

00528
30



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN PROTEICA EN MUESTRAS
CRUDAS Y COCIDAS DEL GERMINADO
Y SEMILLA SECA DE
*Erythrina americana***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

TESIS CCN
FALLA DE ORIGEN

PRESENTA:
MAYRA DÍAZ LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2003

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

A



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: Profa. Angela Sotelo López
Vocal: Prof. Bernardo Lucas Florentino
Secretario: Profa. Lucía Cornejo Barrera
1er suplente: Profa. Leticia Gil Vieyra
2do suplente: Profa. Luz Sandra Sánchez del Angel

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA .

Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria

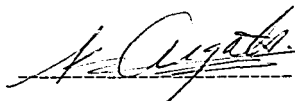
Asesor del Tema.

M en C. Angela Sotelo López



Supervisor Técnico

M. en C. Rosa María Argote Espinosa



Sustentante

Mayra Díaz López



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mayra Díaz López

FECHA: 6-Mayo-2003



ÍNDICE

Página

☞ Resumen.....	1
☞ Introducción.....	3
☞ Objetivos.....	5
☞ Capítulo 1 Antecedentes	
1.1 Proteínas.....	6
1.1.1 Fuentes de proteínas.....	7
1.1.2 Las necesidades proteínicas.....	7
1.2 Factores antinutricionales.....	9
1.2.1 Inhibidores de tripsina.....	10
1.2.1.1 Efecto de la cocción.....	10
1.2.1.2 Efecto de la germinación.....	11
1.2.2 Taninos.....	12
1.2.2.1 Efecto de la cocción.....	13
1.2.2.2 Efecto de la germinación.....	14
1.2.3 Lectinas.....	15
1.2.3.1 Efecto de la cocción.....	16
1.2.3.2 Efecto de la germinación.....	16
1.3 Factores tóxicos.....	16
1.3.1 Alcaloides.....	16
1.4 Calidad Proteínica.....	19
1.4.1 Métodos químicos para la determinación de aminoácidos.....	19
1.4.2 Ensayos biológicos.....	19
1.4.2.1 Relación de la eficiencia proteínica.....	20
1.4.2.2 Digestibilidad.....	22
☞ Capítulo 2. Metodología	
2.1 Recolección de la muestra.....	25
2.2 Limpieza y selección.....	25
2.3 Tratamiento para la germinación.....	25
2.4 Cocción de la semilla.....	26
2.5 Cocción de la semilla germinada.....	26
2.6 Liofilización.....	26
2.7 Molienda.....	26
2.8 Análisis bromatológico.....	27
2.9 Determinación de factores antinutricionales.....	27
2.9.1 Determinación de inhibidores de tripsina.....	27
2.9.2 Determinación de taninos.....	30

C

2.9.3	Determinación semicuantitativa de lectinas.....	34
2.10	Determinación de factores tóxicos.....	36
2.10.1	Determinación de alcaloides por titulación.....	36
2.11	Determinación de aminoácidos.....	39
2.11.1	Determinación de aminoácidos por HPLC.....	39
2.11.2	Determinación colorimétrica de triptofano.....	48
2.12	Ensayo Biológico.....	51
2.12.1	Relación de la eficiencia proteínica.....	51
2.12.2	Digestibilidad aparente.....	54

☛ **Capítulo 3 . Resultados y análisis de resultados**

3.1	Análisis proximal.....	56
3.2	Factores antinutricionales.....	58
3.3	Determinación de alcaloides.....	61
3.4	Determinación de aminoácidos.....	62
3.5	Ensayos biológicos.....	64
3.5.1	Relación de la eficiencia proteínica.....	65
3.5.2	Digestibilidad aparente.....	66
☛	Conclusiones.....	67
☛	Recomendaciones.....	68
☛	Bibliografía.....	69

D

RESUMEN

Erythrina americana es una leguminosa que forma parte de la flora silvestre de México, de la cual se sabe por estudios anteriores que tiene un alto porcentaje de proteína, pero como la mayoría de las leguminosas presenta factores antinutricionales y específicamente en el género Eritrina se encuentran presentes alcaloides, con lo que la utilización en la alimentación como fuente de proteína se ve truncada, sin embargo, se ha informado que en las diferentes etapas de desarrollo de la planta varía su contenido de factores antinutricionales y alcaloides y se sabe que la flor de *E. americana* al ser cocida y eliminada el agua de cocción se utiliza en la alimentación. Teniendo en cuenta lo anterior en el presente trabajo se estudió el efecto de la germinación así como la cocción (retirando el agua de cocción), sobre el contenido de factores antinutricionales y alcaloides de la semilla de *E. americana*, y además se evaluó la calidad proteínica. La semilla seca se germinó y ambas semillas, secas y germinadas, fueron llevadas a cocción con la posterior eliminación del agua de cocimiento. Las muestras crudas y cocidas fueron secadas por liofilización, molidas y tamizadas; se les practicaron los análisis bromatológicos que mostraron un alto contenido de proteína. Se determinó también su contenido de taninos, inhibidores de tripsina, lectinas y alcaloides, mostrando una reducción en el contenido de los tres primeros, pero no de alcaloides durante la germinación. Con la cocción y retiro del agua de cocción tanto para la semilla seca como para la semilla germinada hubo una disminución en el contenido de taninos, inhibidores de tripsina, lectinas y alcaloides. Se realizó el ensayo biológico, alimentando ratas con dietas isoproteicas e isocalóricas a partir de semilla seca (cruda y cocida) y semilla germinada (cruda y cocida) y una dieta control de caseína, calculándose la Relación de la eficiencia proteínica (REP) y la digestibilidad aparente, las ratas alimentadas con las dietas de semillas crudas, secas y germinadas murieron entre el día 12 y 15, probablemente debido al alto contenido de alcaloides. Con la dieta de la semilla seca y cocida se obtuvo un

valor de REP de 1.75 ± 0.26 y una digestibilidad de 72%. Con la dieta de la semilla germinada cocida se obtuvo un valor de REP de 1.52 y una digestibilidad de 87%. Los aminoácidos limitantes fueron los azufrados (metionina-cistina) tanto para la semilla seca cocida como para la semilla germinada cocida. Los anteriores resultados sugieren que es posible la utilización de la semilla seca cocida como fuente parcial de proteína en alimento para animales.

INTRODUCCIÓN

Al considerar el gran aumento de la población en los últimos años y la escasez de recursos económicos para la mayoría de la población, surge la necesidad de nuevas alternativas alimenticias tanto para la alimentación humana como animal. De los procedimientos encaminados a ampliar la disponibilidad de las proteínas para el consumo humano y animal está el incrementar el consumo de leguminosas y otros vegetales ricos en proteínas.

Las leguminosas tienen un alto contenido de proteínas, fósforo y hierro similar al de la carne, pescado y huevo, las semillas de las leguminosas han sido tradicionalmente consumidas por el hombre y constituyen un importante complemento proteínico de los cereales.

Una limitación para el consumo de las semillas de leguminosas en estado crudo es la presencia de factores antinutricionales, que tienen una influencia negativa sobre la digestibilidad, por lo que es necesario conocer el contenido de estos así como de los factores tóxicos presentes ya que pudieran ocasionar un daño a la salud al ser consumidas.

Dentro de la flora silvestre de nuestro país se encuentra una leguminosa llamada *Erythrina americana*, de la cual se conoce de estudios anteriores que contiene un alto porcentaje de proteína. Además de presentar factores antinutricionales se sabe que en el género *Erythrina* la presencia de alcaloides es considerada típica. Estudios realizados a la semilla seca cruda de *E. americana* revelaron la presencia de lectinas con un título de 4 y un alto contenido de inhibidores de tripsina (80 UTI/mg). En *E. americana* las semillas y flores son ricas en alcaloides. Los alcaloides de *E. americana* fueron aislados y se encontró la presencia de erisovina, erisodina y α y β eritroidina, la semilla seca destoxificada fue estudiada y se encontró una alta concentración de proteína, un adecuado perfil de aminoácidos para su utilización en la alimentación, un

valor de REP de 2.3, con lo que se obtuvo una buena calidad proteínica, lo que sugiere se podría utilizar en estado crudo para la alimentación animal siempre y cuando se destoxificara, con lo que aumentaría los costos para su utilización.

Aunque la mayoría de los estudios realizados a *E. americana* se han enfocado al estudio de la semilla seca cruda, existen estudios donde se muestran como varía el contenido de factores antinutricionales y alcaloides en diferentes estadios de desarrollo, encontrando la mayor concentración de inhibidores de tripsina y lectinas en la semilla seca, siendo no detectados en la flor, el mayor contenido de alcaloides se encontró en la semilla seca aunque también se encontraron presentes en la flor, ejote y frijol maduro, sin embargo, el contenido de factores antinutricionales en la semilla germinada aún no ha sido estudiado.

Por lo anterior el presente trabajo se enfocó al estudio del estadio de germinación de *E. americana* y el efecto de la cocción sobre el contenido de alcaloides; factores antinutricionales (taninos, lectinas, inhibidores de tripsina) y la calidad de su proteína.

