ejotes) de varias leguminosas se ingieren con frecuencia en numerosas regiones; en otros sitios aprovechan las hojas, los tallos, los germinados, las semillas inmaduras (verdes), las flores y las raíces. (8) Las semillas de las leguminosas se consideran fuentes de energía y otros nutrientes (4), aunque fluctúan en función de la especie, del clima, del almacenamiento, del período de recolección, etc.; ya que contienen:

- § agua: cuando los frutos de las leguminosas están inmaduros, la composición se aproxima a la de una verdura, una humedad del 60-80%, y en la semilla madura suele alcanzar valores de 5-15% de humedad del peso total. (4)
- § proteína: el contenido de proteínas en semillas maduras de leguminosas oscila entre 18-44%, por lo que son consideradas excelentes fuentes de proteína vegetal. (4, 10)
- § lípidos: en la mayoría de las leguminosas prevalece un bajo contenido de lípidos o grasa (1-6%) pero existen excepciones en algunas de éstas donde la grasa se considera macronutriente, como es el caso del cacahuate. Sus grasas, en general, son más ricas en ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E. (7, 8)
- § hidratos de carbono: contienen de 20 hasta 60% en las semillas maduras; la presencia de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos es muy variable, no obstante casi la totalidad de esta fracción es almidón, por lo que las leguminosas son consideradas una fuente barata de energía. (7, 8)

§ cenizas: se consideran fuentes de hierro (5-7.6 mg/100g), calcio (68-250 mg/100 g) y fósforo (300-400 mg/100 g). (4, 8)

§ fibra: se constituye principalmente de tres polisacáridos (celulosa, pectina y hemicelulosa), así como lignina, presente en las paredes celulares. (11)

Entre las limitantes del uso de las leguminosas, se incluye la reducida cantidad en aminoácidos esenciales azufrados (metionina y cisteína), razones tales como la corteza de la semilla y su estructura nativa; además, la presencia de factores antinutricionales y tóxicos, lo que en conjunto reduce la biodisponibilidad. (12)

### 2.1.2 Aspectos toxicológicos de las leguminosas.

Todos los alimentos contienen una o mas sustancias de manera natural sin valor nutritivo, que en ciertos casos pueden disminuir este valor. (8) Algunas de estas sustancias son peligrosas para el organismo que las ingiere, provocando distintos trastornos y con ciertas características: inhibición del crecimiento, hipertrofia pancreática, alteración o lesión de la mucosa intestinal, hipoglucemia, disminución de la eficiencia alimentaria ocasionando una pérdida de nutrientes esenciales o interfiriendo en su utilización y función metabólica. Arbitrariamente, estas sustancias pueden ser clasificadas en dos grupos:

**Sustancias antinutritivas:** compuestos susceptibles de provocar un desequilibrio en la cobertura de las necesidades de los nutrientes que, si no es compensado por un aporte complementario del o de los nutrientes afectados, lleva a la instalación de una patología particular.

**Sustancias tóxicas:** compuestos cuyos efectos nefastos no pueden ser compensados por una suplementación alimenticia, ejerciendo sobre el organismo un efecto puramente tóxico. Pudiendo presentar una reactividad particular, ya sea como antagonistas o agonistas o inhibidores de enzimas, de hormonas o aminoácidos. En casos específicos, sus modos de acción estarían favorecidos por la existencia de una dotación genética propicia a la aparición de una patología determinada. (13)

A menudo, estos dos tipos de sustancias se emplean de manera indistinta con el término de **factores tóxicos**.

Como cualquier otro alimento, las leguminosas contienen compuestos nocivos cuyo tipo, concentración y efecto difieren de una especie a otra; aunque, es necesario que dichos compuestos sean identificados y cuantificados, de tal manera que su riesgo real para la salud humana o animal sea evaluada y puedan tomarse las medidas preventivas o correctivas correspondientes. Los factores tóxicos presentes comúnmente en las leguminosas se describen a continuación.

#### **2.1.2.1 Lectinas.**

Son un grupo heterogéneo de proteínas que se caracterizan por ligar glucoconjugados con alta especificidad, uniéndose de manera irreversible sin alterar su estructura covalente; tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos, de ahí que sean llamadas hemaglutininas. (14) Las lectinas están distribuidas ampliamente en tejidos vegetales particularmente en las semillas, donde llegan a constituir hasta el 10% de las proteínas totales. (15)

El efecto primario que presentan las lectinas se relaciona con el hecho de que se unen a la mucosa de la pared intestinal alterando su capacidad de absorber nutrientes, por lo que ocasiona una disminución en la tasa de crecimiento en el organismo que los consume. (16) Todas las lectinas presentan una sintomatología similar, de mayor o menor gravedad, iniciando por la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios y el edema y la hemorragia del tejido linfático, resultando en la muerte del organismo que la consume. (17)

Sin embargo, la actividad de las lectinas decrece durante una adecuada cocción, aunque no siempre se alcanza la destrucción completa del efecto tóxico de la lectina, con lo que se mejora el valor alimenticio. (15)

#### 2.1.2.2 Alcaloides.

Son un grupo de sustancias heterogéneo de origen vegetal, abarcando cerca de 6000 compuestos de compleja estructura molecular con propiedades alcalinas, además de actividades farmacológicas marcadas. (18) Durante mucho tiempo, los alcaloides han sido considerados únicamente como productos del metabolismo vegetal. Aunque existen indicios de estructuras alcaloidicas en los animales, se tratan normalmente de productos formados a partir de los vegetales ingeridos, pero en otros casos, en especial de los venenos de algunos batracios y de algunos peces, se trata de verdaderos productos del metabolismo animal. (19)

Aunque la función de los alcaloides en las plantas no es totalmente clara, existen algunas hipótesis que han sido discutidas como posibles funciones: agente de protección contra insectos; productos finales de las reacciones de destoxificación representando un candado metabólico de compuestos que de otra manera serían nocivos a la planta; factores reguladores del crecimiento y sustancias de reserva capaces de proporcionar nitrógeno u otro elemento necesario para el mantenimiento de la planta. (16)

### **2.1.2.3 Inhibidores de Tripsina.**

Pertenece al grupo de antienzimas, las cuales inhiben la acción de la enzima digestiva correspondiente. Los inhibidores de tripsina son polipéptidos o proteínas capaces de inhibir la acción catalítica de la tripsina. (20)

En las plantas se concentran principalmente en la semilla, tubérculos, raíces y hojas. Su función fisiológica es de regulación o de defensa contra plagas y depredadores. (14)

Se ha observado en experimentos con ratas que estas sustancias disminuyen el crecimiento de los roedores y producen hipertrofia pancreática como esfuerzo compensatorio. (20)

Mediante un apropiado calentamiento puede eliminarse o disminuir en gran parte el efecto de los inhibidores de tripsina. De tal manera, se logra utilizar las plantas como alimento. (21) El grado de destrucción de los inhibidores de tripsina depende de el tipo de inhibidor, la

temperatura, la duración del calentamiento, el volumen del alimento y su contenido en agua. La cocción habitual es suficiente para inactivar hasta el 80% de los inhibidores de tripsina, con lo cual dejan de representar un riesgo. (16)

#### **2.1.2.4 Taninos.**

Pertenece al grupo de los acomplejantes de minerales. Los taninos son un grupo heterogéneo de polifenoles solubles en agua, con la capacidad de precipitar alcaloides y proteínas, que presentan las reacciones características de los fenoles, se consideran metabolitos secundarios de las plantas. (16) Los taninos comprenden una pequeña parte del tan amplio como diverso grupo de los compuestos fenólicos vegetales, que abarca los ácidos fenólicos de 7 a 9 átomos de carbono, tales como los ácidos gálico y p-cumárico, los flavanos de 15 átomos de carbono, y las ligninas, las cuales tienen un alto grado de polimerización.

A pesar de su indefinición química, generalmente los taninos se dividen en hidrolizables y condensados, aunque ambos tipos pueden sufrir procesos hidrolíticos en medio acuoso. Los taninos hidrolizables están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilo se encuentran esterificados con ácidos carboxílicos fenólicos. Por su lado, los llamados taninos condensados (proantocianidinas) son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles (flavan 3,4-diol, como el monómero leucoantocianidina y flavan 3-ol, tal como la catequina). Tanto unos como otros son insolubles en solventes no polares (éter, cloroformo, benzeno) y solubles en agua y alcohol. La imposibilidad de

una clasificación rígida se pone de manifiesto cuanto más se avanza en el estudio de las estructuras de los taninos.

Los efectos negativos que producen los taninos se muestran en distintos niveles:

- ◆ con las proteínas forman complejos que resultan totalmente irreversibles durante la digestión,
- ◆ tienen la capacidad de unirse a iones di y trivalentes como, por ejemplo, el hierro disminuyendo su biodisponibilidad. (15, 21)

Los taninos se encuentran en amplia gama de plantas como frutas (principalmente cuando aún no están maduras), cereales y leguminosas; también se han identificado en el café, té y cacao. El frijol común se cuenta entre las especies ricas en taninos, siendo más abundantes en las semillas de testa más pigmentada.

Debido a su propiedad de astringencia, los taninos pueden proporcionar una protección a las plantas en contra de depredadores como mohos, bacterias, insectos, etc., de ahí que sean considerados en la agricultura como pesticidas biológicos. Por otro lado, esta misma propiedad es aprovechada en la industria vitivinícola en el proceso de clarificación, al precipitar la proteína presente. (16)

El remojo y la cocción se consideran como un proceso en el cual se extrae un porción importante de los taninos en la semilla y reduciendo así su efecto; por lo cual, el agua de cocción debe descartarse. (15)

## 2.2 Género *Erythrina*

(Del griego *erythros*: rojo, debido al color de sus flores).

El género *Erythrina* es miembro de la familia *Fabaceae*, lo componen aproximadamente 115 especies comprendidas entre árboles, arbustos, algunas plantas herbáceas y bejucos. En las ramillas presentan espinas cónicas y peciolos; de hojas trifoliadas; flores muy vistosas, rojas, rosadas o anaranjadas, que aparecen antes o junto con las primeras hojas en épocas secas; las semillas son ovoides, brillosas, de color rojo, carmín o marrón, algunas con manchas negras.

Las *Erythrinas* están distribuidas en todo el mundo, en bosques abiertos, malezales, pantanos, orillas de ríos, zonas tropicales. Algunas especies se adaptan a regiones secas, rocosas y arenosas. Dependiendo del clima de la región, la mayoría tiene un follaje caducifolio.

Aunque las especies varían con la región, las *Erythrinas* son usadas principalmente como:

- ✓ *árboles de sombra* en cultivos como café y cacao (especialmente la *E. fusca*, *E. burana*, *E. variagata*, *E. poeppigiana* entre otras) y árboles de soporte en plantaciones de pimienta (India) y vainilla (Puerto Rico),
- ✓ *cercas vivas* por su fácil reproducción por estaca,
- ✓ *abono verde* (la *E. fusca*, *E. berteriana*, *E. costarricensis*, *E. poeppigiana* son usadas en Costa Rica),
- ✓ *ornamentales*. (22)

Sus hojas tienen un gran valor como abono verde, y sus flores son usadas como alimento o en infusiones, mientras que sus semillas para joyería. Su madera es grisácea, esponjosa y liviana; fuerte pero poco durable, muy utilizada para flotadores, cajas y tallas. (23)

Las especies de *Erythrina* han sido objeto de diversos estudios por tener un efecto tóxico similar al curare<sup>^</sup> debido a la presencia de alcaloides, los cuales se concentran más en sus semillas y cortezas que en sus hojas.

La *Erythrina edulis* podría ser la única especie de la cual las semillas son consumidas en la región Andina de Colombia y Perú; mientras que, el follaje de otras especies de *Erythrinas* son ampliamente usados como alimento para ganado vacuno y caprino sin reportes de efectos dañinos. Aún no existe información acerca del uso de estas leguminosas como alimento en animales no-rumiantes. (22)

Muchos alcaloides son específicos o característicos de un género de la misma familia pertenecen a un mismo orden. En el género *Erythrina* se han identificado  $\beta$ -eritroidina, agente bloqueador neuromuscular; otros alcaloides biológicamente activos identificados fueron  $\alpha$ -eritroidina, eribidina, eritralina, erisodina y oxo- $\beta$ -eritroidina. (20, 22)

---

<sup>^</sup> El curare es un veneno de inmovilización que produce parálisis muscular en el organismo que lo ingiere.

### 2.2.1 Especie *Erythrina americana*. (25)

Comúnmente llamada Colorín (también conocida como Chocolín, Madre Chontal, Chacmolché, Pureque) es una especie que forma parte de la flora silvestre nativa de México.

Son árboles de follaje frondoso y caducifolio, verde claro, de hasta 9 metros de altura, por lo general se utilizan en jardinería por su llamativa floración. (Fig. 2.2)

Su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas; las hojas son trifoliadas, con hojuelas de aproximadamente 10 cm. de largo, casi deltoides y en la mayoría de los casos glabras, provistas de estipulas.

Sus flores comúnmente de color rojizo-naranja, puntiagudas, brillantes y muy decorativas, están dispuestas en racimos de forma cónica cortos y densos en los extremos de las ramas, generalmente cuando están desprovistos de hojas (Fig. 2.3). Las flores constan de un estambre largo de 6 cm. (aprox.); las alas y la quilla es pequeña (1 cm.), su color blanquecino. El androceo consta de 10 estambres repartidos en dos grupos, uno de nueve y otro aislado, los cuales salen fuera del pétalo enrollado que alcanza su tamaño normal 7.5 cm., cuando está totalmente desarrollado. El ginaceo está rodeado en su base por un nectario y consta de un ovario alargado, comprimido, con un estilo simple que termina es un estigma pequeño. (26) Con frecuencia las flores son utilizadas en el arte culinario como legumbres a las cuales se les deben quitar las antenas y el pistilo (para evitar un sabor amargo) y sólo los pétalos cocidos son los que se utilizan. (27)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 2.2 Fotografía de la *Erythrina americana* (colorín), ubicado en los jardines del edificio B d la Facultad de Química de la U.N.A.M.



Fig. 2.3 Fotografía de la flor y los ejotes de la *Erythrina americana* (colorín).

El fruto es una legumbre de 10 a 20 cm. de largo y 2 cm. de ancho pedunculado, linear, falcado, con un estrangulamiento que limitan los lóculos donde se alojan de 2 a 6 semillas (Fig. 2.3), las cuales tienen una forma ovoide de 10-12 mm. de longitud que al madurarse son de color rojo vivo, escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante con las que se elaboran collares.

Las propiedades tóxicas del extracto de las semillas es semejante a las del curare, por lo que se emplea para eliminar animales nocivos, además se usa como agente hipnótico. La corteza y los tallos tienen de igual manera propiedades tóxicas, de la corteza se extrae la eritroidina (alcaloide que actúa sobre el sistema nervioso) y una tintura amarilla. La madera es suave y ligera aprovechada para tallar diversas figuras.

Es una leguminosa de fácil propagación mediante estacas y no requiere de grandes recursos agrícolas para su desarrollo. Se cultivan en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En México, se encuentran en el Distrito Federal, Morelos, Veracruz, Chiapas y Yucatán, adornando camellones, parques y jardines.

### 2.2.1.1 Aspectos toxicológicos de la *Erythrina americana*.

Estudios anteriores muestran que la semilla de la *Erythrina americana* presenta un alto contenido de proteína y grasa (macronutrientes de gran importancia en la alimentación), además, contiene algunos factores antinutricionales y tóxicos que limitan su utilización, pero es posible su destoxificación parcial o total mediante procesos físicos y químicos que implican costos. (28)

Los tóxicos de mayor importancia contenidos en la *Erythrina americana* son los alcaloides, los cuales están distribuidos en distintas regiones de la planta. En la *E. americana*, las flores y las semillas son ricas en alcaloides y éstas son posibles sitios de acumulación; se ha observado que el proceso de desarrollo y maduración afecta la síntesis de alcaloides en la planta.

En el estudio realizado por A. Sotelo y colaboradores, en 1993, se cuantificaron algunos factores antinutricionales y tóxicos en la harina de la semilla madura de la *E. americana* (18), se reportó la presencia de inhibidores de tripsina, lectinas y alcaloides; mientras que, la harina destoxificada de esta semilla solo presentó inhibidores de tripsina. Además, mediante cromatografía de gases fueron identificados los alcaloides: erisovina, erisodina, eritravina,  $\alpha$  y  $\beta$ -ertroidina, siendo éste último el más abundante.

En 1996, un estudio realizado por R. García-Mateos y colaboradores (28) determinaron la acumulación de los alcaloides en todos los estadios de desarrollo de las semillas de la *E. americana*. Se detectó que el mayor contenido de éstos se encuentra en las semillas maduras; así como, el

contenido de proteína y de alcaloides se incrementa simultáneamente durante la maduración del fruto y tienen una relación inversa con el contenido de nitrógeno no-proteico.

Posteriormente en 1997, R. García-Mateos y colaboradores en un estudio realizado a los alcaloides de seis especies de *Erythrina* endémicas de México (24) concluyeron que *E. americana* contiene la mayor concentración de alcaloides en relación a las demás especies analizadas; además, los alcaloides identificados se distribuyen principalmente en las semillas maduras secas y en segundo término las flores de la *E. americana*.

Mientras que en 1998, A. Sotelo y B. Lucas(5) observaron que en las vainas inmaduras (ejotes) de la *E. Americana* no se detectaron inhibidores de tripsina y lectinas, mientras que el contenido de alcaloides es bajo, en comparación con otros estadios de la vaina. Por lo que la concentración de alcaloides se incrementa con el tiempo de maduración alcanzando su máximo cuando la semilla está madura.

Los resultados de estudios anteriores reflejan los bajos niveles de factores antinutricionales en semillas inmaduras de la *E. Americana*, por lo que podrían ser utilizadas como complementos de la alimentación animal.

### **2.3 Análisis químico de un alimento.**

Un alimento es una asociación compleja de innumerables compuestos, por lo que la evaluación del valor nutrimental de un alimento es fundamental en la ciencia de la nutrición. (30)

La composición de nutrientes de los alimentos, como las leguminosas, depende de distintos factores tales como la especie, el suelo de cultivo, el clima, etc., por lo que sus aplicaciones en nutrición humana y animal han sido diversas.

Los análisis usuales de los alimentos no pretenden determinar su total y compleja composición; no obstante, el análisis proximal o bromatológico es usado para ciertas determinaciones convencionales de grupo de componentes afines. (31) Este tipo de análisis es de gran importancia para caracterizar y determinar su valor de acuerdo a sus componentes principales: humedad, proteína, lípidos, hidratos de carbono, cenizas (minerales) y fibra. (31, 32) Los métodos empleados en el análisis proximal son estandarizados y aprobados por la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. (33)

#### 2.4 Calidad de las proteínas.

Las proteínas son macromoléculas resultantes de la polimerización de los aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Por lo que sus propiedades nutritivas y características físicas y químicas dependen completamente del tipo, de la concentración y de la secuencia de unión de los monómeros constituyentes. (32)

En la dieta, la función principal de las proteínas es suministrar al organismo una mezcla de aminoácidos en las dosis adecuadas para síntesis y mantenimiento de los tejidos corporales. (34)

Hay 20 aminoácidos involucrados en la formación de las proteínas de los alimentos y en nuestro organismo, y sólo nueve de ellos se consideran esenciales. Los aminoácidos esenciales son los que no pueden sintetizarse en forma endógena y deben obtenerse a través de la dieta. Los aminoácidos esenciales son histidina (se considera aminoácido esencial solo en la etapa infantil), valina, fenilalanina, treonina, metionina, lisina, leucina, isoleucina, y triptofano. (10)

Las diversas fuentes de proteínas de los alimentos tienen distinta calidad nutritiva o biodisponibilidad, es decir, difieren en su capacidad para proporcionar el o los nutrimentos que se pueden liberar y absorber en el aparato digestivo según las necesidades del organismo.

La calidad de las proteínas se puede caracterizar por tres factores:

- ✓ el contenido total de aminoácidos esenciales,
- ✓ digestibilidad de las proteínas,
- ✓ biodisponibilidad de los aminoácidos.

La determinación de la calidad de las proteínas se puede realizar por métodos directos, principalmente técnicas *in vivo*, o bien por métodos indirectos, en donde se correlacionan estadísticamente los resultados del análisis de aminoácidos y de la digestibilidad.<sup>(34)</sup>

Los métodos directos se pueden clasificar con base en la técnica analítica usada: métodos químicos y métodos biológicos o bioensayos.

#### 2.4.1 Métodos Químicos.

La predicción de la calidad nutritiva de las proteínas de un alimento mediante el análisis químico permite visualizar la composición de éstas y, si se compara con una de óptimo valor biológico, se determina su contenido de aminoácidos esenciales deficientes.<sup>(31)</sup> El análisis químico determina el contenido de aminoácidos (aminograma), con el cual se puede calcular el índice químico de predicción biológica conocido como *calificación química*.

La calificación química (S.Q.) o *chemical score* fue propuesto por Mitchell y Block en 1946<sup>(34)</sup>, éste se basa en expresar la relación existente entre el valor de cada aminoácido esencial de la proteína en estudio con respecto al valor de dicho aminoácido en el patrón de referencia de aminoácidos necesarios para un crecimiento óptimo. Se considera aminoácido deficiente al menor valor del porcentaje de aminoácido esencial encontrado y, por tanto, limitante para la utilización de la proteína. El valor del porcentaje del aminoácido deficiente se le denomina calificación química. <sup>(16)</sup>

Para la proteína en estudio, el aminoácido limitante es el componente que determina el valor global de la proteína. Entre las ventajas que presenta este método es la sencillez al identificar el aminoácido limitante (lo cual no es posible en un bioensayo) y el diseño de las mezclas de proteínas complementarias para obtener una mayor calidad.

Hoy en día, la valoración cuantitativa de los aminoácidos de las proteínas de un alimento se realiza, previa hidrólisis del polímero en condiciones drásticas tanto ácidas como alcalinas, por cromatografía o analizadores automáticos basándose en el comportamiento ácido-base de los aminoácidos. (32)

#### **2.4.1.1 Análisis de aminoácidos por HPLC.**

La importancia del análisis de aminoácidos de un alimento va más allá de conocer su valor nutricional, sino para detectar posible presencia de contaminantes, adulterantes, aminoácidos o péptidos tóxicos después de un proceso. (10)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (siglas en inglés HPLC) es empleada como método de separación e identificación de compuestos con base en características fisicoquímicas de éstos y ha llegado a ser un método rutinario en la mayoría de las áreas de análisis instrumental.

Básicamente, el instrumento de cromatografía de líquidos de alta resolución esta compuesto de un depósito de disolventes, una bomba de

alta eficiencia y precisión, un dispositivo de inyección, una columna, un detector y un amplificador de señal.

Actualmente, el método de HPLC es cuantitativo, rápido, altamente sensible, capaz de producir una buena resolución entre compuestos químicamente similares como es el caso de los aminoácidos, siempre y cuando la muestra esté libre de cualquier tipo de componente diferente a aminoácidos libres; cuando el método involucra una derivatización puede dividirse en dos técnicas: pots- o precolumna. No obstante, la más empleada para el análisis de aminoácidos es la derivatización precolumna. (35)

En la derivatización precolumna, la mezcla de aminoácidos es tratada con un reactivo para formar derivados los cuales son altamente absorbentes en la región ultravioleta y pueden ser separados por cromatografía de fase reversa (CFR). La CFR es un sistema de partición en el cual la fase móvil es más polar que la fase estacionaria. La fase estacionaria más usada es la sílica enlazada con cadenas octadecil ( $C_{18}$ ), con buffer de acetato y un gradiente de acetronitrilo o metanol como fase móvil. (16)

#### 2.4.2 Métodos Biológicos.

Aunque el perfil de aminoácidos es importante en la calidad nutricional de una proteína, su susceptibilidad a la hidrólisis es el mayor determinante de la disponibilidad de aminoácidos. Si una proteína no es digerible, ésta no tiene una buena calidad de proteína a pesar de su perfil de aminoácidos esenciales. (10)

La evaluación biológica de la calidad proteica es una medida del contenido, proporción y disponibilidad de los aminoácidos esenciales. Los bioensayos determinan la biodisponibilidad de las proteínas alimentarias, se realizan normalmente en ratas y se basan en la medición de la ganancia en peso o el nitrógeno retenido en función de la proteína ingerida. Este tipo de determinaciones están en función de la concentración de los  $\alpha$ -aminoácidos limitantes y no suministran otra información acerca de los aminoácidos esenciales.

Entre los bioensayos más utilizados están la relación de eficiencia proteica (REP) y la digestibilidad.

#### **2.4.2.1. Relación de la eficiencia proteica (REP).**

Desarrollado por Osborne en 1919, es el método más antiguo y conocido para la evaluación nutritiva de proteínas. En 1975, fue adoptado por la AOAC como método oficial para determinar la calidad de las proteínas. (34)

La REP es un índice del aumento de peso con una ingesta proteica establecida medida en un determinado periodo de tiempo. Este índice ha sido usado ampliamente, ya que bajo condiciones estandarizadas es un método con validez estadística, además de ser sencillo. La relación entre la REP y la capacidad de una proteína para suministrar todos los aminoácidos esenciales en cantidades necesarias no es lineal. (10)

#### 2.4.2.2 Digestibilidad (*in vivo*).

La digestibilidad de una proteína es la fracción del nitrógeno ingerido que se absorbe, es decir, la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba.

Los métodos de digestibilidad de proteínas *in vivo* se basan en suministrar una dieta que contiene la muestra como única fuente de proteínas a los animales experimentales, de los cuales se determinan la cantidad de nitrógeno absorbido mediante la diferencia del ingerido en la dieta administrada y el nitrógeno eliminado por heces. Hay dos tipos de digestibilidad:

- a) **Digestibilidad aparente (Da):** la cual no es una medida exacta de la digestibilidad del nitrógeno de la dieta, ya que sólo considera el nitrógeno fecal exógeno (heces).
- b) **Digestibilidad verdadera (D):** la cual considera el nitrógeno fecal endógeno que incluye el nitrógeno de bacterias, de descamaciones de las células de la mucosa intestinal, enzimas metabólicas, etc. (10)

La digestibilidad de la proteína de las semillas de las leguminosas es generalmente baja en comparación con las proteínas animales. La causa de este valor se debe a la presencia de factores tales como: taninos, fibra, pectinas, gomas, lectinas, inhibidores de tripsina, entre otros. Los procesos térmicos moderados pueden mejorar la digestibilidad de la proteína por la destrucción de los factores antinutricionales termolábiles y la apertura de la estructura proteica causada por la desnaturalización facilitando la hidrólisis enzimática. (36)

## 2.5 Tratamientos de destoxificación.

De acuerdo a Paracelso, la toxicidad de una sustancia va en función de la cantidad ingerida y de la sensibilidad del organismo que lo ingiere; además, muchos de estos compuestos se inactivan o eliminan cuando son sometidos a calor u otro tratamiento de destoxificación. Por lo cual, la toxicidad debe valorarse siempre considerando las cantidades y formas de consumo en los productos destinados a la alimentación.

Las limitaciones que los factores antinutricionales imponen al consumo de las leguminosas varían de acuerdo a la especie. No obstante, la destoxificación puede lograrse mediante procesos químicos y biológicos, los cuales van desde los más sencillos como la germinación o una simple cocción con agua, hasta aquellos que involucren una o varias extracciones o purificaciones que pueden resultar bastante laboriosos y costosos. (16) Como se demuestra en el estudio realizado por L. Jiménez, en 1994, donde propuso un tratamiento térmico con presión y condiciones específicas de temperatura y tiempo seguido de una extracción con disolventes para la semilla seca de *E. americana* con el fin de eliminar factores antinutricionales y tóxicos (específicamente alcaloides), cuidando no causar algún daño en la cantidad y calidad de la proteína presente, el resultado del proceso de destoxificación aplicado a la harina de *E. americana* fue del 91% para el contenido de los inhibidores de tripsina, mientras que para las lectinas y los alcaloides estos fueron eliminados casi por completo. (28)

Entre los procesos a los que son sometidos los alimentos se encuentra el tratamiento térmico con el cual se propician diferentes reacciones en las que llegan a intervenir todos los compuestos

presentes; algunas de las modificaciones que ocurren son benéficas, otras, son dañinas y se van presentando en función de la intensidad del tratamiento térmico. (20) Las referencias demuestran que los efectos tóxicos de las leguminosas pueden ser parcial o totalmente eliminados por métodos apropiados de cocción, además de que se presenta un incremento del valor nutricional de la proteína de dichas semillas mientras que no exista un exceso en el tiempo y temperatura aplicados, ya que las proteínas pueden presentar modificaciones no deseables que disminuyan su calidad biológica. (16)

#### **2.5.1 Calidad de la cocción.**

La cocción es considerada uno de los procedimientos más antiguos en la preparación de alimentos. (21) En las leguminosas, el principal propósito del cocimiento es suavizar el grano para hacerlo comestible y desarrollar su sabor y aroma, lo que mejora sus características sensoriales y nutricias. (15)

El tiempo de cocimiento necesario para inactivar los factores antinutricionales es menor al que se requiere para ablandar las semillas, lo que podría asegurar la desactivación de las sustancias dañinas termolábiles tales como los inhibidores de enzimas (por ejemplo la tripsina), lectinas; además, induce la volatilidad de compuestos como el ácido cianhídrico y algunos de los componentes desagradables, reduce el nivel de taninos. (20)

La calidad de la cocción representa el tiempo que el grano necesita para ser suavizado, ésta se ve influenciada por distintos factores:

- « la variedad de la semilla,
- « la composición química del grano,
- « las condiciones de almacenamiento (humedad, tiempo y temperatura),
- « los tratamientos previos (escaldado, remojo)
- « condiciones de cocción (con o sin presión, adición de algún tipo de sal). (37)

Cuando se aplica calor, uno de los cambios más significativos en la proteína es una modificación (positiva o negativa) del valor de la REP, ya que un exceso de tiempo de cocción puede disminuir la calidad de la proteína. Un incremento en el valor de la REP es causado por distintas razones con un proceso de desnaturalización de las proteínas trayendo consigo los siguientes efectos:

- a) se abren los polipéptidos y los enlaces peptídicos internos se exponen, lo que facilita la acción de las enzimas digestivas sobre éstos,
- b) los aminoácidos azufrados y el triptofano, biológicamente, son más disponibles,
- c) desactivación de los factores tóxicos y antinutricionales termolábiles,
- d) desactivación de algunas enzimas digestivas que pueden causar daños a las proteínas. (32)

La cocción es un buen método para destoxificar de factores termolábiles a las leguminosas; no obstante, es necesaria la adecuada aplicación de ésta.

# Capítulo 3. Metodología



# METODOLOGÍA

En la figura 3.1 se muestra el diagrama general de trabajo de este estudio, posteriormente se explica cada paso de manera detallada.

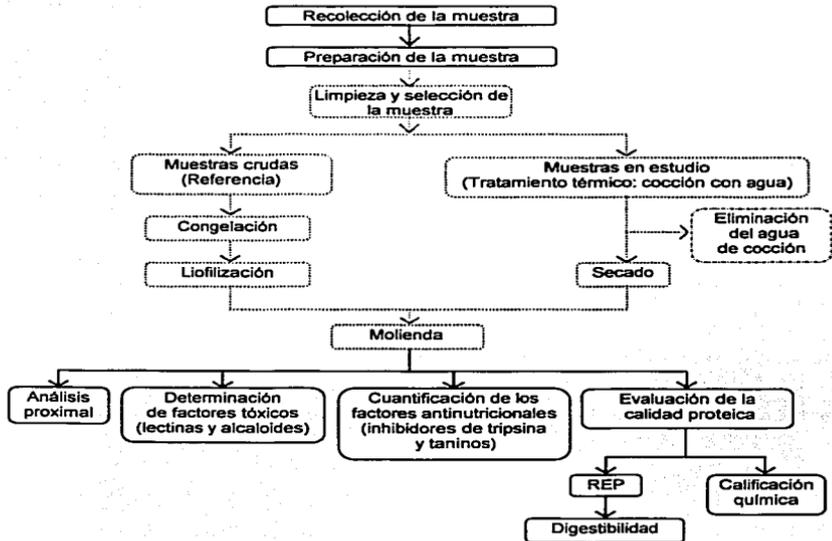


Fig. 3.1 Diagrama general de Trabajo

### 3.1 Recopilación de la Materia Prima.

Los ejotes de *Erythrina americana* (Fig. 3.2), de entre 6 y 8 semanas de desarrollo, fueron recolectados de árboles localizados en el Campo Universitario de la Ciudad de México; su caracterización botánica fue previamente realizada.

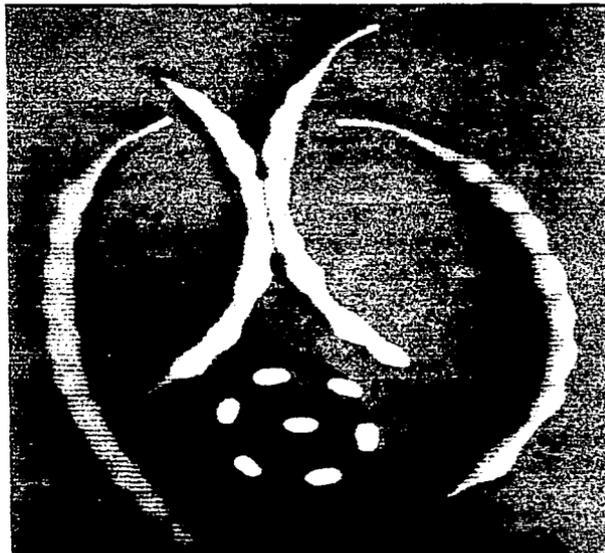


Fig. 3.2. Ejotes y semillas inmaduras de *Erythrina americana*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2 Preparación de la muestra.

Los ejotes de *E. americana* recolectados fueron sometidos a una selección y limpieza, donde se eliminó la materia extraña, mediante una franela impregnada de una solución de hipoclorito de sodio al 10% seguida de otra impregnada de agua destilada. Las características de las muestras fueron:

(1) las semillas inmaduras de *Erythrina americana*, se obtuvieron del interior de los ejotes recolectados, presetaron los siguientes parámetros:

color: blanco

tamaño: 10 a 15 mm. de largo

forma: ovoide con un estrangulamiento en la parte central, teniendo así la forma arrañada.