OBJETIVO

- Determinar el efecto de la germinación y cocción (eliminando el agua de cocción) sobre la calidad proteínica de la semilla de *E. americana* y evaluar la posibilidad de ser utilizada en la alimentación animal.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Efectuar un análisis proximal de la semilla seca y la semilla germinada (crudas y cocidas) de *E. americana*
- Analizar el contenido de factores tóxicos y antinutricionales en la semilla seca y semilla germinada, crudas y cocidas de *E. americana*
- Determinar la calidad proteínica de la semilla seca y semilla germinada (crudas y cocidas) de *E. americana* mediante:
 - Una prueba química (composición de aminoácidos y cuenta química)
 - Ensayos biológicos (REP y digestibilidad aparente)
- Con base en su contenido de factores tóxicos y antinutricionales y a la calidad proteínica determinar si la semilla germinada (cruda o cocida) o la semilla seca cocida pueden ser utilizadas en la alimentación animal en un principio.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. Cada una tiene su propia secuencia y ordenamiento de aminoácidos, de los cuales dependen sus propiedades. Desempeñan un gran número de funciones en las células de todos los seres vivos, formando parte de la estructura básica de tejidos (músculos, piel, uñas, etc.), desempeñando funciones metabólicas y reguladoras (asimilación de nutrimentos, transporte de oxígeno, etc.), así como formando parte del ADN.

La función primaria de las proteínas de la dieta que ingiere un animal es suministrar aminoácidos que el organismo necesita para su mantenimiento. Para ser utilizadas en el metabolismo, éstas deben ser degradadas a aminoácidos, esto se realiza en el estómago e intestino, bajo la acción de los jugos gástricos y las diferentes enzimas, los aminoácidos obtenidos pasan a la sangre y se distribuyen por los tejidos.

1.1.1 FUENTES DE PROTEÍNAS

Los cereales para la mayoría de la población mexicana (Tabla 1) son la principal fuente de proteína ya que son consumidos en mayor cantidad, y cuyo contenido de proteína va de 7 a 8 gramos por cada 100 gramos de cereal, su consumo es seguido por las leguminosas y carne, las primeras son una buena fuente de proteína conteniendo 20 gramos/100 g de alimento aproximadamente (Casanueva, et. al.,1996)

Tabla. 1 Principales productos alimenticios en aporte energético y proteínico diario en México *

Producto	Energía(Kcal)	Proteína (g/día)
Tortilla	1363	29
Pan ó pasta	512	16
Frijol	111	6.4
Arroz	43	0.9
Leche	154	9.3
Huevo	49	3.7
Carne de res	53	4.9
Carne de puerco	34	3.2
Carne de pollo	10	1.2

* Casanueva, et. al., 1996

1.1.2 LAS NECESIDADES PROTEÍNICAS

La cantidad de proteína que se requiere cada día depende de muchos factores, como la edad (ya que durante el crecimiento las necesidades son mucho mayores para un adulto), el valor biológico de las proteínas consumidas, entre otros. Las necesidades proteínicas han sido valoradas por la FAO/OMS/UNU, obteniéndose valores estimados basados en la edad y peso corporal (Tabla 2)

Tabla 2. Valores estimados de las recomendaciones de proteína para diferentes edades

Edad (años)	Nivel de seguridad (g proteína / kg peso corporal por día)
0.25 - 0.5	1.86
0.75 - 1	1.48
2 - 3	1.13
9 - 10	0.99
10 - 11	0.99
14 - 15	0.96
17 - 18	0.86
Adultos ^{a,b}	0.75

FAO/OMS/UNU 1985.

^a Durante la gestación la ingesta proteínica se eleva a 6 g por día.

^b Durante la lactancia la ingesta proteínica se eleva a 16 gramos adicionales.

Como se puede observar de la tabla anterior los requerimientos por kilogramo de peso corporal son mayores durante la infancia y niñez y decrecen paulatinamente hacia la etapa adulta. Las necesidades de una ingesta proteínica lo son en realidad de aminoácidos, siendo mayormente importante la de aminoácidos indispensables ya que estos no se sintetizan en forma endógena o a velocidades especiales por lo que deben ser suministrados por la dieta, por lo que la composición de una proteína es muy importante para determinar su calidad, la calidad biológica de una proteína será mayor cuanto más similar sea su composición a la de las proteínas de nuestro cuerpo, de hecho, la leche materna es el patrón con el que se compara el valor biológico de las proteínas de la dieta. Ocho aminoácidos son los limitantes pero cuatro limitan la calidad de las proteínas en la dieta del hombre: lisina, metionina, treonina y triptofano por su escasez.

Una dieta deficiente en uno o más aminoácidos indispensables no permite sintetizar proteínas en las que dicho aminoácido sea requerido, lo que puede dar origen a diferentes tipos de desnutrición, no permitir un crecimiento adecuado,

conducir un aumento de la morbilidad y mortalidad y a trastornos cerebrales con dificultades en el aprendizaje en épocas tempranas de la vida. No se conocen exactamente las necesidades diarias de aminoácidos indispensables sin embargo se ha intentado determinarlas; cuando uno o más de los aminoácidos resulta deficitario cesa o retarda la síntesis proteínica en los ribosomas, con lo que el resto de los aminoácidos suministrados por la dieta en cantidades adecuadas son parcialmente utilizados como fuente de energía en lugar de serlo para el crecimiento o mantenimiento de los tejidos; por lo que la calidad de una proteína alimentaria depende del tipo de aminoácidos que contiene.

En las leguminosas existe una gran cantidad de proteína, aunque son bajas en aminoácidos azufrados. Con relación a la leguminosa objeto de este estudio, se sabe que la semilla seca completa y la semilla seca destoxificada de *E. americana* tiene un buen perfil de aminoácidos siendo los aminoácidos azufrados los limitantes (Sotelo, et. al., 1993)

Los cereales suelen ser pobres en Lisina y en ocasiones también de triptofano y treonina, las semillas oleaginosas y frutos secos son deficientes en metionina y lisina, por lo que las deficiencias aminoacídicas pueden ser total o parcialmente superadas suministrando con la dieta distintas proteínas de composición aminoacídica complementaria, aunque todas ellas sean de baja calidad (Muller y Tobin, 1998)

1.2 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Es sabido que en las leguminosas están presentes factores antinutricionales como inhibidores de tripsina, taninos, lectinas, saponinas, etc. que disminuyen la disponibilidad o absorción de las proteínas, sin embargo, los que son de tipo proteínico pierden su actividad por tratamiento térmico.

1.2.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA

Para la utilización de las proteínas de la dieta, éstas deben ser degradadas a aminoácidos mediante su hidrólisis, reacción que es catalizada por un grupo de enzimas llamadas proteolíticas, de manera general se clasifican en dos grupos: endopeptidasas (rompen el enlace peptídico en el interior de la cadena) y exopeptidasas (rompen enlaces peptídicos terminales) La tripsina pertenece a las endopeptidasas (también llamadas proteasas), que hidrolizan en péptidos adyacentes a la lisina o arginina.

Los inhibidores de proteasas (Inhibidores de tripsina y quimiotripsina) son proteínas que inhiben la actividad proteolítica de las enzimas del tracto digestivo de animales. Se encuentran distribuidas en las leguminosas y cereales, en las leguminosas se encuentran principalmente en la semilla (aunque no están restringidas a esta parte), ejerciendo una función de protección, inhibiendo los sistemas enzimáticos de sus depredadores (como insectos), es decir, funcionan como mecanismo de defensa contra el ataque de plagas, cuando la planta sufre un daño mecánico éstos se acumulan en el sitio dañado suprimiendo el crecimiento del patógeno invasor.

La inactivación de la tripsina en el intestino por los inhibidores de tripsina de las semillas de leguminosas induce a la mucosa intestinal a poner en libertad colecistoquinasa, ésta hormona estimula a las células pancreáticas a poner en libertad más tripsina y quimiotripsina principalmente, para compensar los efectos del inhibidor de tripsina. Si esta retroalimentación negativa continúa, hay una importante pérdida de aminoácidos azufrados endógenos derivados del páncreas hiperactivo, lo que conduce a una depresión en el crecimiento, producir hipertrofia e hiperplasia pancreática y efectos carcinogénicos (Savelkoul, 1992)

El incremento en el valor nutricional de un alimento puede ser el resultado del aumento de la accesibilidad de las proteínas al ataque enzimático, lo cual, como ha sido observado, se puede lograr mediante la aplicación de calor dada la naturaleza proteínica de los inhibidores de tripsina, con lo que pueden ser destruidos estos factores antinutricionales (Van Der Poel y Blonk, 1990; Thompson, et. al., 1983)

1.2.1.1 Efecto de la cocción

Diversos estudios demuestran como mediante la aplicación de calor se destruye la actividad inhibitoria, sin embargo, se debe tener cuidado de que éste no sea excesivo ya que puede bajar el valor nutricional (Qin, et al., 1998), así mismo muestran como la disminución de la actividad inhibitoria es mayor cuando existe un remojo previo y todavía más cuando es descarrillada la semilla (Sharma y Sehgal, 1992). Mediante la aplicación de calor ocurre una mayor disminución, sin embargo, debe buscarse un equilibrio de tiempo y temperatura para que no se dañen las sustancias nutritivas sensibles al calor, ya que con éste se ven disminuidas (Van Der Poel y Blonk, 1990)

1.2.1.2 Efecto de la germinación

Se piensa que los inhibidores de proteasas inhiben la germinación cuando la semilla se encuentra en el periodo de latencia. Una vez que inicia el proceso de germinación comienza la síntesis de enzimas hidrolíticas responsables de la degradación de las proteínas de reserva, almacenadas durante la maduración de la semilla, entre ellas los inhibidores de proteasas, por lo que su contenido se ve disminuido durante la germinación (Hatano, 1997; Bates, et al., 1977)

Diversos estudios practicados a varias leguminosas muestran como a través de la germinación se ve reducido el contenido de proteína (Bates, et al., 1977; Nielsen y Liener, 1984) así como de inhibidores de tripsina, por ejemplo, para *Vicia faba* después de la germinación hay una disminución del 65 % (Sharma, 1992); en *Sorghum bicolor* a los seis días de germinación ya no se detecta actividad inhibitoria (Mulimani, 1992); reportándose un efecto similar en

lentejas y varios frijoles (Savelkoul, et al., 1991). Esta disminución es atribuida a la ruptura interna de los inhibidores por la actividad hidrolítica que es desarrollada durante la germinación.