(2) el ejote completo de la *Erythrina americana*, son vainas verdes de 10 a 20 cm. de largo que contienen de 2 a 10 semillas,

#### 3.2.1 Muestras de referencia.

Esto corresponde a las muestras crudas (semilla inmadura y el ejote), las cuales recibieron, por separado, el siguiente proceso:

- ↳ Seccionado de las muestras.
- ↳ Pesaje de la muestra.
- ↳ Congelación de las muestras y el posterior almacenamiento en congelación hasta la etapa siguiente.
- ↳ Liofilización: hasta verificar que la muestra presentó la eliminación de la mayor cantidad de humedad (teniendo una apariencia de polvillo). Se hizo con el propósito de evitar modificaciones bioquímicas y daños al tejido de las muestras.
- ↳ Molienda: con una malla de 0.5 mm.
- ↳ Homogenización.
- ↳ Almacenaje en recipiente de plástico a temperatura ambiente.

### 3.2.2 Muestras en estudio.

Esto corresponde a las muestras (semilla inmadura y el ejote) que fueron sometidas al tratamiento térmico, por separado, de acuerdo al siguiente proceso:

- ⊕ Seccionado de las muestras, por separado.
- ⊕ Pesado de la muestra con agua para tener una relación 1:5 (material biológico:agua).
- ⊕ Tratamiento térmico: cocción en agua hirviendo por dos horas hasta un cocimiento completo.
- ⊕ Eliminación del agua de cocimiento de cada muestra.
- ⊕ Lavado con agua destilada: para eliminar restos del agua de cocimiento.
- ⊕ Retirar el exceso de agua.
- ⊕ Secado: Se colocaron en charolas en capas delgadas y se sometieron a corrientes de aire a 50°C. Hasta que la muestra mostró la eliminación de la mayor cantidad de humedad.
- ⊕ Molienda: con una malla de 0.5 mm.
- ⊕ Homogenización manual.
- ⊕ Almacenaje en recipiente de plástico a temperatura ambiente.

#### • Equipo empleado:

Liofilizadora marca LABCONCO mod. 4.5

Balanza granataria marca August Sauter

Estufa de circulación forzada, marca LAB-LINE mod. Impereal III

Molino marca Thomas-Wiley, mod. 4

### 3.3 Caracterización Bromatológica.

El análisis bromatológico o proximal se realizó de acuerdo a las técnicas descritas en el AOAC<sub>(33)</sub>, las determinaciones fueron: **humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda**, las cuales se realizaron por triplicado.

Mientras que los **hidratos de carbono asimilables** fueron calculados por diferencia:

$$\%CHO's \text{ asimilables} = 100 - (\%Fibra \text{ cruda} + \%Grasa + \%Humedad + \%Proteínas + \%Cenizas)$$

### 3.4 Determinación de factores antinutricionales y tóxicos.

Algunas de las técnicas para la determinación de los factores tóxicos y antinutricionales requieren de muestra desengrasada, por lo que se siguió la técnica mencionada anteriormente para la determinación de grasa; además, de la preparación de reactivos específicos, las cuales se encuentran en el anexo A.

### 3.4.1 Determinación de lectinas. (35)

#### Fundamento:

La detección de lectinas o hemaglutininas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de microaglutinación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra; además de glóbulos lavados y activados con una solución de pronasa ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

#### Material/Reactivos:

- ◆ Parrilla múltiple con agitación marca *THERMOLINE*, Mod.4
- ◆ Centrifuga marca *International Clinical Centrifuge*, Mod A3076x-2
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- ◆ Incubadora marca *BLUE-M*
- ◆ Espectrofotómetro marca *SEQUOIA-TURNER*, Mod. 340
- ◆ Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>)
- ◆ Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- ◆ Filtro de vidrio con fibra de vidrio
- ◆ Sangre de Hámster desfibrinada y lavada
- ◆ Solución anticoagulante (Anexo A.1)
- ◆ Solución salina al 1.0%
- ◆ Solución salina al 0.9%
- ◆ Solución de pronasa de *S. griseus* (SIGMA P-5005) al 0.2% en solución salina

#### Procedimiento:

##### a) Preparación del extracto:

Se requiere 1 gramo de muestra finamente molida y con un contenido de grasa <5%, el cual se suspende en 10 mL de solución salina

al 1%, se efectúa una extracción con *agitación mecánica* durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de fibra vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

**b) Preparación de la sangre:**

Una vez que se sangra al animal (hámster), la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante (heparina), agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante (no interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se transvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

**c) Sensibilización de los glóbulos rojos:**

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1 mL de solución de pronasa y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina al 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4%, por lo cual cada 1.0 mL de paquete de eritrocitos se le adiciona 24 mL de solución salina al 0.9%.

*Nota:* Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario filtrar esta suspensión, pero lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocando dentro de un embudo de cuello corto.

**d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:**

Se toma 0.1 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 mL de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permite el paso de solo 1 cm<sup>2</sup> de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se debe obtener será de 24-29% de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

**e) Microtitulación:**

En las placas tipo "V" del microtiter, colocar en cada pozo de una hilera 50 µL de solución salina al 0.9%.

En seguida, se llena por contacto con la superficie del extracto problema el microdilutor de 50  $\mu\text{L}$  y se procede a realizar las diluciones seriadas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión.

**Nota:** Es recomendable verificar que el volumen que se esté tomando el microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza en una placa de prueba.

Por último, con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada. Después se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37° c por espacio de 1 hora.

**F) Lectura:**

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

***Aglutinación negativa:*** se observa la formación de un punto rojo definido con un halo transparente.

***Aglutinación positiva:*** se observa una turbidez rojiza, sin sedimentación de eritrocitos.

Se reporta la máxima dilución que presenta aglutinación

**Nota:** Cuando se trabaja con una sangre de alta sensibilidad (como Hámster o ratón) o un extracto de título alto, es conveniente realizar un mayor número de diluciones.

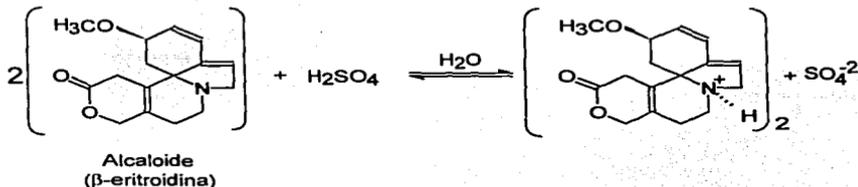
### 3.4.2 Cuantificación de alcaloides por titulación. (39)

#### Fundamento:

La mayoría de los alcaloides presentes en las plantas o semillas se encuentran en forma de sales o combinaciones solubles, además de, tener propiedades de un álcali, poseen distinta solubilidad en disolventes orgánicos en función del pH. (19) Este método se basa en la extracción de los alcaloides aprovechando estas características mediante un disolvente orgánico como lo es el metanol, alcalinizándolo para asegurar que todos los alcaloides presentes estén en forma de sales.

La cuantificación de los alcaloides totales extraídos se realiza mediante una valoración por volumetría empleando un ácido debido a las propiedades básicas de los alcaloides.

#### Reacción:



#### Reactivos:

- ◆ Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.02 N (valorado con cálculos hasta la cuarta cifra decimal)
- ◆ Solución indicadora de Rojo de Metilo
- ◆ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00 N
- ◆ Hidróxido de amonio concentrado (NH<sub>4</sub>OH)
- ◆ Sulfato de sodio anhidro

- ◆ Metanol Q.P. (para extracción)
- ◆ Metanol R.A. (para titulación)
- ◆ Éter etílico R.A
- ◆ Cloroformo R.A

**Procedimiento.**

1. Pesar 5 gramos de muestra molida y tamizada (malla 0.5 mm).
2. Adicionar 50 mL de metanol previamente alcalinizado a pH 8 ó 9, con  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
3. Agitar (300-500 r.p.m.) durante 8 horas, y después filtrar con ayuda de vacío usando papel Whatman No. 541.
4. Al residuo adicionar nuevamente 50 mL de metanol alcalinizado y agitar 16 horas más. El filtrado guardarlo en refrigeración.
5. Filtrar con ayuda de vacío (en el mismo embudo y con el mismo papel del día anterior), recibiendo el filtrado en el matraz que se guardo en refrigeración. Lavar el vaso y el residuo con 20 mL de metanol alcalinizado.
6. Evaporar el disolvente por medio de rotavapor ( $T = 50^\circ\text{C}$ ).
7. Disolver el extracto en 15 mL de éter y 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.00 N.
8. Filtrar a través de papel Whatman No. 541, recibiendo en un embudo de separación. Extraer recuperando la fase acuosa (inferior).
9. Extraer tres veces la fase orgánica (superior) con 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y verter en un embudo de separación.
10. Adicionar 25 mL de cloroformo y extraer, recuperando la fase acuosa (superior).
11. Extraer tres veces la fase orgánica (inferior) con 5 mL de agua y 5 mL de ácido cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y extraer dos veces con 10 mL de cloroformo.
12. Recuperar la fase acuosa (superior) y filtrarla a través de papel Whatman No. 2, enjuagando el papel y el embudo con 2 mL de agua.

13. Alcalinizar con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado hasta un pH de 9 o mayor.
14. Extraer tres veces con 35 mL de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior).
15. Secar con sulfato de sodio anhidro y evaporar en rotavapor ( $T = 40^\circ\text{C}$ ).
16. Redisolver el residuo con 3 mL de metanol (uno por uno), trasvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contiene 7 mL de agua destilada.
17. Adicionar una gota de indicador rojo de metilo y titular con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  valorado, con ayuda de una bureta de microtitulación (exactitud de 0.01 mL).

NOTA. Esta es una determinación cuantitativa, así que se debe enjuagar el material empleado con los disolventes adecuados en cada paso.

#### Cálculos.

Se reporta como  $\beta$ -eritroidina:

$$\frac{\text{g de } \beta\text{-eritroidina}}{100 \text{ g de muestra}} = \frac{(\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados por la muestra} - \text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados por un blanco}) (N_{\text{H}_2\text{SO}_4}) (0.273) (100)}{(\text{g de muestra})}$$

Notas:

- ^ El blanco se prepara con 7 ml de agua destilada y 3 ml de metanol
- ^^ Peso molecular de la  $\beta$ -eritroidina / 1000 (meq)

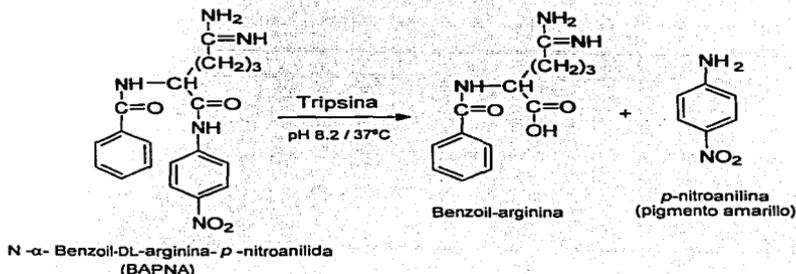
### 3.4.3 Determinación de Inhibidores de tripsina. (40)

#### Fundamento:

Se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina, y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro ( $\lambda=410\text{nm}$ ). Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

#### Reacción:



**Material/Reactivos:**

- ◆ Potenciometro marca CORNING, mod. 10
- ◆ Parrilla múltiple con agitación marca *THERMOLINE*, Mod. SP-13025
- ◆ Espectrofotómetro marca *SEQUOIA-TURNER*, Mod. 340
- ◆ Baño maría GRANT, mod. SE 10
- ◆ Mezclador de tubos LAB-Line, mod. Super-mixer
- ◆ NaOH 0.01N
- ◆ Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M (Anexo A.2)
- ◆ Solución BAPNA a 37°C (Anexo A.3)
- ◆ Ácido acético al 30%
- ◆ Solución estándar de tripsina a 37°C (Anexo A.4)
- ◆ HCL 0.001N
- ◆ Tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- ◆ Vasos de precipitado
- ◆ Buretas de 50 mL

**Procedimiento:**

a) Preparación del extracto:

Se pesa 1 g de muestra finamente molida desengrasada en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH de esta suspensión a  $9.6 \pm 0.2$  y se afora a 50 mL con NaOH 0.01N. A continuación se transvasa a un vaso de precipitado que contenga un agitador magnético, agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se quita el magneto y se deja ½ hora en reposo, y por decantación se obtiene el sobrenadante eliminado el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40-60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad:

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido son pipeteados a tubos de ensaye ajustando el volumen a 2.0 mL.

Se adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina con agua destilada, agitar. Se mantiene en contacto inhibidor de tripsina-tripsina por espacio de 10 min., en un baño de agua a 37°C.

A continuación se adicionan 5 mL de la solución de BAPNA a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 min. exactos (con cronómetro) en el baño de agua. La acción enzimática se detiene por la adición de 1 mL de ácido acético al 30%; el cual debe agitar inmediatamente en vortex.

Cuando por la adición del ácido acético al tubo de reacción se enturbie o forme precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman No. 1); para ello es necesario dejar el tubo en reposo por 15 min. El filtrado obtenido debe ser transparente.

Nota: Cuando se trabaja con extractos que presentan coloraciones indeseables pueden interferir en la determinación; por lo que es conveniente tomar una alícuota mas de cada una de las porciones, las cuales servirán como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2.0 mL de la solución de tripsina, inmediatamente después se adiciona 1.0 mL de ácido acético al 30% y por último los 5.0 mL de solución de BAPNA, en estos tubos no es necesario el control exacto de tiempo.

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm. Y es necesario para cada una de las alícuotas del extracto, primeramente ajustar el equipo a 100% de transmitancia con su respectivo blanco. Hay que recordar que el tubo con 0.0 mL de extracto es el tubo de referencia sobre el cual se basan los datos (40 µg de tripsina/10 mL). Se registran las lecturas en absorbancia.

**Cálculos:**

La lectura de absorbacia (A), directamente se puede pasar a unidades de tripsina (U.T.), donde  $U.T. = A \times 100$ . De la serie de alícuotas del extracto, se tendrá una serie de valores de U.T., los cuales al restarse este valor al dato de referencia, se obtendrá los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas.

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria. El valor extrapolado es el más cercano a la actividad inhibitoria real.

Nota: Cuando se obtiene una correlación lineal no satisfactoria ( $r < -0.9$ ) se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas, reportando en términos de U.T.I./mL

Es conveniente reportar las unidades de inhibición por miligramo de proteína de la muestra. De no tener éste dato, se puede reportar las unidades de inhibición con respecto a un miligramo de muestra:

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

donde:

B = valor extrapolado o promedio (U.T.I.)  
 F = factor de dilución, (F= Aforo/alícuota<sub>i</sub>),  
 cuando se trabaja el extracto directo F=1

### 3.4.4 Determinación de taninos. (41)

#### Fundamento:

Se basa en la extracción de los taninos hidrolizables y condensados (fenoles totales) mediante dimetilformamida al 75% y la posterior reducción del ión férrico debida a los iones polifenoles con la subsiguiente formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, cuantificando espectrofotométricamente a  $\lambda=525\text{nm}$ .

#### Material/Reactivos:

- ◆ Parrilla múltiple con agitación marca *THERMOLINE*, Mod. SP-13025
- ◆ Espectrofotómetro marca *SEQUOIA-TURNER*, Mod. 340
- ◆ Centrifuga para tubos marca *DYNAC*
- ◆ Tubos de centrifuga con graduación de 50 mL
- ◆ Solución de dimetilformamida (DMF) al 75% (Anexo A.5)
- ◆ Solución estándar de ácido tánico (Anexo A.6)
- ◆ Solución citrato férrico de amonio (Anexo A.7)
- ◆ Hidróxido de amonio (Anexo A.8)
- ◆ Tubos de ensaye 16 x 150 mm
- ◆ Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- ◆ Vasos de precipitados

#### Procedimiento:

##### a) Preparación del extracto:

Se pesa 1g de muestra finamente molida y desengrasada en un vaso de precipitado y se le adicionan 25 mL de la soln. de DMF (exactos). Agitar en una parrilla durante 60 min. a 500 r.p.m. Después, se mantiene en reposo durante 15 min.

Transferir cuantitativamente el sobrenadante a un tubo de centrifuga. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante  $10\pm 1$  min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante, el cual se empleará para la determinación.

b) Preparación de la curva patrón:

En cinco matraces volumétricos de 25 mL se añaden alícuotas de 1, 2, 4, 6 y 7 mL de solución estándar de ácido tánico en cada uno. Se afora cada uno a 25 mL con la solución de DMF.

Rotular 6 tubos de ensaye. Al tubo 1 se coloca 1 mL de la soln. de DMF, 6 mL de agua desionizada y 1 mL de amoniaco; mientras que, a los tubos 2-6 se coloca 1 mL de cada matraz, además de 5 mL de agua desionizada, 1 mL de cada uno de los reactivos citrato férrico amoniacal y amoniaco. En cada adición, agitar con vortex. Después de  $10 \pm 1$  min., se procede a la lectura.

**Nota:** Se debe realizar al mismo tiempo que las muestras.

c) Cuantificación de taninos:

Rotular tres tubos de ensaye por cada muestra, uno se considera blanco y los otros dos problemas de las muestra, colocar a cada tubo 1 mL de alícuota del extracto.

El tubo "blanco" se adiciona 6 mL de agua desionizada y 1 mL de amoniaco; mientras que, los tubos 1 y 2 se colocan 5 mL de agua desionizada, 1 mL de cada uno de los reactivos citrato férrico amoniacal y amoniaco. En cada adición, agitar con vortex. Después de  $10 \pm 1$  min., se procede a la lectura.

d) Lectura:

Ajustar el espectrofotómetro a  $\lambda=525$  nm, contra una blanco de agua. Transferir la mezcla de reacción a celdas de medición. Para leer las absorbancia de cada una. Primero se mide la absorbancia de la curva

patrón, y posteriormente, los blancos con sus respectivos problemas de cada muestra.

Trazar una gráfica de absorbancia vs concentración de ácido tánico (en  $\mu\text{g}$ ). Interpolan las lecturas de absorbancia para obtener los valores de concentración de cada muestra.

Notas:

Si los datos están fuera del rango de la curva patrón, realizar:

a) pesar una menor cantidad de muestra,

b) tomar una menor alícuota del extracto y diluir con la solución de DMF.

Si la curva no pasa por el origen no se debe corregir al cero de la escala.

Cálculos:

Para cada muestra, el valor del blanco es restado del valor de cada problema y se promedia el valor de los problemas. Se reporta como gramos de ácido tánico (A.T.) por 100 gramos de muestra (es decir, el porcentaje).

$$\% \text{ de A.T.} = \frac{(\mu\text{g de A.T.})^*}{(1\text{mL de ext.})} \times \frac{(25\text{mL de ext.})}{(\text{gramos de muestra})} \times \frac{(1\text{g de A.T.})}{(10^6 \mu\text{g de A. T.})} \times 100$$

donde:

\*Corresponde a la interpolación del promedio de concentración de la muestra.

### 3.5 Evaluación de la calidad proteica.

Para valorar la calidad de la proteína de las muestras, los criterios empleados fueron: un método químico (*calificación química*) y dos métodos biológicos (*Relación de Eficiencia Proteica y Digestibilidad aparente*).

#### 3.5.1 Calificación Química (*Chemical Score*). (42)

**Fundamento:**

Se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína de estudio, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia. (16) Se calcula el valor químico de cada aminoácido:

$$\text{Valor químico del aminoácido: } [(AA_x)/(AA_{REF})]*100$$

Donde:

$AA_x$  = Aminoácido esencial de la proteína en estudio, en g/(16gN ó 100 g de proteína)

$AA_{REF}$  = Aminoácido esencial de la proteína de referencia, en g/(16gN ó 100 g de proteína)

A partir de lo anterior, la calificación química se define como:

**C.Q. = el menor valor de la relación {Valor químico del aminoácido}**

Tiene que haber homogeneidad en unidades usadas tanto de la proteína en estudio como de referencia, Se calcula el contenido de aminoácidos esenciales, no olvidando adicionar las cantidades de cistina

y tirosina, ya que es conveniente reportar como total de aminoácidos azufrados y aromáticos respectivamente.

Antes de calcular la calificación química se debe determinar el contenido de aminoácidos en las muestras.

### **3.5.1.1 Cuantificación de aminoácidos por HPLC en fase reversa con derivatización precolumna. (43, 44)**

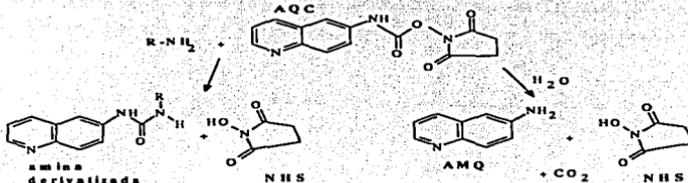
#### **Fundamento:**

Para la cuantificación de aminoácidos en alimentos, debe existir previamente una etapa de hidrólisis. La hidrólisis ácida en fase de vapor (HCl 6 N, 0.1% de fenol), es una adaptación que permite incrementar el rendimiento del proceso de hidrólisis, pues las pérdidas por oxidación de aminoácidos se reducen debido a la combinación de Nitrógeno y vacío durante la preparación de las muestras a hidrolizar, el contacto de HCl gaseoso con la muestra y un control eficiente de la temperatura y tiempo de hidrólisis (145°C, 4 hrs.). (45)

Los derivados de aminoácidos formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato son estables y permiten incrementar la precisión del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización precolumna, debido a una relativa menor manipulación de la muestra durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados después de haber hidrolizado la proteína. (46) El derivado formado también permite mejorar la sensibilidad en el análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa con detección fluorescente o en UV, además de, presentar selectividad (con aminas

primarias y/o secundarias) y facilitar el desarrollo del análisis, en comparación con otros métodos de derivatización. (47)

### Reacción de derivatización entre aminas primarias o secundarias y AQC:



- AQC = 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato  
 R-NH<sub>2</sub> = amina primaria o secundaria  
 AMQ = aminoquinolina  
 NHS = N-hidroxisuccinamida  
 CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

### Material/Reactivos:

#### Hidrólisis

- Estación de trabajo Pico Tag, Waters
- Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag (1)
- Bomba de alto vacío RV8, Edwards
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, Corning (3)
- Cortador de vidrio o marcador de tinta permanente Esterbrook de Berol
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 200-1000 µL, Finnpiptette
- Vórtex Super mixer modelo 1290, Lab-line instruments
- ✓ Agua destilada y desionizada<sup>a</sup>
- ✓ Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) sólido<sup>b</sup>
- ✓ Metanol (Q.P.)
- ✓ Nitrógeno de alta pureza (99.997%), INFRA
- ✓ HCl 6 N, 0.1% de fenol<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Utilizar agua purificada de 18 Mohm de resistividad o agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22 µm.

<sup>b</sup> Se puede sustituir el baño de dióxido de carbono (sólido)--metanol por hielo común.

<sup>c</sup> Se puede utilizar HCl 6N de punto de ebullición constante, agregando un cristal del fenol durante la preparación de la muestra a hidrolizar.

**Preparación de la muestra**

- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200  $\mu\text{L}$ , Finnpiquette
  - Pipeta Pasteur (3)
  - Vórtex súper mixer modelo 1290, Lab-line instruments
  - Matraz aforado de 5 mL (3), matraz aforado de 1 mL (3)
  - Jeringas de 10 mL (9)
  - Acrodisco de nylon, 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, Gelman
  - Tubos de ensayo de 10 x 70 mm, Pyrex (9)
  - Cartucho Sep Pak C<sub>18</sub> Classic, Waters (3)
  - ✓ Norleucina 5 mM-HCl 10 mM<sup>d</sup>
  - ✓ Acetonitrilo:Agua 20:80<sup>e</sup>
  - ✓ Acetonitrilo grado HPLC, JT-Baker
  - ✓ Agua destilada y desionizada<sup>f</sup>
- para cuantificar aminoácidos en muestras con menos de 20% de material proteico

**Derivatización**

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, Corning (3)
- Parrilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate Corning, con baño de agua a 55° C
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 5-50  $\mu\text{L}$ , Finnpiquette
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200  $\mu\text{L}$ , Finnpiquette
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 100-1000  $\mu\text{L}$ , Finnpiquette
- Vórtex Super mixer modelo 1290, Lab-line instruments
- Parafilm
- ✓ Estándar de aminoácidos H 2.5 mM, excepto Cistina: 1.25 mM, Pierce
- ✓ Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), Waters<sup>g</sup>

**Análisis cromatográfico**

- Sistema de entrega de disolventes (2), modelo 510, Waters
- Inyector Rheodyne con loop de 20  $\mu\text{L}$
- Jeringa para HPLC 25  $\mu\text{L}$ , Hamilton
- Detector UV-Vis Waters 486, Waters
- Horno y unidad de control de temperatura para la columna, modelo III, Waters
- Controlador automático de gradiente modelo 680, Waters
- Adquisición e integración de datos Chromjet modelo 54076, Waters
- Sistema de filtración a vacío (2), Millipore
- Filtro de tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  tipo HA, Millipore
- Filtro de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  tipo GV, Millipore

<sup>d</sup> Disolución de Norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1 M suficiente para obtener 10 mM al final

<sup>e</sup> 200 mL de acetonitrilo grado HPLC, más 800 mL de agua purificada (según a)

<sup>f</sup> AccQ Fluor Reagent Kit de Waters

- Filtro pre columna en línea, Waters
- Columna AccQ-Tag Nova Pak C<sub>18</sub>, tamaño de partícula 4 mm, de 3.9 mm x 150 mm, Waters
- ✓ AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos), Waters
- ✓ Acetonitrilo (grado HPLC), JT Baker
- ✓ Agua destilada y desionizada<sup>3</sup>

### Procedimiento:

- I. Preparación de la estación de trabajo (Anexo B.1)
- II. Preparación de la muestra: secado.

Se pesa, por triplicado, 10 mg de la muestra seca y desengrasada (15 mg en el caso de muestras con menos de 20% de proteína) en el interior de cada tubo de vidrio de 4 x 50 mm, previamente marcado. Se agrega una gota de agua (aproximadamente 50  $\mu$ L) y se agita durante unos segundos en el vortéx, con la finalidad de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición a los vapores de HCl. Los tres tubos se depositan en el interior del vial de reacción. (Fig. 3.3).

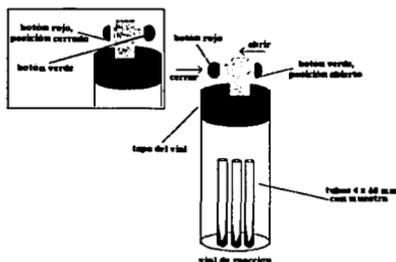


Fig. 3.3 Vial de reacción.

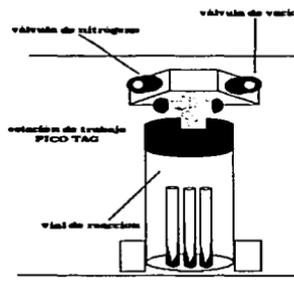


Fig. 3.4 Vial de reacción en la estación de trabajo.

FALTA DE ORIGEN  
TESIS CON

Se coloca la tapa y se desliza el botón rojo a la posición *abierto* (los viales de reacción deben estar secos, para lo cual se introducen en la estación de trabajo *vacíos* y en la posición *abierto*, tras lo cual se abre la válvula de vacío y se dejan así hasta que alcancen una presión de 50-70 milíTorr, figuras 3.3 y 3.4). El vial se coloca en la estación de trabajo, se abre la válvula de nitrógeno durante 10-15 segundos, después se abre lentamente la válvula de vacío hasta alcanzar una presión de 1-2 Torr. Abrir y cerrar la válvula de nitrógeno para controlar la espuma y ebullición de la mezcla con la muestra para evitar pérdidas por proyección del material al exterior del tubo. Una vez que ha desaparecido la espuma, se cierra la válvula de nitrógeno y se mantiene abierta la del vacío hasta secar las muestras (cuando la presión sea de 50-70 milíTorr). Se cierra la válvula de vacío y se retira el vial de la estación de trabajo. (Fig. 3.4)

### III. Preparación de las muestras: purga con nitrógeno.

Se agregan 200  $\mu\text{L}$  de HCl 6N con 0.1 % de fenol (o 200  $\mu\text{L}$  de HCl de punto de ebullición constante, añadiendo un cristal de fenol) en el fondo del vial de reacción, cuidando no introducir ácido al interior de los tubos con muestra. Para purgar el vial de hidrólisis, se cierra el vial y se introduce nuevamente en la estación de trabajo (Fig. 3.4), se abre lentamente el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr de presión, se mantiene abierto hasta que ha empezado la ebullición del ácido clorhídrico (si no ocurre en 30 segundos, se continúa con la purga); se cierra el vacío y se purga el vial con nitrógeno durante 5 segundos; se cierra el nitrógeno y se repite éste ciclo dos veces más. Al finalizar el tercer ciclo, se abre el vacío del mismo modo y se mantiene hasta que alcance una presión ligeramente menor a 1 Torr. Se cierra el vial deslizando el botón verde a la posición cerrado, cerrar el vacío y sacar el vial de reacción de la estación de trabajo (Fig. 3.3).

#### IV. Hidrólisis en fase de vapor.

Una vez finalizada la preparación, se introduce el vial al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145° C (colocando el botón *oven* en la posición de encendido y ajustando la temperatura con la perilla *temp* al mismo tiempo que se mantiene hacia arriba el botón *set*), durante 4 horas.

#### V. Eliminación del exceso de ácido clorhídrico (HCl).

Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se saca el vial del horno, se deja enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de extracción, se desliza el botón rojo a la posición abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que se generaron durante el proceso; después se abre el vial de reacción y se sacan los tubos con los hidrolizados, se enjuaga el exterior de cada uno con agua y se depositan en un vial de reacción seco. Después, se procede a eliminar el exceso de ácido del interior de cada uno de los tubos con ayuda de vacío; se tapa el vial asegurando que se encuentra en la posición abierto, se introduce en la estación de trabajo y se abre el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr, se mantiene abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo sea de 50-70 miliTorr. Se cierra el vial, se cierra el vacío y se conservan los hidrolizados en una atmósfera inerte hasta su posterior preparación (hasta por 2 semanas).

#### VI. Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa

##### **a) Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado.**

A cada uno de los tubos con hidrolizado se agregan 100  $\mu$ L de Norleucina 5 mM - HCl 10 mM, el primero como estándar interno y el ácido clorhídrico para rehidratar y extraer los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agita un minuto en vórtex y se deja reposar un minuto para después agregar de 100 a 200  $\mu$ L de acetonitrilo 20%, agitar un minuto más en vórtex y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 mL con ayuda de una pipeta pasteur, lavar con acetonitrilo al 20% y

agitar cuanto sea necesario hasta que la solución de lavado sea incolora (volumen total menor a 5 mL, 1 mL para muestras con menos de 20% de proteína), transfiriendo cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 5 o 1 mL, según sea el caso. Llevar al aforo con agua purificada (concentración final de norleucina: 0.1 mM, 0.5 mM para muestras con 20% o menos de proteína).

***b) Preparación de las muestras: purificación y filtración.***

Se procede a purificar la muestra con la ayuda de un cartucho Sep Pak C<sub>18</sub>, el cual deberá estar previamente activado de la siguiente manera:

*Mediante una jeringa, se hacen pasar lentamente (1-2 mL/minuto) 6 mL de acetónitrilo grado HPLC por el cartucho (conectado a la jeringa por la parte más larga), inmediatamente después, se hacen pasar 6 mL de agua purificada.*

Una vez que se ha activado el cartucho y sin que se seque, se hacen pasar los 5 mL de la muestra, desechándose los primeros 2 mL y recuperando en un tubo de ensaye el resto de la muestra que contiene los aminoácidos. Se filtra la muestra a través de un acrodisco de nylon de 0.2 µm de tamaño de poro, conectado en la punta de otra jeringa, desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperando el resto, del cuál será tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

***c) Derivatización.***

***◀ Reconstitución de AQC.***

Precalear la parrilla con baño de agua a 55 °C. Asegurar que la totalidad del reactivo de derivatización AQC (vial 2A) se encuentra en la parte inferior del vial. Enjuagar la punta de la micropipeta de 1000 µL, cargándola con 1000 µL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B) y desechándolos, para después transferir 1000 µL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstituir el reactivo de derivatización (vial 2A). Cierre el vial herméticamente y agite (con Vórtex) por 10 s. Calentar (no más de 10 minutos) el vial 2A en la parrilla hasta la disolución del reactivo de derivatización

AQC. Guardar en refrigeración cuando no es utilizado, cuidando de exponerle lo menos posible a la humedad del ambiente para evitar su degradación.

« *Preparación de un estándar de aminoácidos.*

Mezclar 80  $\mu\text{L}$  de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20  $\mu\text{L}$  de norleucina 5 mM - HCl 10 mM y 900  $\mu\text{L}$  de agua purificada (80  $\mu\text{L}$  de la solución stock de aminoácidos, 100  $\mu\text{L}$  de norleucina 5 mM - HCl 10 mM y 820 de agua purificada para preparar el estándar de referencia para la cuantificación de muestras con 20% o menos de proteína) para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Gly, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM (cistina, 0.1 mM) con 0.1 mM de norleucina como estándar interno (0.5 mM en el caso del estándar para muestras con menos de 20% de proteína).

« *Derivatización de aminoácidos.*

En un tubo de ensayo de 4 x 50 mm, depositense 10  $\mu\text{L}$  del estándar de aminoácidos o de la muestra purificada y filtrada, evitando que la punta de la pipeta toque las paredes del tubo; agréguese 70  $\mu\text{L}$  del buffer de boratos (reactivo 1), agítase el tubo en un vórtex por 10 segundos y finalmente se agregan 20  $\mu\text{L}$  del reactivo de derivatización ya reconstituido, vial 2A, se agita en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC), se cubre con parafilm la boca del tubo y se introduce en el baño de agua a 55° C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina. Se deja enfriar y se puede conservar durante 1 semana en congelación a -10° C.

**d) Análisis cromatográfico**

- (1) Preparación de fase móvil (A y B), ver Anexo B.2.
- (2) Instalación del HPLC, ver Anexo B.3.
- (3) Acondicionamiento del equipo, ver Anexo B.4.

(4) Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos, ver Anexo B.5.

(5) Cálculo del contenido de aminoácidos.

Obtener el área del pico de cada uno de los aminoácidos del aminograma obtenido por el registrador.