En el género Eritrina se han encontrado inhibidores de tripsina y en un estudio realizado por Sotelo y Lucas (1998) se puede observar un alto contenido de éstos en la semilla seca de *E. americana*; sin embargo, no se analizó en contenido de éstos en la semilla germinada para ver el grado de disminución en la actividad inhibitoria.

1.2.2 TANINOS

Son compuestos polifenólicos con un PM entre 500-3000 Daltons, con una gran cantidad de grupos hidroxilo, muy termoestables y altamente solubles en agua. Se clasifican en dos tipos, hidrolizables y condensados.

1. Hidrolizables: son poliésteres que pueden ser degradados por enzimas o ácidos a residuos de azúcares o alcoholes polihídricos y ácido fenolcarboxílico.
2. Condensados: son oligómeros de flavon-3-ol y residuos flavonoides, derivados de la proteína antocianina, unidos mediante enlaces carbono-carbono en la posición 4 de una unidad con la 6-8 de la adyacente.

Se encuentran distribuidos en una amplia gama de plantas, en cereales y leguminosa se encuentran principalmente en las cortezas. En las semillas de las leguminosas en su mayoría son taninos condensados localizados en la testa. En los frutos se pueden encontrar presentes en cantidades que van de 0.2 a 1 g / 100 g de peso fresco, en verduras de 0.5 a 2 g / 100 g de peso fresco.

Debido al alto contenido de grupos hidroxilos presentes en estos polifenoles se piensa que interaccionan con las proteínas mediante puentes de hidrógeno, participando el grupo carboxilo de las proteínas con el grupo hidroxilo de los

polifenoles, en diferentes sitios de la superficie de la proteína. Por lo que, con la presencia de taninos en los alimentos, existe una disminución de su valor nutricional, ya que la formación del complejo tanino-proteína ocasiona una interferencia para la utilización de las proteínas, ocasionando la baja disponibilidad de éstos nutrimentos por lo que son responsables de una depresión en el crecimiento y peso.

Su actividad antinutritiva también tiene que ver con su capacidad para complejar iones di, trivalentes ocasionando la disminución en la disponibilidad de hierro, calcio y cobre, es decir, interfieren en la absorción de éstos metales, aunque por otro lado, también pueden formar complejos con plomo y otros metales pesados siendo esta una actividad benéfica.

Los taninos disminuyen las reservas hepáticas de vitamina A; además, cuando el ácido tánico se combina con la vitamina B₁₂ disminuye la disponibilidad digestiva de ésta. La vitamina B₁ al contacto con ciertos taninos del te puede ser destruida, con lo anterior las necesidades de vitaminas se incrementan.

La unión de taninos con las enzimas de la saliva y mucosa bucal causa el efecto astringente, con las enzimas digestivas y las proteínas del alimento dificultan la digestión, además, al unirse con las proteínas de la mucosa intestinal impiden la absorción de los nutrimentos (Derache, 1990)

1.2.2.1 Efecto de la cocción

Como ya es sabido, una gran variedad de leguminosas son utilizadas tanto en la alimentación humana como en la animal, siendo fuente de aminoácidos y energía, una limitación para el uso de estas fuentes ricas en proteínas en estado crudo en la alimentación es la presencia de factores antinutricionales, entre ellos taninos, los cuales son una influencia negativa sobre la digestibilidad proteínica en monogástricos, actualmente muchos estudios se han enfocado a

observar el efecto del remojo, descascarillado y cocción sobre el contenido de los anteriores.

Para ver el efecto del remojo y cocción sobre los taninos (factores antinutricionales de naturaleza no proteica) se han realizado estudios en diferentes leguminosas, por ejemplo: en *Vicia faba* se observo que con el remojo hay una gran reducción de taninos, con un rango de 42 a 51%; con remojo y descascarillado hay una reducción del 70-73%, debido a que la mayoría de los taninos se encuentran en la testa. Con una cocción seguida de un descascarillado se puede llegar a reducir el contenido de taninos en un 76-81 % y con la cocción en autoclave hay una completa eliminación (Sharma y Seghal, 1992)

1.2.2.2 Efecto de la germinación

Varios autores han observado un decremento en el contenido de taninos durante la germinación de leguminosas, por ejemplo, en *Canavalia ensiformis* después de un día de germinación hay un decremento de 35 %, lo mismo ha sido observado en otras variedades como *Cajanus cajan*, *Cicer arietum*, *Phaseolus Mungo* y *Phaseolus aureus* (Rao y Deosthale, 1982), en *Vicia faba* hay un aumento en la destrucción de taninos durante la germinación a las 48 horas del 91 % (Sharma y Seghal, 1992). Una explicación a esta reducción es la oxidación de taninos durante la germinación, la cual es atribuida a la polifenoloxidasas, que se encuentra en las células de plantas y animales y tiene la habilidad de catalizar la hidroxilación de varios monofenoles y oxidar aeróbicamente difenoles. Rao y Deosthale (1987) observaron que la actividad de la polifenoloxidasas a lo largo de 1, 12 y 24 horas de germinación se incrementaba y había una disminución del contenido de taninos.

1.2.3 LECTINAS

Son proteínas de origen no inmune (en su mayoría glicoproteínas) que interaccionan reversible y específicamente con hidratos de carbono. Se caracterizan por su gran afinidad a los residuos glicosídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, esta especificidad es dada según la fuente vegetal y es utilizada para diferenciar grupos sanguíneos humanos, de ahí que su nombre "lectinas" provenga del latín "legere" que significa elegir.

Es común que las lectinas se encuentren en las leguminosas, las semillas de las leguminosas pueden presentar hasta un 20% de lectinas de su contenido total de proteínas, generalmente se encuentran en la semilla aunque también se han encontrado en otras partes de la planta.

Son proteínas de defensa, actúan protegiendo a la planta contra el ataque de hongos, bacterias y parásitos. Son insecticidas importantes en la peste de cosechas (Cavada, 1998)

El daño que pueden causar las lectinas en la alimentación esta dado por la concentración y la especificidad. Una determinada lectina reacciona con mayor especificidad con un monosacárido dado de la superficie celular. En una primera etapa se unen a las células epiteliales en el intestino interfiriendo con la absorción, con lo que se observa una disminución en la utilización del Nitrógeno, vitamina B₁₂ y nutrientes energéticos, con lo que hay un retardo en el crecimiento, causan hipertrofia intestinal acompañada por un incremento en la velocidad de síntesis de las proteínas de la mucosa intestinal, incrementando el catabolismo del hígado y proteína muscular (pérdida en el músculo esquelético) y una disminución de insulina en la sangre (Savelkoul et. al., 1992); que da lugar a la inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción del epitelio, edema y hemorragia del tejido linfático, ocasionando incluso la muerte de los animales de experimentación.

1.2.3.1 Efecto de la cocción

Dado la naturaleza proteínica de las lectinas, estos factores antinutricionales pueden ser destruidos mediante el calor con métodos tradicionales de cocción. Comúnmente altas temperaturas, cocción con o sin presión pueden destruir efectivamente la actividad hemaglutinante de leguminosas (Thompson, 1983). De diversos estudios realizados se encuentra que no hay actividad hemaglutinante cuando el frijol ya es inconsistente cuando se presiona con un tenedor, es blando para comer (Thompson, 1983).

1.2.3.2 Efecto de la germinación

En la semilla las lectinas se encuentran presentes en cuerpos proteínicos en el endospermo, durante la germinación las proteasas son responsables de la inactivación de factores antinutricionales proteínicos como las lectinas. En *Phaseolus vulgaris* después de 3 días de germinación la actividad hemaglutinante decrece en un 30%, después de 6 días decrece un 90%; de manera semejante ocurre en *Pisum sativum*, *Glicine max* y *Vicia faba*, la aglutinación de eritricios disminuye durante la germinación (Savelkoul, 1992).

1.3 FACTORES TÓXICOS

1.3.1 ALCALOIDES

Bajo el término alcaloide se agrupan más de 600 sustancias que siguen un complejo ciclo del metabolismo nitrogenado. Son sustancias poco similares estructuralmente que difieren en su carácter alcalino y se identifican por una serie de reacciones. El 25 % de las plantas tienen alcaloides y les proporcionan un sabor amargo capaz de disuadir el gusto del consumidor.

Los alcaloides de las eritras deprimen el sistema nervioso central provocando la muerte por parálisis de los músculos respiratorios.

El esqueleto básico de los alcaloides de Eritrina es el erytrano (espiroamina tetracíclica)



Fig. 1. Molécula de Erytrano

Con base en su estructura se clasifican en:

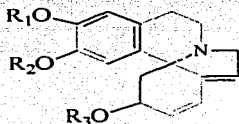
- Diénicos (sistema dieno conjugado en anillos A y B)
- Alquénico (insaturación 1, 6 en anillo A)
- Lactónico (lactona acíclica en el lugar del anillo aromático D)

Aunque también han sido aislados algunos alcaloides no pertenecientes a ninguno de los grupos anteriores.

La concentración de alcaloides varía según la especie de Eritrina y el órgano que se trate, encontrándose una alta concentración en flores y semillas de *E. americana*. Los alcaloides encontrados en *E. americana* son α y β eritroidina, erisovina y erisodina (García-Mateos, et. al., 1996; García-Mateos, et. al., 1998; Sotelo, et. al., 1993) La β -eritroidina es la más frecuente y el derivado más potente (García-Mateos, et. al., 1996). La erisodina y la erisovina han sido encontradas en tejidos de semilla seca y madura pero no en las flores (García-Mateos, et. al., 1998), la concentración de alcaloides aumenta con la maduración de las leguminosas. El dihidro- β -eritroidina tiene una acción semejante al curare, ha sido utilizado como relajante muscular; además, los alcaloides son anticonvulsiantes, agentes hipotensivos, hipnóticos y anestésicos. Los alcaloides de *E. americana* en ratas tienen un efecto tranquilizante y sedante semejante al diazepam, esto cuando se suministran a

ratas 3 mg/Kg de alcaloides libres (en metanol o hexano) y se compara contra una dosis de 2 mg/Kg de diazepam (Garín-Aguilar, et. al., 2000). Cabe mencionar que la dosis letal es de 12, 000 mg/Kg de peso corporal.

Alcaloides de *E. americana*



	R ₁	R ₂	R ₃
Erisodina	H	Me	Me
Erisovina	Me	H	Me

Fig. 2. Erisodina y Erisovina

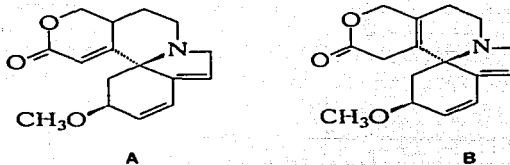


Fig.3. A: α - eritroidina y B: β -eritroidina

Se sabe que la flor de *E. americana* al ser cocida y eliminada el agua de cocción, puede ser ingerida como alimento. Sin embargo, no se ha reportado el efecto de la cocción y drenado sobre el contenido de alcaloides en la semilla seca de *E. americana*, así como tampoco el efecto de la germinación de la anterior.

1.4 CALIDAD PROTEÍNICA

Existen diversos métodos para la determinación de la calidad nutritiva proteínica, entre ellos se encuentran el análisis químico por cromatografía especial para determinar la composición de los aminoácidos de la proteína; así como pruebas biológicas de crecimiento corporal y de balance de nitrógeno.

1.4.1 METODOS QUÍMICOS PARA PREDECIR LA CALIDAD NUTRITIVA

La calidad nutritiva de una proteína depende en gran medida de su contenido de aminoácidos como de su digestibilidad. Por lo que sí se comparan los aminoácidos individuales de una proteína con los requerimientos proteínicos, se puede obtener una estimación de su calidad. Así Block y Michel en 1946 (Muller y Tobin, 1998) introdujeron un procedimiento llamado "Chemical Score" (Cuenta química), basado en que el valor nutritivo de una proteína depende de la cantidad del aminoácido indispensable que se encuentra en menor cantidad comparado con una proteína de referencia (tabla 3), donde se supone que los aminoácidos utilizables por el animal son los mismos que se obtienen por el análisis químico; sin embargo, hay que señalar que la concentración de aminoácidos de un alimento no refleja necesariamente su disponibilidad para ser absorbida ya que puede verse afectada por el tratamiento térmico, que causa una disminución en la disponibilidad de lisina y otros aminoácidos (metionina, cistina y triptofano), así como la descomposición de algunas fracciones proteínicas ricas en aminoácidos indispensables hace que aumente el valor de aminoácidos no indispensables (Ziena, et. al., 1991), también puede verse afectada por la presencia de factores tóxicos y antinutricionales que perjudiquen su absorción.

Tabla 3. Necesidades de aminoácidos sugeridas por la
FAO/OMS/UNU*

Aminoácido (g/16g de N)	Necesidades Requeridas Adultos
Iso	1.3
Leu	1.9
Lys	1.6
Met + Cys	1.7
Phe + Tyr	1.9
Thr	0.9
Trp	0.5
Val	1.3
Total	11.10

* FAO/OMS/UNU 1985

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.4.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos biológicos se basan en la determinación del crecimiento o la retención del nitrógeno en animales experimentales como la rata o en seres humanos en función del consumo de proteína, para lo cual se estandarizan las condiciones de ensayo. Se basan en dos observaciones:

1. Cuanto mejor es la calidad de una proteína (cuanto más se adapte su composición de aminoácidos a las necesidades dietéticas) mayor es la velocidad de crecimiento.
2. Cuanto mejor es la calidad de una proteína mayor es el nitrógeno que un organismo es capaz de retener a partir de la proteína consumida.

1.4.2.1 Relación de eficiencia de la proteína (REP)

Es quizás el método más utilizado para la evaluación de las proteínas, se basa en el aumento de peso de los animales de laboratorio (frecuentemente ratas) con relación con la proteína total ingerida. La correlación entre el REP y el peso corporal es muy alto, por lo que la ganancia en peso en circunstancias

controladas ayuda a definir el valor nutricional, si el contenido de proteína se mantiene fijo.

Se ha estandarizado el método fijando varios parámetros, como la edad de la rata, sexo, cepa, número de ratas por grupo testigo, cantidad de proteína y componentes de la dieta, condiciones ambientales, duración del estudio, ya que estos tienen influencia sobre los resultados.

- Edad, sexo, cepa de la rata: Se utilizan animales macho de la misma cepa y camada, destetados entre los 21 y 23 días de edad.
- Peso: El intervalo de peso no debe exceder 10 gramos.
- Número de animales : Se utilizan mínimo 6 ratas por lote en jaulas individuales, los cuales se reparten de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (la diferencia en peso no debe ser mayor a 1 g).
- Dieta: Se alimentan con dietas que les proporcionen todos los nutrimentos en términos de energía, vitaminas y minerales, en donde la única variable es la fuente de proteína en estudio, manejándose un 10% de ésta.
- Tiempo de estudio: Los animales se alimentan de tres a cuatro semanas, tiempo durante el cual se mide la ganancia en peso y la proteína ingerida. De tal forma que:

$$\text{REP} = \frac{\text{Ganancia en peso del animal de prueba (gramos)}}{\text{Total de proteína consumida (gramos)}}$$

Con lo anterior las proteínas de mas alta calidad permiten un mayor crecimiento y una mayor ganancia en peso, obteniéndose un valor de cero para una proteína de muy baja calidad y un máximo posible de cuatro para una excelente calidad (Muller y Tobin, 1998) Estos resultados pueden verse afectados por otros factores como la destreza del operador, las condiciones ambientales que pueden ocasionar variaciones en los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, por lo que se incluye en los ensayos un grupo control

alimentado por caseína, al que se le ha dado un valor estandarizado de 2.5, de tal forma que los valores obtenidos son corregidos o ajustados:

$$\text{REP ajustado} = \frac{\text{REP experimental} \times \text{REP caseína (referencia)}}{\text{REP caseína (experimental)}}$$

El REP está sujeto a críticas, entre ellas que supone que toda la proteína ingerida es utilizada para el crecimiento sin tomar en cuenta que también es utilizada para su mantenimiento. Existe una diferencia de requerimientos de aminoácidos entre animales de laboratorio y seres humanos; las ratas requieren de 4 a 6.53 % de aminoácidos azufrados y los seres humanos solo un 2.65% de las necesidades totales de proteína, es decir, un 50 % menos.

En un estudio realizado a semilla seca de *E. americana* en donde se extrajeron los alcaloides muestra un valor de REP de 1.98 ± 0.32 (Guerrero, 1980), otro estudio realizado a la semilla seca cruda destoxificada muestra un valor de REP de 2.3 ± 0.2 (Sotelo, et al., 1993)

1.4.2.2 Digestibilidad

La digestibilidad se define como la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba. Existen varios métodos para medir la digestibilidad de una proteína entre ellos los experimentos realizados en ratas ya que la digestibilidad de las proteínas es igual en ratas y humanos (Carias, et. al., 1995).

Las proteínas de origen animal son más digeribles (95-100 %) que las de origen vegetal (60-85%). Un decremento en la digestibilidad de las proteínas puede ser debido a su contenido de fibra, que actúa como una barrera física para la difusión enzimática, además hacen que el paso por el intestino sea más rápido, disminuyendo el tiempo de absorción. Sawar et. al., (1989) observaron que la digestibilidad proteínica es generalmente baja en dietas de origen vegetal alta en fibra dietética. La digestibilidad proteínica en leguminosas también puede verse afectada por factores tóxicos los cuales disminuyen la absorción de la mucosa intestinal, así como factores antinutricionales que disminuyen la acción de las enzimas digestivas.

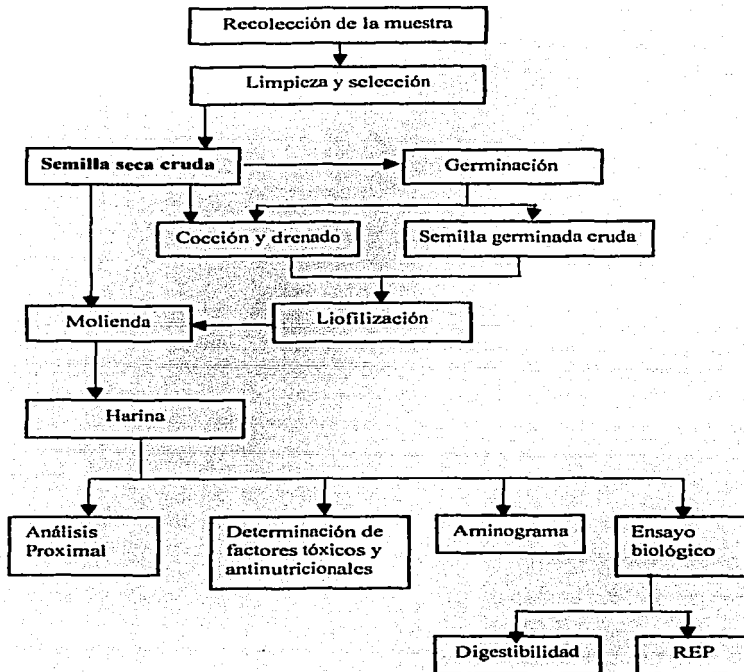
Mediante el remojo se puede mejorar significativamente la digestibilidad, ya que el ácido fítico, inhibidores de tripsina y polifenoles pueden lixiviarse en el agua de remojo y la reducción de éstos se incrementa, aumentando la digestibilidad (Kataria, et. al., 1992). La cocción también mejora la digestibilidad, siendo mayor si hay un remojo previo, destruyendo factores antinutricionales lábiles, dejando las proteínas más accesibles a la acción enzimática.