Calcular el contenido de cada uno de los 17 aminoácidos comparando la relación  $\text{Área}_{\text{aminoácido}}/\text{Área}_{\text{norleucina}}$  de la muestra contra la relación  $\text{Área}_{\text{aminoácido}}/\text{Área}_{\text{norleucina}}$  del estándar de aminoácidos, de acuerdo a la siguiente ecuación, para reportar el contenido en  $\text{g}_{\text{aminoácido}}/16 \text{ g N}$ .

$$\text{C. a.a.} = 1.6 * [(A_{aa}/A_{n-leu})_{\text{mtra}} * (A_{n-leu}/A_{aa})_{\text{std}} * C_{\text{std}} * a * \text{P. M.}_{aa}] / [m * \% \text{N}]$$

donde:

C. a.a. = Contenido de aminoácido (g/16 g de Nitrógeno)

$A_{aa}$  = área del aminoácido dado

$A_{n-leu}$  = área de norleucina

mtra = en la muestra

std = en el estándar

$C_{\text{std}}$  = concentración del aminoácido dado en el estándar

a = aforo del hidrolizado

$\text{P.M.}_{aa}$  = peso molecular del aminoácido dado

m = peso de la muestra (miligramos)

%N = porcentaje de nitrógeno en la muestra seca desengrasada

### 3.5.1.2 Cuantificación de triptofano. (46)

#### Fundamento:

El triptofano y parcialmente la tirosina se destruyen con la hidrólisis ácida, por tanto es necesario para su cuantificación realizar una hidrólisis alcalina, basada en la relativa estabilidad del anillo del indol de los residuos de triptofano a pH alcalino.

Haciendo uso de hidróxido de litio como principal reactivo alcalino y el subsiguiente desarrollo de coloración con un reactivo menos específico como el *p*-dimetilaminobenzaldehído y nitrito de sodio como contraste; se cuantifica espectrofotométricamente el triptofano. (47)

#### Reactivos/Material:

- ⊕ Solución estándar de triptofano (Anexo A.14)
- ⊕ Solución de *p*-dimetilaminobenzaldehído (*p*-DMAB) al 5% (Anexo A.15)
- ⊕ Nitrito de Sodio al 2% (Anexo A.16)
- ⊕ Hidróxido de litio (LiOH) 4 N
- ⊕ Ácido ortofosfórico concentrado (85%)
- ⊕ Solución lavadora de agua:etanol (3:1)
- ⊕ Digestor marca TECATOR mod. AB
- ⊕ Potenciómetro marca CORNING mod.10
- ⊕ Balanza analítica
- ⊕ Rotavapor marca BUCHI mod. RE/111
- ⊕ Vortex marca LAB-LINE mod. Mistral
- ⊕ Espectrofotómetro marca SEQUOIA-TURNER, Mod. 340
- ⊕ Matraz buchner
- ⊕ Embudo Kitasato
- ⊕ Embudo de filtración rápida
- ⊕ Papel filtro Whatman de poro cerrado
- ⊕ Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta interior de teflón.

**Procedimiento:**

a) Curva estándar de 0 a 100 µg de triptofano.

Para realizar la curva estándar se toman 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mL de la solución estándar de triptofano (0.05 mg/mL). Llevar a 2.0 mL cada uno de los tubos con agua y adicionar 7.5 mL de p-DMAB al 5%. Agitar y dejar 15 minutos en la oscuridad, agregar 0.5 mL de nitrito de sodio, agitar y dejar en reposo 15 minutos en la oscuridad. Leer absorbancias a 590nm.

**Nota:** se realiza al mismo tiempo que la muestra.

b) Procedimiento para la muestra.

**Hidrólisis alcalina:** de acuerdo al porcentaje de proteína en la muestra, calcular aproximadamente la cantidad de la muestra y volumen de LiOH requeridos; utilizando las fórmulas siguientes:

$$A = [0.1 / P] \times 100$$

$$B = [4 / P] \times 100$$

Donde:

**A** = cantidad de muestra (gramos)

**B** = volumen de LiOH 4 N (mililitros)

**P** = porcentaje de proteína en la muestra analizada

Colocar la cantidad de muestra calculada (A) en un tubo de cultivo y taparlo. Adicionar el volumen de LiOH 4 N calculado (B) tratando de humedecer toda la muestra, sin salpicar la muestra en la pared del tubo. Insuflar nitrógeno a la muestra y cerrar rápidamente el tubo lo más

hermético posible. La hidrólisis de la muestra se lleva a cabo a  $145 \pm 1^\circ\text{C}$ , el tiempo esta en función del contenido de proteína:

Proteína (%)	Tiempo de hidrólisis (horas)
9 a <35	8
35 a ≤ 64	6
> a 65	4

Después del tiempo de hidrólisis, enfriar a temperatura ambiente, transvasar el contenido del tubo a un vaso de precipitados de 25 mL, lavando el tubo con la solución lavadora de etanol:agua (aproximadamente 20 mL). Se neutraliza el hidrolizado con ácido ortofosfórico concentrado ( $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ ) y agitación constante, aforar a 25 mL. Filtrar en caliente sobre papel de filtración rápida en un büchner con ayuda de vacío (cuando no se realiza la determinación el mismo día, se guarda en congelación y se checa el pH antes de la determinación).

**Lectura:** Tomar tres alícuotas de 2 mL del hidrolizado y colocarlas en un tubo de ensaye. Un tubo será el blanco de la muestra, a éste se le adicionan 7.5 mL de HCl concentrado, en tanto que a los otros dos se les agregan 7.5 mL de *p*-DMAB al 5%. Agitar y dejar 15 minutos en la oscuridad, después de este tiempo se les agrega a los 3 tubos 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitan y se dejan en reposo 15 minutos en la oscuridad. Leer absorbancias a 590nm. Se usa como blanco el cero de la curva estándar.

c) Cálculos.

A los tubos problema se les resta la absorbancia del blanco de la muestra y el resultado se interpola en la curva estándar, se toma en cuenta el aforo y la alicuota usados, y si hubo una dilución de la muestra. Se reporta g de triptofano/100 g de proteína (ó 16 g de nitrógeno), para obtener los g de triptofano/100g de proteína:

$$\text{g de Trp/100g de Prot.} = [(T/a)(V_{\text{HID}}/A)]/B * [100 \text{ g de proteína}]$$

donde:

- T = gramos de triptofano (interpolados)
- a = alicuota del hidrolizado (para estas muestras se  
tomo una alicuota del hidrolizado de 0.5 mL y  
se llevó a un volumen de 2 mL con agua)
- V<sub>HID</sub> = volumen total hidrolizado, (25 mL)
- A = peso de la muestra (g)
- B = gramos de proteína/ 100 g de muestra

### 3.5.2 Pruebas biológicas.

Para llevar a cabo las pruebas biológicas se consideraron los siguientes criterios.

#### Animales:

Se emplearon ratas machos recién destetadas de la raza *Sprague Dawley* de 21 días de edad con un peso de  $40 \pm 10g$  (7 por cada lote) colocadas en jaulas individuales, distribuidas mediante la técnica de culebra japonesa (Anexo C).

#### Condiciones experimentales:

- ◆ Temperatura: 20-25°C
- ◆ Iluminación: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
- ◆ Alimentación: dieta respectiva de cada lote y agua *ad libitum*
- ◆ Tiempo de experimentación: 28 días para el REP y 8 días para la Digestibilidad aparente

#### Material/Reactivos:

- ⌘ Rack de jaulas individuales
- ⌘ Balanza granataria para animales de laboratorio
- ⌘ Balanza granataria de un platillo
- ⌘ Comederos para ratas
- ⌘ Bebederos
- ⌘ Charolas de papel
- ⌘ Caseína SIGMA lote 61H0127 C-3400 (89.19% de proteína)
- ⌘ Dextrosa ( $\alpha$ -D-Glucosa anhidra, Grado III) SIGMA No. G-5000 lote 39-0086
- ⌘ Mezcla de Sales ROGERS-HAPPER
- ⌘ Mezcla de Vitaminas TEKLAD, HARLAN No.40060

### 3.5.2.1 Relación de la eficiencia proteica (REP). (42)

#### Fundamento:

Se basa en un índice de crecimiento, el cual relaciona la ganancia en peso del animal con la proteína consumida, asumiendo que el incremento en peso es exclusivamente del nitrógeno ingerido. Este índice es sensible a la disponibilidad de los aminoácidos y puede ser usado para evaluar el efecto global de una dieta proteínica. (34)

#### Procedimiento:

Esta prueba fue diseñada para todas las muestras y tuvo duración de 28 días en las condiciones ya definidas. La composición de la dieta de cada muestra de *E. americana* (tabla 3.1) fueron isoproteínicas e isocalóricas a una dieta control de caseína con 10% de proteína y 430 Kcal/100 g de dieta.

Tabla 3.1. Composición de las dietas con 10% de proteína y 430 Kcal/100 g de dieta

Ingrediente	Composición de las dietas ( gramos)				
	Control	A <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	D <sup>4</sup>
Caseína (89.19% de proteína)	11.21	-	-	-	-
Harina de semilla inmadura cruda	-	33.09	-	-	-
Harina de ejote crudo	-	-	48.08	-	-
Harina de semilla inmadura cocida	-	-	-	32.76	-
Harina de ejote cocido	-	-	-	-	46.77
Sacarosa (comercial)	22.00	18.44	15.76	19.35	17.20
Dextrosa ( $\alpha$ -D-Glucosa anhidra, Grado III) SIGMA	19.00	15.93	13.61	16.71	14.86
Dextrina (comercial)	25.00	20.96	17.91	21.99	19.55
Manteca Vegetal (comercial)	8.00	5.49	6.40	4.71	5.50
Aceite de Maíz (comercial)	6.00	4.12	4.80	3.54	4.12
Mezcla de Sales ROGERS-HAPPER	4.00	2.67	0.91	3.10	2.16
Mezcla de Vitaminas TEKLAD, HARLAN	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Celulosa (comercial)	2.79	-	-	-	-

1. La dieta A corresponde a la fuente de proteína de la semilla inmadura cruda de *E. americana*.
2. La dieta B corresponde a la fuente de proteína del ejote crudo de *E. americana*.
3. La dieta C corresponde a la fuente de proteína de la semilla inmadura cocida de *E. americana*.
4. La dieta D corresponde a la fuente de proteína del ejote cocido de *E. americana*.

El alimento y agua se proporcionó "ad libitum" a las ratas. Se llevó a cabo un registro del alimento consumido así como del incremento peso de cada animal de experimentación cada 48 horas (Anexo D).

#### Cálculos:

Se calcula el REP para cada una de las ratas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{REP} = \Delta P / [\Sigma AI \cdot F]$$

donde:

$\Delta P$  = incremento de peso total (en gramos)

$\Sigma AI$  = alimento ingerido total (en gramos)

F = % de proteína en la dieta/100

Con cada unos de los valores individuales, se procedió a calcular el promedio y el coeficiente de variación (C.V. en %) del lote en estudio.

$$\text{CV} = [\sigma / X] \cdot 100$$

donde:

$\sigma$  = desviación estándar

X = REP promedio

Para que los datos puedan ser comparados, es necesario expresarlos en valores de REP ajustado, es decir, considerar el valor de 2.5 para la dieta de caseína (referencia).

$$\text{REP ajustado} = \text{REP exp.} \cdot \frac{\text{REP Caseína (ref.)}}{\text{REP Caseína (exp.)}}$$

Además, se trazó una gráfica de curva de crecimiento (tiempo vs. incremento de peso acumulado) para observar el crecimiento de los lotes en estudio con respecto al control.

### 3.5.2.2 Digestibilidad aparente (Da). (42)

#### Fundamento:

La evaluación de la digestibilidad de proteínas *in vivo* se basan en suministrar una dieta que contiene la muestra en estudio como única fuente de proteína a los animales experimentales, de los cuales se determina la cantidad de nitrógeno absorbido mediante la diferencia del ingerido y el eliminado por heces, sin considerar el nitrógeno endógeno.

#### Materiales:

- ⌘ Diseño experimental del bioensayo de REP
- ⌘ Equipo y reactivos necesarios para MicroKjeldahl
- ⌘ Envases de plástico de boca ancha con tapa de 200 mL aprox.
- ⌘ Cernidor
- ⌘ Mortero con pistilo
- ⌘ Estufa de circulación forzada, marca LAB-LINE mod. Impereal III
- ⌘ Balanza analítica

#### Procedimiento:

Empleando las mismas fuentes de proteína usadas en el desarrollo experimental de la prueba biológica de REP, se inició una vez que los animales estén adaptados a la dieta por evaluar (día 21 del experimento de REP). Se requirió de la recolección de heces y registro de alimento ingerido en forma individual de los animales, durante los últimos ocho días del bioensayo.

El total de heces de cada animal en el periodo indicado, se secaron, pesaron y molieron para obtener el material lo más homogéneo posible; se tomó una muestra representativa del total de heces para determinar la concentración de nitrógeno.

Determinar la concentración de nitrógeno de la dieta y de las heces de cada animal por MicroKjeldahl durante el mismo periodo mediante la concentración de proteína de la dieta y la cantidad consumida en dicho periodo.

**Cálculos:**

Calcular el contenido de nitrógeno ingerido (NI) y el nitrógeno fecal (NF) de cada animal de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$NI = (\% \text{ Nitrógeno}_{\text{DIETA}} * \text{Dieta ingerida}) / 100$$

$$NF = (\% \text{ Nitrógeno}_{\text{HECES}} * \text{Total de Heces}) / 100$$

La formula para calcular la Digestibilidad aparente es la siguiente:

$$Da = \frac{\text{N absorbido}}{\text{N ingerido}} \times 100$$

$$Da = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

Se reporta el valor promedio de digestibilidad aparente de cada lote con su desviación estándar y C.V.

### **3.6 Recopilación de datos.**

Los datos obtenidos de los análisis de caracterización bromatológica, determinación de factores tóxicos y antinutricionales, y cuantificación de aminoácidos se agruparon considerando como triplicado válido el conjunto de datos con un coeficiente de variación menor o igual a 10%; en caso de presentar un coeficiente mayor, el análisis se realizaba por segunda ocasión. Mientras que, en el caso de las pruebas biológicas se consideró septuplicado con un coeficiente de variación menor a 15%.

### **3.7 Análisis Estadístico.**

Para determinar las diferencias entre los datos obtenidos de las determinaciones de caracterización bromatológica, determinación de factores tóxicos y antinutricionales, y pruebas biológicas de las muestras se utilizaron las medias de cada determinación. Para evaluar estadísticamente la semejanza de las medias de las muestras se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una-vía mediante el software de Statgraphic (v.5)/PC 1991. El rango de confianza considerado fue de 95%.

En el caso de presentarse una diferencia significativa en el análisis de varianza se procedió a identificar donde se presentaba la diferencia mediante la aplicación de la prueba de rango múltiple de acuerdo a DUNCAN.

# Capítulo 4, Resultados y Discusión



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Caracterización bromatológica.

En las tablas 4.1 y 4.2 muestran los resultados del análisis proximal de las muestras. Los datos que se presentan son los promedios y desviación estándar, con coeficiente de variación C.V.<10%, (n=3). La semilla seca cruda de la *E. americana*, fisiológicamente madura, es utilizada como referencia. En la caracterización de las muestras de *E. americana* en base húmeda (tabla 4.1), se observa que los componentes como proteína, grasa y carbohidratos no alcanzan un nivel del 20%, debido a la gran cantidad de agua (alrededor del 80%) como es el caso de la mayoría de las legumbres o frutos inmaduros. Al comparar la composición de la semilla inmadura cruda con la semilla seca cruda se observa que existe una diferencia significativa entre estas, con lo que se ratifica que con el tiempo de maduración varía la composición de los nutrientes principales.

Para una mejor comparación, se muestran los datos en base seca (tabla 4.2). Se observa que el efecto de la cocción en el contenido de proteína de las muestras no es significativo, aunque la fibra aportada por la vaina del ejote tiene un efecto diluyente en el contenido de proteína, éste aún se considera alto (más del 25%), lo que hace que se destaque de otras plantas. Con la cocción se perdieron alrededor del 30% de algunos componentes como hidratos de carbono y cenizas, lo que modificó la relación de otros componentes como el contenido de grasa y fibra cruda, los cuales posiblemente se concentraron y por consecuencia su valor se ve incrementado por lo que prevalece una diferencia significativa después del tratamiento térmico.

Tabla 4.1 Caracterización bromatológica de las muestras de *Erythrina americana* (g/100 g de muestra, base húmeda)

Muestras	Humedad Gruesa	Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas	Hidratos de carbono*	
Semilla seca cruda	9.22 ± 0.07 <sup>a</sup>	31.42 ± 0.46 <sup>d</sup>	12.48 ± 0.45 <sup>f</sup>	16.55 ± 1.33 <sup>c</sup>	3.65 ± 0.27 <sup>c</sup>	26.68	
Semilla inmadura	CRUDA	83.55 ± 3.22 <sup>b</sup>	5.27 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.27 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.81 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.41
	COCIDA	84.43 ± 1.92 <sup>b</sup>	5.07 ± 0.13 <sup>c</sup>	2.51 ± 0.92 <sup>b</sup>	3.62 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.90
Ejote	CRUDO	85.09 ± 4.26 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.90 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.47
	COCIDO	86.27 ± 2.56 <sup>b</sup>	3.17 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.37 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.70

\* Los hidratos de carbono asimilables se obtienen por diferencia.

Los datos representan los promedios ± desv. est. de triplicados, C.V. < 10%.