La germinación da un efecto positivo en la digestibilidad proteínica en granos, un largo periodo de germinación aumenta la digestibilidad, esto ha sido observado en varias semillas de leguminosas, las proteínas de la semilla son movilizadas y los factores antinutricionales incluyendo inhibidores de proteasas, fitatos, polifenoles, etc. son catabolizados durante la germinación (Kataria et. al., 1991; Mulimani y Vadiraj, 1993; Savelkoul, et. al., 1992)

En la semilla seca cruda detoxificada de *E. americana* se encuentra un valor de digestibilidad de 86 % contra un control de caseína de 96%, en *E brevislora* este valor es ligeramente menor (80%) (Sotelo, et. al., 1993)

METODOLOGÍA

Diagrama de trabajo experimental



CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La semilla seca fue recolectada en un árbol clasificado botánicamente como *E. americana*, situado frente al edificio "B" y el estacionamiento de la Facultad de Química, Cd. Universitaria, en Julio del año 2000.

2.2 LIMPIEZA Y SELECCIÓN

Las semillas fueron separadas de materia extraña como tallos, hojas, basura, después de lo cual fueron lavadas con una solución al 10% de cloro comercial, enjuagadas y secadas con una franela. Del total de las semillas una fracción fue destinada a la germinación.

2.3 TRATAMIENTO PARA GERMINACIÓN

1. Para favorecer la penetración del agua al interior de la semilla, se lija una **pequeña** fracción de la testa con una lija mediana de metal.
2. Posteriormente se colocan en un recipiente de plástico con una base de algodón humedecido, cuidando que el agua sea suficiente pero no excesiva.
3. El crecimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente y diariamente se observa que no haya contaminación por hongos.
4. Cuando el tamaño de la acróspira alcanza aproximadamente 4 cm y aun no hay hojas, lo cual sucede de los 10 a 12 días, son separadas del recipiente y desprendidas de la cascarilla.
5. El lote se divide en dos partes, uno es liofilizado, molido y tamizado mientras que el otro se somete a cocción con una posterior eliminación

de agua de cocción para después ser liofilizado y finalmente molido y tamizado en una malla de 0.5 mm

Una parte de la semilla seca cruda y el germinado crudo se someten a un proceso de cocción, considerándose como adecuado cuando ambas son blandas (pierden su firmeza cuando se presionan con un tenedor). El objetivo es la cocción de las muestras aunque tratamiento aplicado es diferente dado las características de dureza de la semilla seca cruda.

2.4 COCCIÓN DE LA SEMILLA

La cocción se lleva a cabo en autoclave a 121° C y una presión de 15 psi, por cada 100 g de semilla se utilizan 300 ml de agua, se lleva a cabo en 30 min y una vez terminado el tratamiento se elimina el agua de cocción y se procede a la liofilización.

2.5 COCCIÓN DEL GERMINADO

El cocimiento de éste se lleva en una relación de 100 g de germinado y 340 ml de agua, durante 40 min, cuidando que el agua no se evapore, cuando ya esta cocido se retira el agua de cocimiento y se procede a la liofilización.

2.6 LIOFILIZACIÓN

Las muestras se cortan en fragmentos pequeños con ayuda de unas tijeras y se llevan a congelación, para proceder así a la liofilización.

2.7 MOLIENDA

Una vez liofilizadas las muestras se llevan al molino utilizando una malla de 0.5 mm, las muestras son guardadas en un frasco con tapa y en un lugar seco y fuera de la luz. Una vez obtenidas las harinas son utilizadas para los análisis subsecuentes.

2.8 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Para su realización se siguieron las técnicas descritas en el AOAC(1985) Se efectuaron análisis de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda, proteína y por diferencia carbohidratos.

2.9 DETERMINACIÓN DE FACTORES ANTINUTRICIONALES

2.9.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA

Fundamento

La cuantificación se lleva a cabo siguiendo el método descrito por Kakade et. al. (1974)

La técnica se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estándar de tripsina y después de cierto tiempo se mide la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético N- α -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), el cual producirá una coloración amarilla, esta es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina de la muestra.

Material y equipo

- Parrilla multiple con agitación marca THERMOLINE, mod. 4
- Espectrofotómetro marca SEQUIO-TURNER, mod. 340
- Potenciómetro CORNING, mod. 10
- Baño maría GRANT, mod. SE10
- Mezclador de tubos Lab-line, mod- super-mixer

Reactivos

- A) Solución buffer TRIS: 6.05 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano, MERCK-108382) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un litro.
- B) Solución BAPNA: 100 mg de BAPNA (SIGMA B-4875) se disuelven en 2.5 ml de dimetil sulfóxido, se diluyen en 250 ml con amortiguador TRIS

previamente calentado a 37 ° C. Esta solución debe ser preparada el mismo día.

- C) Solución patrón de tripsina: Se pesa con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA N. T-8253), se disuelven en 200 ml de HCl 0.001N. Debe ser almacenada en refrigeración (4 ° C) y puede durar de 1 a 2 semanas sin pérdida de actividad apreciable.

Procedimiento

- A) Preparación del extracto: Se pesa 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adicionan 45 ml de NaOH 0.01 N, se ajusta el pH a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 ml. Se transvasa a un vaso que contenga un magneto para poner en agitación 2 ½ h a 300 rpm. Transcurrido el tiempo, se quita el magneto y se deja en reposo 30 min. por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1 ml produzca una inhibición de 40-60 %.
- B) Cuantificación de la actividad: la siguiente tabla (n. 4) muestra en forma esquemática la serie de tubos que se deben de preparar para poder medir la actividad inhibitoria de la muestra. Porciones de 0.0, 0.6, 1, 1.4 y 1.8 ml del extracto directo o diluido se pipetea en tubos de ensaye por duplicado y se ajusta el volumen a 2 ml con agua destilada, se introducen a baño maría (a 37°C). Se adicionan 2 ml de solución estándar de tripsina (a 37°C) durante 10 min. Se adicionan 5 ml del sobrenadante de solución BAPNA (a 37°C) a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 min (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene agregando 1 ml de ác. acético y homogeneizarse inmediatamente.

Nota: si al agregar ác. acético se enturbia o forma un precipitado, se deja reposar el tubo 15 min y posteriormente se filtra a través de papel filtro Whatman N. 1

Tabla N. 4 Adición de reactivos (ml)

TUBO	Extracto	Agua	Tripsina	BAPNA	Acido acético al 30%
B1	1.8	0.2	2 + 1 Ac	5.0	...
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B2	1.4	0.4	2 + 1 Ac	5.0	...
2	1.4	0.4	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2 + 1 Ac	5.0	...
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2 + 1 Ac	5.0	...
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR	0.0	2.0	2 + 1 Ac	5.0	...
R	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

Donde :

B= Blanco

Ac= Ácido acético al 30 %

R= Reactivos

Nota: la solución BAPNA y tripsina deben estar a 37 ° C antes de usarse. La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y es necesario para cada una de las alícuotas ajustar el aparato a 100 % de transmitancia con su respectivo blanco.

Cálculos:

La lectura en Absorbencia (A) directamente se puede pasar a unidades de tripsina (UT) de la siguiente forma:

$$UT = A \times 100$$

Ya que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrá a su vez una serie de valores de UT, los cuales al restar este valor a de referencia, se obtienen valores de tripsina inhibida (UTI), al dividir este valor entre los ml de cada alícuota se obtienen UTI/ml.

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (UTI/ml) como función de la alícuota del extracto se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado correspondiente al cero de la

solución inhibitoria. Este dato extrapolado es el dato más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real (si se refiere uno al inhibidor de soya tipo Kunitz) Cuando no se obtiene una correlación lineal satisfactoria se puede emplear el valor promedio de la serie de alícuotas, informando en términos de UTI/ml.

Se expresa el resultado como unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra, de la siguiente forma:

$$\text{UTI / mg de mg muestra} = \frac{B \times F \times 50}{1000}$$

Donde :

B= valor extrapolado o promedio en UTI/ml

F= factor de dilución, lo cual depende de las diluciones realizadas.

Cuando se emplea el extracto directo F= 1.

9.2.2 TANINOS

La metodología utilizada es la ISO 9648:1988

Fundamento

Se basa en la extracción de taninos por agitación de una muestra problema con dimetilformamida (DMF). Después de centrifugar la muestra, se toma una alícuota de sobrenadante y se le adiciona citrato férrico amoniacal y solución de hidróxido de amonio. La reducción del ión férrico debida a los iones polifenoles ocasiona la formación de un compuesto colorido en medio alcalino, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 520 nm.

Material y equipo

- Parrilla múltiple con agitación marca THERMOLINE, mod. 4
- Centrifuga para tubos marca DYNAC
- Tubos de centrifuga de 50 ml con graduación
- Espectrofotómetro marca SEQUOI-TURNER, mod. 340

Reactivos

A) Solución de dimetilformamida al 75 %. Medir 75 ml de dimetilformamida (JT BAKER 9221-03) y diluir con agua desionizada, llevar a un aforo de 100 ml

B) Solución estándar de ácido tánico 2mg/ml. Pesar 0.2 g de ácido tánico (SIGMA T-0125) y aforar a 100 ml con agua desionizada.

C) Citrato férrico de amonio. Pesar 0.35 g de citrato férrico de amonio* (ALDRICH 22,896) y aforar a 100 ml con agua desionizada, 24 horas antes de su uso.

*El contenido de hierro debe estar entre 17%-20%.

D) Solución de hidróxido de amonio. Preparar una solución que contenga 8 mg/ml de NH_3 . Medir 3.1 ml de hidróxido de amonio (29% de NH_3 , densidad 0.8928) y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Procedimiento

Método de extracción de taninos

A) Se pesa en un vaso de precipitado un gramo de harina molida y desengrasada y se le agregan 25 ml de dimetilformamida al 75%**, se tapa y agita con un magneto durante 60 min. a 500 rpm en una parrilla de agitación.

****Modificación de la técnica ISO, originalmente se agregan 20 ml de dimetilformamida al 75 %**

- B) Posteriormente se deja reposar 15 min, se transfiere cuantitativamente el sobrenadante para centrifugar 10 min. a 3000 rpm, enjuagando el vaso con 2 ml de disolvente.
- C) Decantar el sobrenadante, el cual se guarda para la determinación de taninos.

Determinación de taninos

A) Se rotulan 3 tubos de ensaye, uno corresponde al blanco otro el problema 1 y el tercero al problema 2

B) Se añaden los reactivos de la siguiente manera:

TUBO	muestra (ml)	agua desionizada (ml)	citrato férrico amoniacal (0.35g/100ml) (ml)	amoníaco (0.232 g/100 ml) (ml)
Blanco	1	6	1
Problema 1	1	5	1	1
Problema 2	1	5	1	1

- C) Después de la adición de cada uno de los reactivos agitar con ayuda de un vórtex.
- D) Preparar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nm y ajustar contra un blanco de agua.
- E) Después de 10 min transferir los tubos a celdas de medición para leer sus absorbancias
- F) Elaborar una curva patrón y extrapolar el valor obtenido del problema en la curva patrón

Curva Patrón

- A) Utilizar 8 matraces volumétricos de 25 ml y con micropipeta añadir 1,2,3,4,5,6,7 ml de solución de ácido tánico (2mg/ml) respectivamente a cada matraz.
- B) Aforar a 25 ml cada uno con dimetilformamida al 75 %
- C) De cada uno de los matraces tomar 1 ml de solución y colocarlos en un tubo de ensaye.
- D) Añadir 5 ml de agua y 1 ml de citrato férrico amoniacal a cada tubo, agitar en vórtex.
- E) Añadir 1 ml de solución de hidróxido de amonio a cada tubo, agitar en vórtex.
- F) Después de 10 min leer las absorbancias a una longitud de onda de 525 nm. Trazar una gráfica de absorbancia contra concentración de ácido tánico (expresado como µg de ácido tánico)

Nota: La curva puede no pasar por el origen, sin embargo no deberá ser corregida por el cero de la escala.

Cálculos

$$\% \text{ de AT} = \frac{(\mu\text{g de AT})^*}{(1 \text{ ml de extracto})} \times \frac{(25 \text{ ml de extracto})}{(\text{g de muestra})} \times \frac{(1 \mu\text{g de AT})}{(10^6 \mu\text{g de AT})} \times 100$$

Donde :

AT= ácido tánico

*Interpolación del promedio de la concentración de la muestra

2.9.3 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LECTINAS

La técnica es la descrita por Lucas y Sotelo (1993)

Fundamento

La detección se realiza en un extracto de la planta, llevándose a cabo una serie de diluciones seriadas en la que se determina el punto final mediante la estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

Se trabaja con glóbulos rojos lavados y sensibilizados con una solución de proteasa disponible (pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora con este tratamiento.

Material y equipo

- 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 BLEU-M
- Espectrofotómetro marca SEQUOI-TURNER, mod. 340
- Adaptador para celdas de 10X75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- Microtiter Kit (Cook-Eng-Alexander Virginia USA)
- Filtro de vidrio con fibra de vidrio

Procedimiento

Preparación del extracto

1. Se pesa un gramo de muestra seca y desengrasada, se le adicionan 10 ml de solución salina al 1% y se lleva a agitación por 2 h a 300 rpm a temperatura ambiente.

2. Transcurrido el tiempo se centrifuga a 1400 rpm por 15 min., el sobrenadante se filtra a través de filtro de vidrio

*Si es necesario llevar al volumen inicial con solución salina al 1%

Preparación de la Sangre

1. La sangre de Hamster , se lleva a un matraz con anticoagulante (heparina) y agita suavemente, se trasvasa a tubos de centrifuga para lavar 3 veces con solución salina al 0.9% (la relación sangre-sol. salina es 1:5; en caso de ser necesario lavar hasta que no este hemolizado el sobrenadante)
2. Centrifugar a 1500 rpm por 10 min., en cada ocasión. En el último lavado medir en el tubo de centrifuga el paquete de eritrocitos
3. Diluir al 4% (24 ml de solución salina al 0.9% por cada ml de glóbulos)

Sensibilización de los glóbulos rojos

1. A 10 ml de glóbulos rojos al 4% adicionar 1 ml de solución de tripsina al 0.2% e incubar 1 h a 37 °C
2. Centrifugar y eliminar el sobrenadante dando 3 lavados con solución salina al 0.9%.
3. Resuspender en sol. salina (24 ml de solución salina 0.9% por cada ml de glóbulos rojos)

Nota: Si hay coágulos filtrar a través de una gasa

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos

1. A 1 ml de glóbulos rojos se agregan 4 ml de solución salina 0.9% y se lee en el espectrofotómetro a 620 nm (usando un blanco de solución salina 0.9%, la lectura debe ser de 25 ± 1 % de transmitancia, de otro modo hacer la dilución necesaria hasta quedar en dicho rango.

Microtitulación

1. En placas tipo V de microtitulación colocar en cada pozo de 2 hileras 50 μ l de solución salina 0.9%.
2. Llenar el microdilutor con 50 μ l (por contacto con la superficie del extracto problema), hacer diluciones sucesivas en las hileras, introducir el microdilutor en el pozo y rotar sin excesiva presión.
3. Con el pipetero de gota colocar 50 μ l en cada pozo de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados.
4. Rotar la placa circularmente e incubar 1 h a 37 ° C.

Lectura

Colocar la placa sobre el dispositivo de lectura y observar a través del espejo, reportar la máxima dilución que tenga aglutinación.

2.10 DETERMINACIÓN DE FACTORES TÓXICOS

2.10.1 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES POR TITULACIÓN

Fundamento

Este método se basa en la extracción de alcaloides aprovechando sus propiedades de partición en un sistema de disolventes y su valoración posterior por volumetría empleando un ácido debido a las propiedades básicas de los alcaloides (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2000)

Reactivos

- A) Ácido sulfúrico 0.02 M
- B) Solución indicadora de rojo de metilo
- C) Ácido sulfúrico 1.00 N
- D) Hidróxido de amonio concentrado
- E) Sulfato de sodio anhidro (NH_4OH)

- F) Metanol QP (para extracción)
- G) Metanol RA (para titulación)
- H) Éter etílico RA
- I) Cloroformo RA

Procedimiento

- Triturar la muestra y tamizarla (pasando por una malla de 0.5mm)
- Pesar 5 gramos de muestra, adicionar 50 ml de metanol alcalinizado con NH_4OH a pH 8 ó 9 y agitar 8 horas a 300-500 rpm.
- Filtrar con ayuda de vacío usando papel Whatman N. 541, lavando el residuo, el filtrado guardar en refrigeración perfectamente tapado, y al residuo adicionar nuevamente 50 ml de metanol alcalinizado continuar la agitación por 16 horas más.
- Filtrar con ayuda de vacío, usando el mismo embudo y el mismo papel del día anterior, recibiendo en el mismo matraz que se guardó en refrigeración. Lavar el vaso y enjuagar el residuo con 20 ml de metanol alcalinizado.
- Evaporar el disolvente en un rotavapor (50°C) casi a sequedad para proseguir con la purificación.
- Disolver el extracto en 15 ml de éter y 5 ml de H_2SO_4 1N.
- Filtrar a través de papel Wathman N. 541 y recibir en un embudo de separación, recuperar la fase acuosa (inferior).
- Extraer 3 veces la fase orgánica (superior) con 5 ml de ácido cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y verter en un embudo de separación.
- Adicionar 25 ml de cloroformo, agitar y recuperar la fase acuosa (superior).
- Extraer la fase orgánica tres veces más adicionando 5 ml de H_2O y 5 ml de H_2SO_4 . Reunir las fases acuosas con la anterior.
- Extraer 2 veces con 10 ml de cloroformo. Recuperar la fase acuosa (superior).
- Filtrarla a través de papel Wathman N. 2, enjuagando el papel con 2 ml de agua.

- Alcalinizar la fase recuperada con NH_4OH concentrado hasta un pH de 9 ó mayor.
- Extraer 3 veces con 35 ml de cloroformo cada vez, recuperando la fase orgánica (inferior), lavando todo el material que estuvo en contacto con los alcaloides con cloroformo y adicionarlos al extracto.
- Secar la solución cloroformica con sulfato de sodio anhidro y evaporar el disolvente en el rotavapor.
- Redisolver el residuo en 3 ml de etanol (redisolver de ml en ml), transvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contiene 7 ml de agua destilada y una gota de indicador rojo de metilo
- Titular con H_2SO_4 0.02 N
- Utilizar un blanco con 3 ml de metanol y 7 ml de agua.