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

Tabla 4.2 Caracterización bromatológica de las muestras de *Erythrina americana* (g/ 100 g de muestra, base seca)

Muestras		Proteína cruda	Grasa cruda	Fibra cruda	Cenizas	Hidratos de carbono*
Semilla seca cruda		$34.61 \pm 0.51^c$	$13.74 \pm 0.49^b$	$18.27 \pm 1.40^a$	$4.02 \pm 0.29^b$	29.36
Semilla inmadura	CRUDA	$30.04 \pm 0.64^b$	$13.77 \pm 0.29^b$	$17.07 \pm 1.43^a$	$4.21 \pm 0.10^b$	34.91
	COCIDA	$32.44 \pm 0.82^b$	$16.09 \pm 0.60^a$	$23.25 \pm 0.57^b$	$3.00 \pm 0.19^a$	25.22
Ejote	CRUDO	$24.38 \pm 1.01^a$	$6.11 \pm 0.27^c$	$26.14 \pm 1.04^c$	$6.64 \pm 0.09^c$	36.73
	COCIDO	$23.12 \pm 1.01^a$	$6.64 \pm 0.38^c$	$31.80 \pm 2.15^d$	$4.27 \pm 0.37^b$	34.17

\* Los carbohidratos asimilables se obtienen por diferencia.

Los datos representan los promedios  $\pm$  desv. est. de triplicados, C.V. < 10%.

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

En la figura 4.1 se tiene una mejor visualización de la comparación del análisis proximal de las muestras de *E. americana*. Al comparar la semilla seca cruda con el resto de las muestras, presentan un mismo nivel de proteína, además de que las muestras en estudio presentan un alto contenido de proteína y considerable contenido de grasa, ya que la mayoría de las leguminosas promedio aporta un máximo de 6% de material lipídico. No obstante, existen diferencias entre el ejote y la semilla inmadura debido a la vaina, además de aportar fibra, disminuye el contenido de proteína y grasa principalmente.

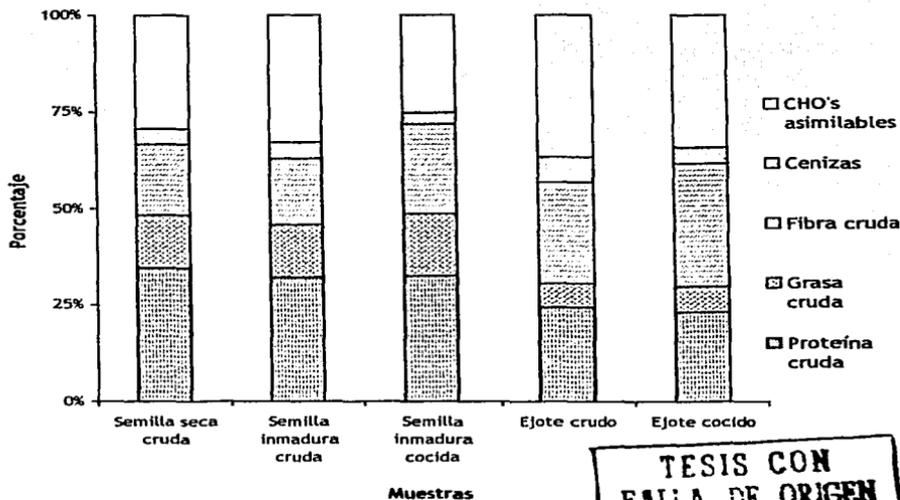


Fig. 4.1 Caracterización bromatológica de las muestras de *Erythrina americana* (base seca)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 4.2 Determinación de los factores antinutricionales y tóxicos.

La determinación de los factores se realizaron en los cuatro tipos de muestras, los datos que se presentan son los promedios y desviación estándar de triplicados, con coeficiente de variación (C.V.) <10%.

### 4.2.1 Lectinas.

Además de las muestras analizadas, se determinó el contenido de lectinas a el frijol negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) y la semilla seca cruda de la *Erythrina americana* para tener una referencia. Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Determinación de Lectinas en *P. vulgaris* y *E. americana*

Muestras		T*
<i>P. vulgaris</i> (semilla seca cruda)		>24
<i>E. americana</i> (semilla seca cruda)		>10
Semilla inmadura de <i>E. americana</i>	CRUDA	6
	COCIDA	3
Ejote de <i>E. americana</i>	CRUDO	5
	COCIDO	3

\* T = Título, el cual es la máxima dilución del extracto de lectinas capaz de aglutinar eritrocitos de hámster.

De los datos obtenidos, se observa que los niveles de lectinas presentes en la *Erythrina americana* (tanto semilla seca cruda como con la semilla inmadura y ejote) son menores comparados con el *Phaseolus vulgaris*. Las muestras de la semilla inmadura y el ejote presentan títulos menores que la semilla seca; aunque el cocimiento no las elimina si las disminuye, pero estos títulos se consideran de bajo riesgo para la salud.

#### 4.2.2 Alcaloides.

El contenido de alcaloides reportado para la semilla seca cruda de *Erythrina americana* <sup>(39)</sup> se tomó como referencia por lo que no se consideró en el análisis estadístico. Los resultados se muestran en la tabla 4.4.1 y en la tabla 4.4.2.

En la tabla 4.4.1 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de alcaloides en la muestra original, se observa que las muestras crudas de semilla inmadura y ejote presenta aproximadamente el 10% del contenido de alcaloides en relación al de la semilla seca cruda, además de no presentar una diferencia significativa. Mientras que, en las muestras donde se aplicó el tratamiento térmico, se observa que el contenido de alcaloides disminuyó un 60% aproximadamente con respecto a sus respectivas muestras crudas, además de que no existe una diferencia significativa entre éstas.

Tabla 4.4.1 Contenido de alcaloides de las muestras de *Erythrina americana*, considerando su humedad total

Muestras	(g de alcaloides /100 g de muestra)
Semilla seca cruda	0.959 ± 0.02700
Semilla inmadura cruda	0.127 <sup>b</sup> ± 0.00895
Semilla inmadura cocida	0.044 <sup>a</sup> ± 0.00297
Ejote crudo	0.101 <sup>b</sup> ± 0.00580
Ejote cocido	0.041 <sup>a</sup> ± 0.00321

Los datos representan los promedios ± desv. est. de triplicados, C.V.<10%.

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

Los alcaloides se consideran compuestos termorresistentes, la mayoría de estos se encuentran en forma de sales que pueden ser solubles en agua, lo cual podría explicar que éstos se hayan transferido al líquido de cocción.

Considerando los valores en base seca (tabla 4.4.2), se observa que el contenido de alcaloides de las muestras crudas no es mayor a 1%, lo cual sigue siendo menor con respecto a la semilla seca cruda; así también, hay una disminución mayor del 25% de la cantidad de éstos después de la cocción, principalmente en el ejote, presentando una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 4.4.2 Contenido de alcaloides de las muestras de *E. americana* (base seca)

Muestras	g de alcaloides / 100 g de muestra
Semilla seca cruda	1.056 ± 0.028
Semilla inmadura cruda	0.769 <sup>d</sup> ± 0.054
Semilla inmadura cocida	0.214 <sup>a</sup> ± 0.015
Ejote crudo	0.669 <sup>c</sup> ± 0.038
Ejote cocido	0.301 <sup>b</sup> ± 0.023

Los datos representan los promedios ± desv. est. de triplicados, C.V. = 10%.  
Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

Algunas especies de lupinos pueden contener 2% o más de alcaloides totales en la semilla seca, el consumo de éstas como principal componente en la dieta podría ser fatal; sin embargo, el rango máximo permitido del contenido de alcaloides en estas especies es de 0.02% (50). Aunque el tratamiento térmico aplicado tanto a la semilla inmadura como al ejote redujo el contenido de alcaloides, los niveles encontrados aún son altos considerando el dato registrado para lupinos. Además, los alcaloides típicos de la especie *Erythrina* tienen una acción semejante al curare, por lo que se debe tener un consumo restringido, aunque los niveles contenidos después del tratamiento térmico probablemente son dañinos puede ser solucionado mediante la mezcla con algún cereal para disminuir aún más estos valores y por consecuencia reducir el posible riesgo al organismo que los ingiere.

### 4.2.3 Inhibidores de Tripsina.

Los valores de inhibidores de tripsina de la semilla seca cruda de la *Erythrina americana* y la semilla seca cruda del frijol de soya (*Glycine max*) se emplearon como referencia, por lo que no se incluyen en el análisis estadístico.

Tabla 4.5 Contenido de Inhibidores de Tripsina en muestras de *G. max* y *E. americana*

Muestras	Inhibidores de Tripsina <sup>▲</sup>
Semilla seca Cruda de <i>G. max</i> *	49.350 ± 3.689
Semilla seca cruda de <i>E. americana</i> *	85.184 ± 0.242
Semilla inmadura cruda	88.432 <sup>c</sup> ± 6.846
Semilla inmadura cocida	1.897 <sup>a</sup> ± 0.157
Ejote crudo	28.671 <sup>b</sup> ± 0.822
Ejote cocido	1.769 <sup>a</sup> ± 0.177

▲ Unidad de Tripsina Inhibida (U.T.I.)/mg de muestra seca. Una unidad de tripsina (U.T.) = 0.01 unidades de absorbanza a 410 nm.; \* Estos datos se obtuvieron en el laboratorio.  
 Los datos representan los promedios ± desv. est. de triplicados, C.V. < 10%.  
 Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

Los resultados de las muestras analizadas se presentan en la tabla 4.5, en la cual se observa que la semilla inmadura cruda tiene el mayor contenido de inhibidores de tripsina con respecto a las muestras analizadas, mientras que el ejote crudo presenta la menor cantidad de éstos, lo que hace notar que los inhibidores se acumulan en la semilla y que la vaina inmadura del ejote sirve como diluyente del contenido de éstos.

Mientras que, en las muestras cocidas el valor de inhibidores de tripsina se redujo más del 90% con respecto a sus respectivas muestras crudas, lo cual se esperaba debido a que estos compuestos son termolábiles, además entre las muestras de semilla inmadura y ejote cocidos no existe diferencia significativa en el contenido de inhibidores de tripsina. Cabe mencionar que un contenido mayor de 10 unidades de inhibidores de tripsina se considera que causan daño a la salud del organismo que los ingiere, problema presente en las muestras crudas cuyo contenido es muy elevado en el caso de la semilla inmadura y semilla seca, y en menor grado, pero significativo, en el ejote; mientras que las muestras cocidas no tienen este problema.

#### 4.2.4 Taninos.

La semilla seca cruda de la *Erythrina americana* se utilizó como referencia, y no se incluyó en el análisis estadístico. Los resultados de las muestras analizadas se presentan en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Contenido de taninos de las muestras de *E. americana*

Muestras	(g Ac. Tánico/100 g mtra. seca.)
Semilla seca cruda*	0.120 ± 0.005
Semilla inmadura cruda	0.373 <sup>d</sup> ± 0.010
Semilla inmadura cocida	0.232 <sup>c</sup> ± 0.010
Ejote crudo	0.174 <sup>b</sup> ± 0.010
Ejote cocido	0.138 <sup>a</sup> ± 0.010

\* Estos datos se obtuvieron en el laboratorio.

Los datos representan los promedios ± desv. est. de triplicados, C.V.<10%.

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

Por el método ISO, algunos autores reportan de 0.1 a 0.78% de taninos en el frijol negro, especie rica en taninos; sin embargo, no hay un valor puntual en el cual el contenido de taninos tenga un efecto nocivo. En cualquier caso, cuando se añaden a una ración cantidades elevadas de taninos (mayor a 2%), tanto condensados como hidrolizables, se observa una disminución en la ingestión, así como de la digestibilidad de los compuestos nitrogenados, pero con numerosas variaciones según sea la composición de las raciones y los aminoácidos implicados, debido a que los taninos se ligan mas fuertemente a las moléculas grandes de proteína y a las proteínas altas en los aminoácidos prolina y metionina. (51)

El contenido de taninos en las muestras en estudio es menor al 0.4%, pero se observa que después del tratamiento térmico el contenido de éstos disminuyó a niveles en lo que se podrían considerar poco significativos para un efecto dañino en el organismo que los consume, para asegurar que no exista efecto alguno debido a los taninos presentes se puede solucionar mediante la mezcla de algún cereal para disminuir estos valores. (52)

### 4.3 Evaluación de la calidad proteínica

Los resultados de la calidad proteínica se presentan por cada método empleado.

#### 4.3.1 Composición de aminoácidos

En la tabla 4.7 se muestran los resultados del análisis por HPLC de la composición de aminoácidos de la semilla inmadura cruda y cocida con su porcentaje de pérdida aparente después del cocimiento.

Tabla 4.7 Composición de aminoácidos de la semilla inmadura de *E. americana*

Aminoácido	Semilla inmadura (g / 100 g de proteína)		Pérdida <sup>a</sup> (%)
	CRUDA	COCIDA	
Triptofano <sup>b</sup>	1.269 ± 0.035	1.070 ± 0.136	15.7
Lisina	9.306 ± 0.376	7.380 ± 0.768	20.7
Isoleucina	5.755 ± 0.145	5.681 ± 0.124	1.3
Leucina	9.910 ± 0.328	9.819 ± 0.453	0.9
Valina	7.429 ± 0.087	7.043 ± 0.389	5.2
Treonina	3.374 ± 0.074	3.228 ± 0.251	4.3
Metionina	0.452 ± 0.014	0.439 ± 0.050	2.9
Cistina	0.150 ± 0.045	<sup>c</sup>	----
Fenilalanina	2.823 ± 0.212	2.311 ± 0.074	18.1
Tirosina	1.210 ± 0.015	1.156 ± 0.094	4.5
Histidina	3.410 ± 0.139	3.141 ± 0.186	7.9
Ácido aspártico	13.208 ± 0.430	8.612 ± 0.981	34.8
Ácido glutámico	17.583 ± 0.099	15.854 ± 0.264	9.8
Glicina	4.090 ± 0.081	4.024 ± 0.259	1.6
Alanina	6.339 ± 0.091	5.175 ± 0.313	18.4
Prolina	5.952 ± 0.084	5.648 ± 0.614	5.1
Serina	3.733 ± 0.330	3.515 ± 0.142	5.8
Arginina	6.440 ± 0.481	6.080 ± 0.116	5.6

Los datos que se presentan son promedios ± desv. est. (n=3), C.V. ≤ 15%

<sup>a</sup> La pérdida aparente del aminoácido =  $\left[ \frac{(aa_{\text{muestra cruda}} - aa_{\text{muestra cocida}})}{aa_{\text{muestra cruda}}} \right] \times 100$ ;

donde aa = valor del aminoácido expresado en (g de aminoácido/100 g de proteína)

<sup>b</sup> La determinación de Triptofano se realizó por hidrólisis alcalina;

<sup>c</sup> No cuantificable, la concentración es (<0.125) μMol.

En la tabla 4.8 se muestra los resultados del análisis por HPLC de la composición de aminoácidos del ejote crudo y cocido con su porcentaje de pérdida aparente después del cocimiento.

Tabla 4.8 Composición de aminoácidos del ejote de *E. americana*

Aminoácido	Ejote (g /100 g de proteína)		Pérdida <sup>a</sup> (%)
	CRUDO	COCIDO	
Triptofano <sup>b</sup>	1.310 ± 0.141	1.284 ± 0.028	2.0
Lisina	8.728 ± 0.464	7.696 ± 0.171	11.8
Isoleucina	4.270 ± 0.180	4.230 ± 0.089	0.9
Leucina	6.780 ± 0.173	6.727 ± 0.216	0.8
Valina	6.472 ± 0.471	5.730 ± 0.188	11.5
Treonina	3.064 ± 0.106	2.170 ± 0.196	29.2
Metionina	0.341 ± 0.051	0.340 ± 0.026	0.3
Cistina	0.444 ± 0.016	<sup>c</sup>	---
Fenilalanina	0.970 ± 0.028	0.826 ± 0.227	14.9
Tirosina	0.554 ± 0.021	0.538 ± 0.112	2.9
Histidina	3.669 ± 0.423	2.885 ± 0.197	21.4
Ácido aspártico	17.573 ± 0.057	11.325 ± 1.547	35.6
Ácido glutámico	19.121 ± 0.602	14.310 ± 0.862	25.2
Glicina	4.497 ± 0.260	3.271 ± 0.324	27.3
Alanina	6.661 ± 0.091	5.199 ± 0.408	21.9
Prolina	5.497 ± 0.345	4.771 ± 0.155	13.2
Serina	4.402 ± 0.276	3.593 ± 0.070	18.4
Arginina	4.864 ± 0.108	3.422 ± 0.180	29.7

Los datos que se presentan son promedios ± desv. est. (n=3), C.V. ≤ 15%

<sup>a</sup> La pérdida aparente del aminoácido =  $\left[ \frac{(aa_{\text{muestra cruda}} - aa_{\text{muestra cocida}})}{aa_{\text{muestra cruda}}} \right] \times 100$ ;  
donde aa = valor del aminoácido expresado en (g de aminoácido/100 g de proteína)

<sup>b</sup> La determinación de Triptofano se realizó por hidrólisis alcalina.

<sup>c</sup> No cuantificable, la concentración es (<0.125µMol).

En una evaluación del efecto del cocimiento en el contenido de aminoácidos de las leguminosas, con dos horas de tratamiento térmico (53), muestra que los aminoácidos más sensibles son metionina y menor grado fenilalanina. Sin embargo, en el caso de la semilla inmadura de la *E. americana* los aminoácidos más sensibles al tratamiento térmico fueron el ácido aspártico, alanina, y dentro de los aminoácidos esenciales fueron tisinina, fenilalanina, triptofano, cistina; mientras que los demás aminoácidos no

presentaron pérdidas aparentes considerables. Por otro lado, en el ejote presento mayor sensibilidad en la pérdida de aminoácidos principalmente no-esenciales, no obstante, el aminoácido no-esencial más sensible fue el ácido aspártico, y dentro de los aminoácidos esenciales sensibles al tratamiento térmico fueron los azufrados, treonina y en menor medida lisina y valina.