Cálculos

Se cuantifican como:

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

Donde:

$g = g \beta\text{-eritroidina} / 100 \text{ g de muestra seca}$

0.273= es el peso molecular de la $\beta\text{-eritroidina}/1000$

$N =$ la normalidad del H_2SO_4

2.11 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

2.11.1. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

(Cohen y Michaud, 1993; Bidlingmeyer, 1984)

Fundamento

En la cuantificación de los aminoácidos de las proteínas de cereales y leguminosas se combinan la derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, la cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa (partición de un soluto entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar), utilizando norleucina como estándar interno, previa hidrólisis del material proteínico con HCl 6 N 0.1% de fenol, en fase vapor, a 145 °C por 4 horas.

Material y Equipo

Hidrólisis

- Estación de trabajo Pico Tag (Waters)
- Viales de reacción de trabajo Pico Tag
- Bomba de alto vacío RVS (Edwards)
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 X 50 mm (Corning)
- Marcador de tinta permanente Esterbook de Berol
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 200-1000 µl (Finnpipette)
- Vortex (Lab-line mod. 1290 super-mixer)
- Agua destilada y desionizada (agua purificada de 18 Mohm de resistencia eléctrica o agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22 µm)
- Hielo seco
- Metanol (QP)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%) (Infra)
- HCl 6 N, 0.1% de fenol

Preparación de la muestra

- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 50-200 µl (Finnpipette)
- Pipeta Pasteur (3)
- Vortex (Lab-line instruments. Mod. 1290)
- Matraz aforado de 1 ml (3)
- Jeringas de 10 ml (9)
- Acrodisco de Nylon. 0.22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Gelman)

- Tubos de ensayo de 10 X 70 mm (Pirex) (9)
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM (disolución de norleucina (c.b.p 5 mM) en HCl 0.1 M suficiente para obtener 10 mM al final)
- Acetonitrilo:Agua 20:80 (200 ml de acetonitrilo grado HPLC, mas 800 ml de agua purificada)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT-Baker)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 X 50 mm (Corning)
- Parrilla de calentamiento (Stirrer/Hot Plate Corning) para mantener con baño de agua a 55 °C
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 5-50 μ l, (Finnpipette)
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 50-200 μ l (Finnpipette)
- Micropipeta (y puntas) con capacidad de 100-1000 μ l (Finnpipette)
- Vortex (Lab-line instruments. Mod. 1290)
- 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), Waters

Análisis Cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (2), (Waters mod 510)
- Inyector con loop de 20 μ l (Rheodyne)
- Jeringa para HPLC 25 μ l (Hamilton)
- Detector UV-Vis Waters 486 (Waters)
- Horno y unidad de control de temperatura modelo III (Waters)
- Controlador automático de gradiente modelo 680 (Waters)
- Adquisición e Integrador de datos Chromjet modelo 54076 (Waters)
- Sistema de filtración a vacío (2) Millipore
- Filtro de tamaño de poro 0.45 μ m tipo HA (Millipore)
- Filtro de tamaño de poro de 0.22 μ m tipo GV (millipore)
- Filtro pre columna en línea (Waters)
- Columna AccQ-Tag Nova Pack C₁₈, tamaño de partícula de 4 μ m, de 3.9 mm X 150 mm, (Waters)
- AccQ-Tag concentrado A (Buffer acuoso de acetatos y fosfatos) (Waters)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Backer)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

Reactivos

A) Buffer acetatos-ácido fosfórico (fase A): Diluir 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 con un filtro de tamaño de poro 0.45 μm tipo HA, ambos de Millipore. Mantener el vacío durante 5 minutos después de que ha pasado la totalidad de la fase. Almacenar en refrigeración para conservar su composición hasta por un mes, se debe tener cuidado de filtrar y desgasificarle si no es utilizada por más de dos o tres días.

B) 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 que ha 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 μm 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.

Procedimiento

• Preparación de la estación de trabajo.

Preparar la estación de trabajo de acuerdo al diagrama (figura 1) Se deposita hielo seco 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 kg/cm².

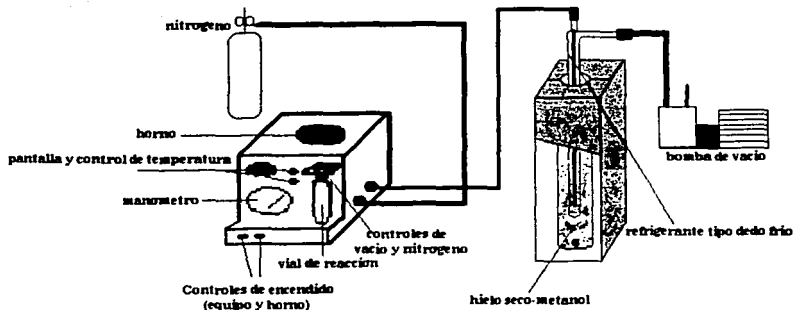


Figura 1. Instalación de la estación de trabajo.

- **Preparación de la muestra: secado.**

Se pesan, por triplicado, 10 mg de muestra **SECA Y DESENGRASADA** (15 mg en el caso de muestras con menos de 20% de proteína) en el interior de un tubo de 4 x 50 mm, previamente marcado con el cortador de vidrio o con el marcador de tinta permanente. Se agrega una gota de agua (aproximadamente 50 μ l) y se agita durante algunos segundos en el vórtex. Los tres tubos se depositan en el interior del vial de reacción. 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 miliTorr) El vial se coloca en la estación de trabajo, se abre la válvula de nitrógeno durante 10-15 segundos, la presión de salida del nitrógeno no debe exceder 0.3 Kg/cm², 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 miliTorr). Se cierra la válvula de vacío y se retira el vial de la estación de trabajo

- **Preparación de las muestras: purga con nitrógeno.**

Se agregan 200 μ l de HCl 6N con 0.1 % de fenol (200 μ 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 Pico Tag, 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

- **Hidrólisis en fase de vapor.**

Se introduce el vial al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145° C durante 4 horas.

- **Eliminación del exceso de HCl.**

Transcurrido el tiempo, se saca el vial del horno, se deja enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de extracción, 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).

- **Quantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa**

- 1. Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado.**

A cada uno de los tubos con hidrolizado se agregan 100 µl de norleucina 5 mM en HCl 10 mM. Se agita un minuto en vórtex y se deja reposar un minuto para después agregar de 100 a 200 µl 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), 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

- 2. Preparación de las muestras: purificación y filtración.**

Se procede a purificar la muestra con la ayuda de un cartucho Sep Pak C₁₈, el cual deberá estar previamente activado de la siguiente manera:

Con ayuda de una jeringa, se hacen pasar lentamente (1-2 ml/minuto) 6 ml de acetonitrilo 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.

3. Derivatización.

a. Reconstitución de AQC.

Precalentar 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 una micro pipeta 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

b. Preparación de un estándar de aminoácidos.

Mezclar 80 µl de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 µl de norleucina 5 mM – HCl 10 mM y 900 µl de agua purificada 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.

c. Derivatización de aminoácidos.

En un tubo de ensayo de 4x50 mm, depositense 10µl 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 µl del buffer de boratos, agítese el tubo en un vórtex por 10 segundos y finalmente se agregan 20 µl 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

Se inyectan 5 a 20 µl de muestra o 5 µl de estándar de aminoácidos (0.2 mM), el tiempo de corrida es de 55 minutos.

Gradiente de elusión empleado para la determinación de aminoácidos

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

Cálculo del contenido de aminoácidos en g/16 g de N.

Se calcula el contenido de cada uno de los 17 aminoácidos comparando la relación $\text{Area}_{\text{aminoácido}}/\text{Area}_{\text{norleucina}}$ de la muestra contra la relación $\text{Area}_{\text{aminoácido}}/\text{Area}_{\text{norleucina}}$ del estándar de aminoácidos, de acuerdo a la ecuación 1, para reportar el contenido en $\text{g}_{\text{aminoácido}}/16 \text{ g N}$.

Ecuación 1.

Cálculo del contenido de aminoácidos en g/16 g de N

$$A = \frac{1.6 \times [(A_{aa}/A_{n\text{-leu}})_{\text{mtra}} \times (A_{n\text{-leu}}/A_{aa})_{\text{std}} \times C_{\text{std}} \times a \times \text{P. M.}]}{[\text{mg}_{\text{mtra}} \times \% \text{ N}]}$$

Donde:

A = aminoácido (g/16 g de N)

A_{aa} = área del aminoácido dado

A_{n.leu} = área de norleucina

m_{tra} = en la muestra

std = en el estándar

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

a = aforo del hidrolizado

P.M. = peso molecular del
aminoácido dado

mg_{m_{tra}} = cantidad de muestra
en mg

%N = porcentaje de nitrógeno
en la muestra seca
desengrasada

2.11.2 DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE TRIPTOFANO

(Lucas y Sotelo, 1980; Rama, et.al., 1974)

Fundamento

Se realiza una hidrólisis alcalina con LiOH y se desarrollará color con *p*-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) y nitrito de sodio.

Material y Equipo

- Digestor marca TECATOR mod. AB
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Balanza analítica
- Rotavapor marca BUCHI, mod. RE/III
- Vórtex 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.

Reactivos

A) Solución estándar de triptofano (0.05 mg/ml): Pesar 12.5 mg de triptofano y aforar a 250 ml con agua destilada.