#### 4.3.2 Calificación química.

En la tabla 4.9 se muestra la calificación química de las muestras analizadas, se observa que las muestras de *E. americana* cumplen con los requerimientos de aminoácidos esenciales. No obstante, como toda leguminosa es deficiente en aminoácidos azufrados, y asociado a esto, la cocción afectó el contenido de algunos aminoácidos esenciales, específicamente la cistina, lo cual resulta en una disminución de la calificación química.

Tabla 4.9 Calificación Química de las muestras de *Erythrina americana*<sup>a</sup>

Aminoácido	Patrón FAO (1985) <sup>a</sup>	Semilla inmadura		Ejote	
		Cruda	Cocida	Crudo	Cocido
Triptofano*	0.50	1.269	1.070	1.310	1.284
Lisina	1.60	9.306	7.380	8.728	7.696
Isoleucina	1.30	5.755	5.681	4.270	4.230
Leucina	1.90	9.910	9.819	6.780	6.727
Valina	1.30	7.429	7.043	6.472	5.730
Treonina	0.90	3.374	3.228	3.064	2.170
Metionina <sup>d</sup>	} 1.70	0.602	0.439	0.785	0.340
Cistina					
Fenilalanina <sup>e</sup>	} 1.90	4.033	4.467	1.524	1.364
Tirosina					
total a.a. esenciales	11.10	41.68	39.13	32.93	29.54
C.Q.		35.41	25.82	46.18	20.00
aa limitante		azufrados	azufrados	Azufrados	azufrados

<sup>a</sup> El contenido de aminoácidos se expresan en g a.a./100 g de proteína, (100 g de proteína = 16 g de nitrógeno)

<sup>b</sup> La determinación de Triptofano se realizó por hidrólisis alcalina

<sup>c</sup> Requerimientos de a.a. esenciales para adultos, de acuerdo a la FAO/WHO (1985), g a.a./100 g de proteína. (54)

<sup>d</sup> Se considera la unión de los a.a. azufrados por que la Cys puede reemplazar aproximadamente el 30% de la Met.

<sup>e</sup> Se considera la unión de los a.a. aromáticos debido a que la Try puede reemplazar aprox. el 50% de Phe.

Para las leguminosas, la calificación química (C.Q.) se considera baja en aminoácidos azufrados (30-55)<sup>(20)</sup>, sin embargo, las muestras crudas de la semilla inmadura y el ejote muestran un C. Q. dentro del rango estimado pero menor al reportado para la semilla seca cruda (66.6)<sup>(18)</sup>, lo cual puede deberse a que el ejote está en desarrollo, por lo que su metabolismo está constantemente cambiando, por lo que el contenido de algunos aminoácidos es variable.

Mientras que, en las muestras cocidas disminuyó el valor de la C.Q. más del 30% debido a la sensibilidad de los aminoácidos azufrados al calor, este valor es menor al valor promedio de las leguminosas, lo cual podría ser mejorado mediante la suplementación con la proteína de algún cereal.

#### **4.3.3 Relación de Eficiencia Proteica (REP).**

En la figura 4.1 se observa la fotografía de una rata representativa de cada lote en el día 14 de experimentación.

En este bioensayo, los animales de los lotes de muestras crudas presentaron síntomas de desmejoría, tales como: *aletargamiento* (somnolencia profunda y prolongada, sin fiebre ni infección), *ataxia* (la inseguridad de movimiento como consecuencia de la falta de una actuación coordinada de los músculos), *piloerección* (erección del pelo) y diarrea<sup>(39)</sup>, provocando así una pérdida de peso considerable, lo cual se atribuye a la presencia de factores antinutricionales y tóxicos, principalmente a los tóxicos propios de esta especie (alcaloides), en niveles que dañan considerablemente al organismo; en el caso de los animales de la dieta de semilla inmadura sólo vivieron las dos primeras semanas mientras que los de la dieta de ejote vivieron 3 semanas.



Fuente de proteína: semilla cruda  
 $\Delta P = -15.38$  gramos



Fuente de proteína: ejote crudo  
 $\Delta P = -13.28$  gramos



Fuente de proteína: caseína (control)  
 $\Delta P = 39.56 \pm 7.22$  gramos

Fuente de proteína: semilla cocida  
 $\Delta P = 22.96 \pm 4.57$  gramos



Fuente de proteína: ejote cocido  
 $\Delta P = 22.96 \pm 4.57$  gramos



Fig. 4.1 Animales del bioensayo, en el día 14 de experimentación, de acuerdo a la fuente de proteína incluida en su dieta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

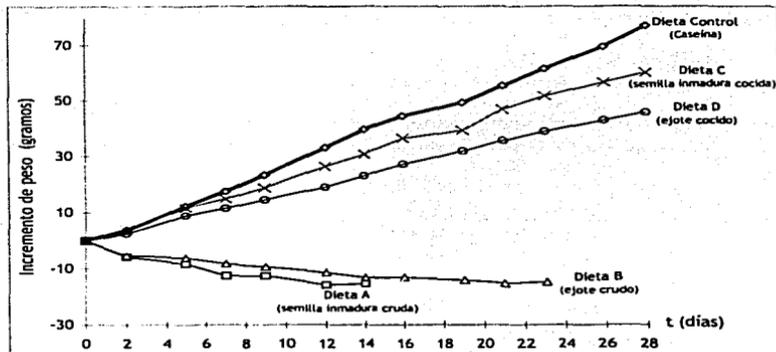


Fig. 4.2 Comparación del crecimiento de ratas alimentadas con *E. americana*.

El crecimiento de las ratas de cada lote puede visualizarse en la gráfica correspondiente al incremento de peso en función del tiempo (Fig. 4.2), donde se observa que los lotes de muestras crudas presentan una disminución de peso, siendo mayor esta pérdida en el grupo correspondiente a la semilla inmadura donde presentan el mayor contenido de los factores antinutricionales y tóxicos. De igual manera, se nota en el grupo de ejote crudo aunque en menor medida. Asimismo, se observa una correlación entre el contenido de alcaloides y el crecimiento, ya que en entre mas alto es el contenido de alcaloides (ver tabla 4.4.2), los animales alimentados con este material mostraron un mayor decremento en su peso original.

La curva de crecimiento de las ratas alimentadas con la dieta de la semilla inmadura cocida representa el crecimiento más alto de las muestras con una

tendencia cercana al control, lo cual puede atribuirse a la calidad proteica y un bajo contenido de factores antinutricionales y tóxicos, principalmente alcaloides, debido a la relación directa entre el contenido de alcaloides y el crecimiento de los animales. En el caso de los animales de las muestras cocidas no mostraron la sintomatología de los animales de las muestras crudas, pues tuvieron un desarrollo semejante al del grupo control. Los valores del REP se muestran en la tabla 4.10, donde se observa el valor de  $PER_{ajustado}$  de las muestras cocidas que se encuentra dentro del rango estimado para una leguminosa, que es de 0.9-2.1 siendo más frecuente el valor de 1.6<sub>(20)</sub>, hay reportes de leguminosas como la soya (*Glycine max*) que al ser sometidas a un proceso térmico el valor de REP se puede incrementar hasta 2.5<sub>(10)</sub>.

Tabla 4.10 Comparación del REP de las muestras de *Erythrina americana*

Fuente de proteína de las dietas		$PER_{promedio}^{\diamond}$	$PER_{ajustado}$
CASEÍNA		$3.056^c \pm 0.1672$	2.5000
SEMILLA INMADURA	CRUDA	*	
	COCIDA	$2.484^d \pm 0.1802$	2.0342
EJOTE	CRUDO	*	
	COCIDO	$2.120^a \pm 0.1095$	1.7357

$\diamond$  Los datos que se presentan son los promedios  $\pm$  desv. est. de septuplicados, C.V. <15%.

\* No se determinó debido a los animales murieron antes de finalizar el periodo de experimentación

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple.

La semilla inmadura cocida presenta un valor de REP alto y cercano al control, lo cual se corrobora con el crecimiento presentado por los animales de este lote, sin embargo es menor al valor de REP de 2.3 reportado para semilla seca destoxificada por extracciones<sub>(18)</sub>; mientras que, el ejote cocido es parecido al valor promedio de las leguminosas lo cual pueda deberse al alto contenido de fibra en éste.

#### 4.3.4 Digestibilidad aparente (Da).

Dado que los animales de los lotes de muestras crudas no sobrevivieron hasta el final del bioensayo, sólo se reportan los valores de digestibilidad aparente (Da) de los lotes control y muestras cocidas (tabla 4.9).

Tabla 4.9 Digestibilidad aparente (%)

Dieta	Da (%)
Caseína	98.498 <sup>c</sup> ± 0.345
Semilla inmadura cocida	90.486 <sup>b</sup> ± 1.046
Ejote cocido	86.550 <sup>a</sup> ± 1.068

Los datos que se presentan son los promedios ± desv. est. (n=7), C.V. <15%.

Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con  $\alpha=0.05$  de acuerdo con la prueba de rango múltiple

Para algunas leguminosas el valor reportado de digestibilidad aparente es de <80%<sup>(12)</sup>, aunque un tratamiento térmico adecuado puede incrementar la disponibilidad de la proteína y reducir la cantidad de los factores antinutricionales y tóxicos que limitan la calidad de la proteína, logrando así un incremento de este valor entre el 85-95%<sup>(13, 36)</sup>. Esto se observó en las muestras cocidas de la *Erythrina americana* ya que presentan una digestibilidad aparente >85%, siendo más alta en la semilla inmadura donde el contenido de fibra es menor. El alto contenido de fibra en las muestras pudo interferir en la absorción de nutrientes acelerando el tránsito del alimento a través del intestino; no obstante, podría ser un beneficio para evitar la acción de algunos tóxicos como los alcaloides. <sup>(11)</sup>

Aunque estos valores de digestibilidad sólo son una estimación cercana a la digestibilidad verdadera, nos indican que la proteína de la semilla inmadura y ejote cocidos tienen una alta biodisponibilidad, al cual es similar a la digestibilidad obtenida para la semilla seca cruda destoxicada por extracciones (86±3.1) <sup>(18)</sup>.

# Capítulo 5, Conclusiones



TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN

## CONCLUSIONES

El tratamiento térmico con agua y la posterior eliminación del líquido de cocción aplicado tanto a la semilla inmadura como al ejote de la *Erythrina americana* no mostró modificaciones considerables en el contenido de proteína; no obstante, parte de algunos componentes se transfirieron al líquido de cocción, como los minerales y carbohidratos, lo cual se reflejó en la disminución en el porcentaje presente en las muestras cocidas.

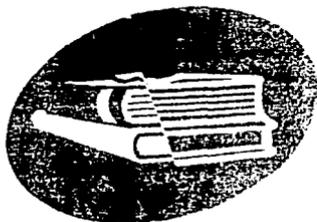
El cocimiento del ejote y de la semilla inmadura no logró eliminar en su totalidad el contenido de los alcaloides pero se redujo a niveles que probablemente no podría provocar daños a la salud, de igual forma sucedió con el contenido de lectinas, inhibidores de tripsina y taninos. Sin embargo, no se realizó pruebas de toxicidad a largo plazo para detectar efectos secundarios de los factores antinutricionales y tóxicos presentes después del proceso térmico, por lo cual será conveniente llevar a cabo este tipo de estudios.

La cocción con agua y la posterior eliminación del líquido de cocción efectuado en la *Erythrina americana* mejoró la calidad biológica de su proteína. La proteína de la semilla inmadura cocida presentó un mayor valor de la *Relación de Eficiencia Proteica y Digestibilidad aparente* que el ejote cocido; no obstante, fue menor que el control, debido a que el contenido de fibra es mayor la semilla inmadura y el ejote, por lo que podría reducir la asimilación de la proteína.

Se considera que la semilla inmadura y el ejote de *Erythrina americana* cocidos tienen una proteína vegetal buena; no obstante, la cocción no afectó considerablemente los aminoácidos esenciales, pero como toda leguminosa es deficiente en aminoácidos azufrados por lo que su calificación química es baja en comparación de otras leguminosas; si bien, la cocción redujo el contenido de los aminoácidos azufrados ésta podría ser considerada para realizarse una suplementación con algún cereal.

El cocimiento con la posterior eliminación del líquido de cocción se considera adecuado y barato para la semilla inmadura y el ejote de *Erythrina americana* que, después de confirmar la ausencia de efectos tóxicos a largo plazo, permitiría catalogar a esta leguminosa como un posible complemento alimenticio.

# Capitulo 6. Bibliografía



# BIBLIOGRAFÍA

1. de Garine I. y Vargas L. 1997. Introducción a las investigaciones antropológicas sobre la alimentación y nutrición. Cuad. Nutr. 20(3): 21-28.
2. Gálvez-Mariscal M. 1984. Suplementación de los alimentos con proteínas. Inf. Cient. Tecnol. 6(95) pp. 30-31.
3. Cantoral R., Fernández-Quintela A., Martínez J. y Maraculla M. 1995. Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas. Arch. Latinoam. Nutr. 45:242-248.
4. Adrian J., Frangne R. 1990. La ciencia de los alimentos de la A a la Z. Acríbia, S.A. Zaragoza, España. pp. 170-171.
5. Sotelo A., Lucas B. 1998. Variaciones in antinutritional factors at different development stages in seed of *Phaseolus vulgaris* and *Erythrina americana*. EAAP. Publi. 93 Recent Advances of Resech in Antinutritional factors in Legume Seeds and Repeseed. pp. 409-412.
6. Coen A. 1992. Son muchos nombres y una sola legumbre verdadera. Cuad. Nutr. 15(2): 5-6.
7. Mateo-Box J. 1961. Leguminosas de Grano. Salvat Editores, S.A. Zaragoza, España. pp. 3-4, 8-15.
8. Bourges H. 1987. Las leguminosas en la alimentación humana (1er. parte). Cuad. Nutr. 10(1) pp. 17-32.
9. Skerman P., Cameron D. y Riveros F. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Producción y protección vegetal. N° 2. Roma, Italia. pp. 25-33.
10. Hui Y. 1992. Encyclopaedia of Food Science and Tecnology. Proteins. Vol 3. Wiley-Interscience Publication. U.S.A. pp. 2176-2177, 2187-2189.
11. Kaufer-Horwitz M. 1985. La fibra y su aporte a la salud. Cuad. Nutr. 8(5): 17-32.

12. Robinson D. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 109-141.
13. Linden G., Lorient D. 1994. Bioquímica Agroindustrial. Revalorización alimentaria de la producción agrícola. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 99-106.
14. Gómez G., Quesada S. y Nanne C. 1998. Efecto de los factores antinutricionales en el peibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de las ratas jóvenes. Agron. Costarric. 22(2) pp. 191-198.
15. Bourges H. 1987. Las leguminosas en la alimentación humana (2da. parte). Cuad. Nutr. 10(2): 17-32.
16. Robinson R., Sadler M. 1993. Encyclopaedia of Food Science and Nutrition. Vol. 1 pp. 102-111, 154-158; Vol. 4 pp. 2726-2730; Vol. 6 pp. 3806-3809, 3820-3824, 3836. 3841-3843; Vol. 7 pp. 4512-4516. Wiley-Interscience Publication. U.S.A.
17. Liener I.E. 1980. Toxic Constituents of Plants Foodstuffs. Academic Press, inc. 2° ed. New York, U.S.A. pp. 7-57.
18. Sotelo A., Soto M. and Giral F. 1993. Comparative studies of the alkaloidal composition of the two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of the detoxified seeds. J. Agric. Food. Chem. 41 (12): 2340-2343.
19. Bruneton J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 355-366, 422-430.
20. Cheftel Jean-Claude. 1983. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. II. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 106-110, 117-119, 126-129, 133- 135, 145-153.
21. Partearroyo M., Fernández-Quintela A. y Cid C. 1995. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. Aliment. 267: 115-120.
22. Gutteridge R. and Max-Shelton H. 1994. Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. Cap. 1 (Legumes), 2.6 (Genero *Erythrina*). Depto. Agriculture the Queenland University. UK.

23. Cuéllar P., Rodríguez L. y Preston T. 1992. Uso del pizamo (*Erythrina fusca*) como suplemento proteico en dietas de tallo de caña prensado para terneras. Livest. Res. Rural Develop. 4 (1).
24. García-Mateos R., Soto-Hernández M. and Kelly D. 1997. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. Biochem. System. Ecol. 26: 545-551.
25. O'Gorman H. 1963. Plantas y Flores de México. Dirección General de Publicaciones, U.N.A.M. México, D.F. pp. 24-25.
26. Guerrero L. M. 1980. Estudio comparativo de la composición química y los factores tóxicos de dos variedades de *Erythrina* (*Erythrina breviflora* y *Erythrina americana*). Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. México, D.F. pp. 5-6.
27. Pérez A. 1987. De la cocina rural a la dieta urbana. Un vistazo a las plantas tradicionales. Cuad. Nutr. 10(6): 42-44.
28. Jiménez L. V. 1994. Eliminación de los componentes tóxicos de dos semillas del género de *Erythrina* y su evaluación bromatológica. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. México, D.F. 75 págs.
29. García-Mateos R., Lucas B., Zendejas M., Soto-Hernández M., Martínez M. and Sotelo A. 1996. Variation of Total Nitrogen, Non-protein Nitrogen Content, and Types of Alkaloids at Different Stages of Development in *Erythrina americana* Seeds. J. Agric. Food. Chem. 44 (10): 2987-2991.
30. Hermus R. 1993. Methodology for nutrimental evaluation of foods. Inter. J. Food Sci. Nutr. 44 (Suppl. 1): S3-S10.
31. Primo-Yúfera E. 1998. Química de Alimentos. Síntesis. Zaragoza, España. pp. 16-37.
32. Baduí S. 1986. Química de los alimentos. Alhambra Mexicana. México, D.F. pp. 133-187.
33. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 15th. ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., U.S.A Vol. I y II. pp. 17-18, 40-62, 69-83 y 1012.

34. Hernández T., Hernández A. y Martínez C. 1996. Calidad de proteínas. Conceptos y evaluación. Aliment. 274: 27-37.
35. Nollet M. 1992. Food Science and Technology. Food Analysis by HPLC. Vol. 52. Macel Dekker. U.S.A. pp. 1-19, 75-83.
36. Aykroyd W. y Doughty J. 1964. Las leguminosas en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Estudios sobre la nutrición. N° 19. Roma, Italia. pp. 3-21, 33, 42-50, 62-65, 70, 81-90.
37. Reyes-Moreno C. y Paredes-López O. 1992. Endurecimiento del frijol común. Estrategias para su prevención y alternativas tecnológicas para su utilización. Cuad. Nutr. 15(2): 17-32.
38. Jaffé G., Brucher O. 1972. Toxicity and specificity of different bean hemagglutinins. Arch. Latinoam. Nutr. 22: 267-281.
39. Moreno-Enríquez R. I. 2001. Estudio de la toxicidad aguda y cuantificación de alcaloides totales en Erythrina americana en diferentes fases de desarrollo. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. México, D.F. pp. 31-33, 40-46.
40. Kakadé M., Rackis J., McGhee J. and Puski, G. 1974. Determination of trypsin activity of soy products: a collaborative analysis of a improved procedure. Cereal Chem. 51: 376-382.
41. ISO 9648:1988. Determination of Tannin content in Sorghum. International Organization for Standardization. International Standar. pp. 12-15.
42. Pellet P. and Young V. 1980. Nutritional evaluation of proteins foods. The United Nations University World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin Supplement 4. The United Nations University. Tokyo, Japan.
43. Waters Corporation. 1994. Waters AccQ-Tag Chemistry Package. Instruction manual. Waters Corporation. U.S.A.
44. Waters Corporation. 1988. PICO-TAG Work Station. Operator's Manual. Waters Corporation. U.S.A. pp. 3.1-3.5.

45. Lucas B., Sotelo A. 1982. Amino acid determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. Anal. Biochem. 123: 349-356,
46. Díaz J., Lliberia J., Comellas L., Broto F. 1996. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J. Chrom. A 719: 171-179.
47. Alegria A., Barberá R., Lagarda M., López J. 1998. Determinación de aminoácidos en fórmula para lactantes por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. Aliment. 295: 103-110.
48. Lucas B., Sotelo A. 1980. Effect of different alkalis, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and feeds. Anal. Biochem. 109: 192-197.
49. Mathews M.O. 1964. Estimation of a-amino nitrogen in plasma and urine by the colorimetric ninhydrin reaction. J. Clin. Pathol. 17:150.
50. Birch G.C. and Parker K.J. 1980. Food and Health: Science and Technology. Applied Science Publishers LTD. London, England. pp.305-317.
51. Hewitt D. and Ford I.E. 1982. Influence of tannins on the protein nutritional quality of food grains. Proc. Nutr. Soc., 41: 7-17.
52. Ramos G., Frutos P., Giráldez F.J. y Mantecón A.R.. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Arch. Zootec. 47: 597-620.
53. Chau Chi-Fai, Cheung P. C-K. and Wong Y-S. 1997. Effects of cooking on content of Amino Acids and Antinutrients in three Chinese Indigenous Legume seeds. J. Sci. Food Agric. 75: 447-452.
54. Food and Agricultural Organization/World Health Organization/United Nations University (FAO/WHO/UNU). 1985. Report of Expert Work Group on Energy and Protein Requirements. WHO Tech. Report. Series N° 724. WHO Publication Center. Rome, Italy.

# AneXos



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ANEXO A

## Preparación de reactivos

### 1. Solución anticoagulante:

Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea con solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación:

Sol. de heparina : sangre = 15-20 UI : 1 mL de sangre

Sol. de citrato : sangre = 0.1 mL : 1 mL de sangre

### 2. Solución amortiguadora de TRIS:

Se pesan 6.05 g de tris(hidroximetil-amino-metano) y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 L.

### 3. Solución BAPNA:

Se pesan 100 mg de benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C. Esta solución debe ser preparada el mismo día y cuando este en uso debe mantenerse a 37°C.

### 4. Solución estándar de tripsina:

Se pesan con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 mL de HCl 0.001N. Esta solución debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

### 5. Solución de dimetilformamida al 75%:

Se transfieren 75 mL de dimetilformamida a un matraz aforado de 100mL limpio y seco. Diluir con agua desionizada, dejar enfriar y aforar a 100 mL.

**6. Solución estándar de ácido tánico:**

Esta solución de referencia debe contener 0.2g/100mL. Se pesan 0.2g de ácido tánico, aforar a 100mL con agua desionizada.

**7. Solución citrato férrico de amonio (17-20% de hierro):**

Se prepara una solución de 0.35g/100mL, preparada 24 horas antes de su uso. Se presan 0.35g de citrato ferrico de amonio y aforar a 100mL con agua desionizada.

**8. Hidroxido de amonio ó amoniaco (0.8g de NH3/100mL):**

Se prepara una solución que contenga: Para lo cual se miden 3.1mL de hidroxido de amonio concentrado (29% de amoniaco) y aforar a 100mL con agua desionizada.

**9. Solución estandar de triptofano (0.05mg/mL):**

Pesar 12.5 mg de estandar de triptofano y aforar a 250 mL con agua destilada.

**10. Solución de p-dimetilaminobenzaldehido (DMAB) al 5%:**

Pesar 0.5 g de de p-DMAB y disolverlos con HCL concentrado, aforar a 100 mL con HCL concentrado.

**11. Solución de Nitrito de Sodio al 2%:**

Pesar 200 mg de nitrito de sodio y aforar a 100 mL con agua.

# ANEXO B

## 1. Preparación de la estación de trabajo.<sup>(44)</sup>

Preparar la estación de trabajo de acuerdo al siguiente diagrama (Fig.1). Se deposita dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) sólido en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y metanol suficiente para cubrir el hielo seco que se ha depositado. Verificar que los controles de vacío y de Nitrógeno se encuentran cerrados. Se enciende la bomba de vacío y después de cinco minutos la lectura del manómetro de la estación de trabajo deberá ser 50-70 miliTorr. La presión de salida del Nitrógeno no deberá exceder  $0.3 \text{ kg/cm}^2$ .

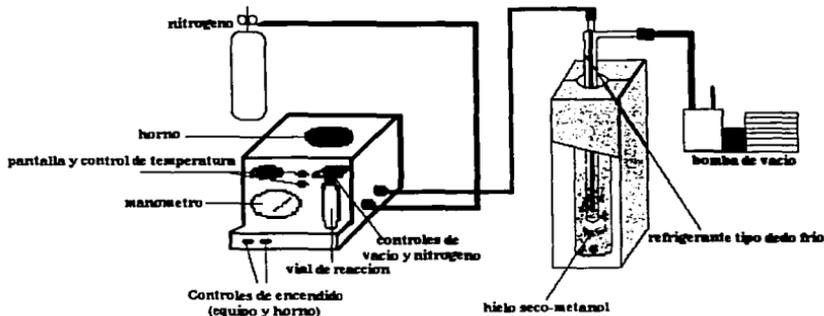


Fig. 1 Instalación de la estación de trabajo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. Preparación de fase móvil (A y B).

### Buffer acetatos-ácido fosfórico (fase A).

Dilúyanse 100 mL de concentrado A (AccQ tag concentrado A) hasta 1000 mL con agua purificada, utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. Hacer pasar la totalidad de la fase a través de un sistema de filtración a vacío (Fig. 2) con un filtro de tamaño de poro  $0.45 \mu\text{m}$  tipo HA, ambos de Millipore. Mantener el vacío durante 5 minutos después de que ha pasado la totalidad de la fase A por el sistema de filtración para desgasificarlo. Almacenar en refrigeración para conservarlo hasta por un mes, cuidando de filtrar y desgasificarlo si no es utilizada por más de dos o tres días.

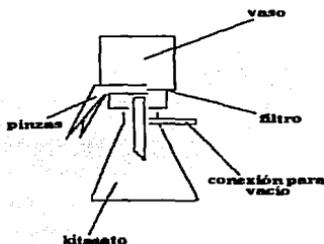


Figura 2. Sistema de filtración de fase móvil.

### Acetonitrilo: agua 60:40 (fase B).

En una probeta de 1000 mL, verter 600 mL de acetonitrilo grado HPLC, añadir 450 mL de agua purificada y después de haber salido el aire se ajusta a 1000 mL con agua purificada. Se filtra y desgasifica la fase B de la misma manera en que se hace para la fase A, utilizando un filtro de  $0.22 \mu\text{m}$  tipo GV de Millipore. Almacenar en refrigeración para conservar su composición durante una semana, volver a filtrar y desgasificar si no se utiliza en dos o tres días.

### 3. Instalación del HPLC.

El sistema de análisis cromatográfico deberá instalarse de acuerdo con la figura 2, deberá tenerse cuidado de que las conexiones de la tubería sean adecuadas para evitar la formación de volúmenes muertos para no deformar los picos de los aminogramas. La columna deberá estar conectada en la dirección que se indica en su etiqueta de identificación.

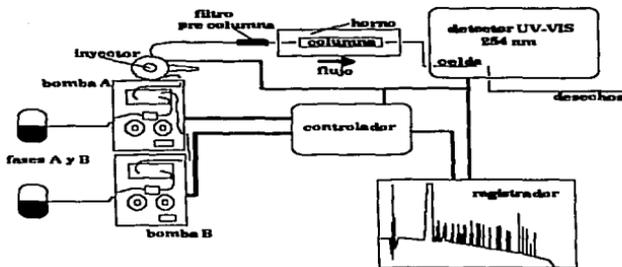


Fig.3 Instalación del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

### 4. Acondicionamiento del equipo.

Enciéndase el equipo (bombas, controlador y registrador, en ese orden), después de asegurar que hay fase móvil suficiente (A y B) en cada una de las 2 bombas, verificar que no hay aire en las tuberías que suministran la fase en cada bomba y que la columna se encuentra conectada en la dirección adecuada. Acondicione el equipo de acuerdo a la siguiente tabla (programa 1 del controlador<sup>3</sup>):

<sup>3</sup> Para iniciar cualquier programa en el controlador, después de encendido, se presiona *Operate gradient*, lo cual permitirá seleccionar alguno de los cuatro programas necesarios para el desarrollo del análisis, después se presiona *Enter* y en algunas ocasiones, en la pantalla del sistema aparecerá la pregunta de confirmación para establecer las condiciones del programa elegido. Existen dos opciones para iniciar la operación del programa elegido: una es presionar *run* en el controlador y la otra es hacer o simular una inyección, llevando a la posición *Inject* la palanca del inyector.

TELIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Acondicionamiento del equipo.

Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/minuto)
Inicio	0	100	0
5	0	100	1
40	0	100	1
45	100	0	1
60	100	0	1

Curva 6 (gradiente lineal).

Cuando han transcurrido 10 minutos a partir del inicio del acondicionamiento, se enciende el controlador de temperatura y se ajusta a 37° C, también se enciende el detector UV-Vis. Inmediatamente después de que ha finalizado la comprobación rutinaria del detector, se ajusta a 254 nm de longitud de onda, filtro 0.5 y sensibilidad 0.05; para después ajustar a cero la lectura. Es importante que se ajuste a cero antes de que fluya fase A por la celda, dado que a éstas condiciones la fase A absorbe energía y durante el desarrollo del gradiente (tabla 2), la línea base cae debido a que el sistema se enriquece con acetonitrilo:agua (fase B), que no absorbe en éstas condiciones, por lo que si se ajusta a cero con fase A fluyendo en la celda del detector, la línea base estará por debajo de cero en algún momento durante el desarrollo del gradiente.

Tabla 2. Gradiente de separación de derivados de aminoácidos

Programa 2	Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/minuto)
	Inicio	100	0	1
	0.5	98	2	1
	15	93	7	1
	19	90	10	1
	32	67	33	1
	35	67	33	1
	36	0	100	1
	41	0	100	1
	42	100	0	1
	43	100	0	1.2
	48	100	0	1.2
	49	100	0	1
	58	100	0	1
	59	0	100	1
	94	0	100	1
	95	0	100	0

\*última línea del programa 2 registrado en el controlador utilizado

Programa 3	Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/minuto)
	Inicio	100	0	1.2
	1	100	0	1
	10	100	0	1

Programa 4	Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/minuto)
	Inicio	100	0	1
	1	0	100	1
	36	0	100	1
	37	0	100	0

## 5. Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos.

Cuando ha transcurrido el tiempo de acondicionamiento, se inicia el gradiente con el cual se efectuará la separación y cuantificación de los derivados de los aminoácidos (tabla 2, programa 2 del controlador<sup>n</sup>) y se enciende el registrador con las siguientes condiciones; velocidad del papel, *chart speed*, 0.5 cm/minuto; ancho de pico, *PW*, 3; atenuación, *atten*, 128 o 256.

Se inyectan 5 a 20  $\mu\text{L}$  (conforme aumenta el contenido de proteína se debe inyectar un volumen menor para evitar que se distorsionen los primeros 5 picos) de muestra o 5  $\mu\text{L}$  de estándar de aminoácidos (0.2 mM), el tiempo de corrida es de 55 minutos; a partir del minuto 36, el gradiente no tiene influencia en la separación de los derivados de los aminoácidos, por lo que transcurrido este tiempo, se presiona *INJ/END A* en el registrador para obtener áreas y tiempos de retención de cada uno de los picos; a partir del minuto 60-65 del programa 2, el equipo comenzará a lavarse cuando se ha inyectado por última vez en el día. La jeringa deberá enjuagarse con agua purificada entre inyecciones.

<sup>n</sup> Presionar *change program* en el controlador, seleccionar el programa a utilizar (1, 2, 3, 4) y presionar *enter*, el gradiente empezará en cuanto se haga o simule una inyección o sea presionado *run* en el controlador.

Dado que el modelo del controlador utilizado no permite que el programa 2 esté completo como uno solo, se utilizan dos programas más, uno que permite reacondicionar la columna entre inyecciones (programa 3) y otro que sirve para lavar el equipo al finalizar una sesión de trabajo (programa 4).

Al minuto 48 del programa 2, en el controlador se cambia a programa 3<sup>h</sup>, lo cual permitirá reacondicionar la columna para la nueva inyección. Es conveniente *lavar* el inyector en éste punto, inyectando 20 µL de agua filtrada y purificada. Una vez transcurrido el programa 3, se cambia a programa 2 del controlador<sup>h</sup> para inyectar nuevamente.

Cuando se ha realizado la última inyección del día, después de que ha transcurrido el programa 3, se cambia a programa 4 en el controlador<sup>h</sup>, se presiona *run* para empezar el lavado del equipo, el control de temperatura del horno deberá apagarse antes de que se detenga el flujo de fase móvil, siendo adecuado hacerlo en el minuto 80-84 del programa 2 (en el minuto 22-26 del programa 4). Cuando se ha realizado la última inyección del día, al minuto 36-40 del programa 2, la lámpara del detector deberá apagarse (presionando *lamp on/off* en el detector) si es que seguirá siendo utilizada regularmente, de lo contrario, apagarle presionado *on/off*.

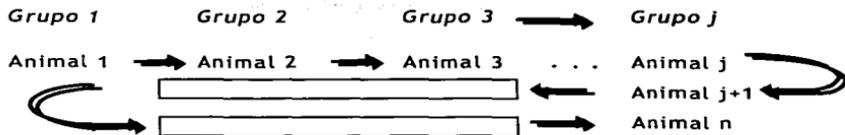
# ANEXO C

## Técnica de distribución (Culebra japonesa)

Esta técnica se aplica con el objeto de distribuir un conjunto de elementos, en este caso animales, en un determinado número de grupos para obtener una uniformidad en los mismos.

### Procedimiento:

1. Marcado al azar de los animales para su posterior identificación.
2. Pesado de los animales.
3. Con base en el peso corporal obtenido anteriormente, se ordenan en forma ascendente (animal 1, animal 2, animal 3, ..., animal n). Se recomienda contar con animales extra, pues de ser necesario, se eliminan los animales con mayor y menor peso para disminuir la variabilidad entre los grupos, la diferencia en el peso promedio entre los lotes debe ser menor a 1g.
4. Distribución de los animales, ya sea de derecha a izquierda o de arriba hacia abajo, con el siguiente patrón:



# ANEXO D

## Formato de registro de datos para la prueba biológica REP

Rata: _____	Sexo: _____	Peso inicial (Pi): _____	Dieta: _____
Tiempo (días)			Peso final (Pf): _____
Peso animal (g)			$\Delta P = Pf - Pi =$ _____
Alimento inicial (Ai)			
Alimento final (Af)			
Alimento ingerido (AI)			$\Sigma AI =$ _____
Alimento acumulado			
Observaciones:	_____		