B) Solución de DMAB al 0.5%: Pesar 0.5 g de DMAB y disolverlos con HCl concentrado, aforar a 100 ml con HCl concentrado.

C) Nitrito de sodio al 0.2%: Pesar 200mg de nitrito de sodio y aforar a 100 ml con agua destilada.

D) Hidroxido de Litio 4 N

E) HCl concentrado

de HCl concentrado, en tanto que a los otros dos se les agregan 7.5 ml de DMAB al 5 %

- Se agitan y se dejan en reposo por 15 minutos en la oscuridad.
- Después de este tiempo se les agrega a los tres tubos 0.5 ml de nitrito de sodio, se agitan y se dejan otros 15 minutos en reposo.
- Leer la absorbancia a 590nm. Se usa como blanco el de la curva estándar.

Cálculos.

A los tubos problema se les resta la absorbancia del blanco de la muestra y el resultado se interpola en la curva estándar, considerando el porcentaje de grasa de la muestra, el aforo y la alícuota utilizados.

Recordar que para reportar en g de triptofano/ 100 g de proteína es necesario conocer el porcentaje de proteína de la muestra.

Reportar g de triptofano / 100 g de proteína.

$$\text{g de Trp/100 g de proteína} = \frac{[(T/a)(V_{\text{HID}})/A]}{B \times (100 \text{ g de prot})}$$

Donde:

T= g de triptofano interpolados

a= alícuota del hidrolizado (para este caso se tomaron 0.5 ml del hidrolizado y se llevaron a 2ml con agua)

V_{HID} = volumen total del hidrolizado (25 ml)

A= peso de la muestra (g)

B= g de proteína / 100 g de muestra

2.11 ENSAYO BIOLÓGICO

2. 11.1 RELACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PROTEÍNA

(Pellet, Young, 1980)

Preparación de las Dietas

Se prepara una dieta control de caseína que contiene el 10 % de proteína, 14% de lípidos y 66 % de carbohidratos (tabla 5) Se preparan las dietas experimentales (tabla 6) isoproteicas e isocalóricas en relación a la dieta control de caseína (430 Kcal/100 g, 1800 KJ/100 g)

Tabla 5. Formula base para la elaboración de las dietas

Componente	(%)
Caseína (90% de proteína)	11.11
Sacarosa	22.0
Dextrosa	19.0
Dextrina	25.0
Manteca vegetal	8.0
Aceite vegetal	6.0
Vitaminas	2.0
Minerales	4.0
Celulosa	2.89 (±3)

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales (g/100g)

Componente	Semilla seca	Semilla seca	Germinado	Germinado
	Cruda*	Cocida	Crudo	Cocido
Muestra	27.13	36.11	25.42	26.08
Sacarosa	20.01	16.79	18.51	18.52
Dextrosa	17.36	14.52	16.0	16.01
Dextrina	22.84	19.11	21.05	21.06
Manteca vegetal	5.86	5.05	5.86	5.78
Aceite de maíz	4.39	3.78	4.39	4.34
Vitaminas	2.0	2.0	2.0	2.0
Minerales	4.0	4.0	4.0	4.0
Celulosa	—	—	2.75	2.21

*Se conoce el alto contenido de alcaloides en la semilla seca cruda de *E. americana*, sin embargo tomo de referencia para comparar el efecto de los alcaloides de la semilla germinada cruda, que también se encuentran en una alta cantidad, pudiendo existir variación en el tipo de alcaloide.

Prueba

- Pesar las 30 ratas individualmente
- Repartirlas de acuerdo a la distribución de "culebra japonesa" (Se colocan los pesos de las ratas en forma ascendente o descendente distribuyéndolos en 5 diferentes lotes en forma zigzagueante)
- La diferencia en peso promedio entre los lotes debe ser menor a 1 gramo.
- Se coloca cada rata en una jaula
- En total son cinco lotes de 6 ratas cada uno (lote 1 semilla seca cruda, lote 2 semilla seca cocida, lote 3 germinado crudo, lote 4 germinado cocido y lote 5 dieta control)
- Colocar debajo de cada jaula una charola de papel (para recuperar el alimento desperdiciado)^a

- Pesar el alimento que se le dará a cada animal y registrarlo ^a, colocarlo dentro de la jaula así como agua "ad libitum"
- Cada tercer día se registra el peso de cada rata ^a, el alimento ingerido ^b, se les proporciona más alimento ^a y se cuida que tengan suficiente agua.

^a Para lo cual se debe llevar una hoja-registro para cada animal

^b Es importante recuperar todo el alimento posible que los animales tiran a las charolas durante su alimentación, el cual debe ser pesado para poder cuantificar el alimento ingerido por el animal.

Hoja registro

Rata: _____ Sexo: _____	Peso inicial (Pi): _____	Dieta: _____	Fecha: _____																		
Tiempo (días)																				Final:	
Peso del animal (P día)																					Pf=
Incremento acumulativo (Pdía-Pi)																					Pf-Pi=
Alimento inicial (Ai)																					
Alimento final (Af)																					
Alimento ingerido (AI= Af-Ai)																					
Alimento acumulativo (ΣAI) día																					ΣAI
Observaciones: _____																					

Cálculos

Calcular para cada rata el REP:

$$\text{REP} = \frac{\Delta P}{\sum AI \times F}$$

Donde:

ΔP = Incremento de peso (en gramos)

$\sum AI$ = Alimento ingerido total (en gramos)

F = % de proteína en la dieta / 100

Si el coeficiente de variación es mayor al 15 % se debe eliminar el dato más alto y el más bajo, calculado el REP con 4 datos.

Para que los datos puedan ser comparados se debe ajustar el valor de REP experimental al valor de REP de referencia de caseína que es 2.5 de la siguiente manera:

$$\text{REP ajustado} = \text{REP experimental} \times \frac{\text{REP caseína (referencia)}}{\text{REP caseína (experimental)}}$$

2. 11.2 DIGESTIBILIDAD APARENTE

Procedimiento:

- Del bioensayo de REP se recolectan las heces de cada lote en forma individual por un periodo de una semana (la última semana del bioensayo), el total de heces recolectadas de cada animal se coloca en frascos de vidrio, las cuales serán secadas en una estufa.
- Se registra el alimento ingerido en el mismo periodo
- Una vez secas las heces, se pesan y muelen en un mortero para obtener el material lo más homogéneo posible.
- De cada lote pesar de 50 a 90 mg de heces y determinar la concentración de nitrógeno por el método de micro-Kjeldahl.

- Para calcular la digestibilidad es necesario saber el contenido de N de las dietas ingeridas, determinarlo por el método de micro-Kjeldahl.

Cálculos

Conociendo la concentración de N en la dieta y las heces del animal, así como el total respectivo de heces, se podrá calcular el N ingerido y el N fecal:

$$NI = (\% \text{ N en la dieta} \times \text{dieta ingerida (g)}) / 100$$

$$NF = (\% \text{ N en las heces} \times \text{total de heces (g)}) / 100$$

Y para calcular la digestibilidad aparente:

$$D \text{ aparente} = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

Donde :

NI= nitrógeno ingerido

NF=nitrógeno fecal

CAPITULO 3

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS PROXIMAL

En la tabla 3.1.a se observan los resultados del análisis proximal en base seca realizado a las cuatro muestras, semilla seca cruda y cocida, semilla germinada cruda y cocida, de donde se aprecia un alto contenido de proteína, superior al de la lenteja o garbanzo.

El tratamiento térmico aplicado a la semilla germinada para su cocción, no modificó prácticamente el contenido de proteína. Con la cocción de la semilla se observa un aumento del 20.64 % en el contenido de proteína, el tratamiento de cocción aplicado fue diferente y probablemente algunas fracciones de carbohidratos y lípidos así como de sales se desplazaron al agua de cocción, su contenido en la semilla disminuyó con lo que la proporción de proteína se vio incrementada.

Al final de la germinación únicamente se recolecta el germinado de la semilla que la testa se encuentra totalmente separada, con lo que se puede observar una gran disminución en el contenido de fibra en la semilla germinada al compararse con la semilla seca.

Tabla 3.1.a. Análisis proximal en base húmeda de las muestras de semilla seca y germinado (crudas y cocidas) de *E. americana* (g/100g de muestra)

Muestra	Humedad	Proteínas	Grasa	Fibra	Carbohidratos	CHO'S
Germinado Crudo	73.41 ± 2.86 ^b	10.64 ± 0.11 ^b	3.99 ± 0.99 ^b	0.88 ± 0.05 ^b	1.26 ± 0.09 ^b	9.82
Germinado Cocido	80.53 ± 2.73 ^b	7.70 ± 0.18 ^a	2.89 ± 0.08 ^a	0.80 ± 0.03 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	7.29
Semilla Seca Cruda	16.00 ± 0.34 ^a	25.51 ± 0.88 ^b	13.76 ± 0.39 ^b	12.30 ± 0.24 ^a	4.49 ± 0.19 ^b	27.93
Semilla Seca Cocida	56.60 ± 1.67 ^b	18.20 ± 0.63 ^c	6.32 ± 0.23 ^c	6.35 ± 0.16 ^b	1.72 ± 0.00 ^b	10.78

Los resultados son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. Los carbohidratos se calcularon por diferencia. Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

Tabla 3.1.b. Análisis proximal en base seca de las muestras de semilla seca y germinado (crudas y cocidas) de *E. americana* (g/100g de muestra)

Muestra	Proteínas	Grasa	Fibra	Carbohidratos	CHO'S
Germinado Crudo	40.01 ± 0.35 ^a	14.96 ± 0.36 ^a	3.33 ± 0.18 ^b	4.73 ± 0.39 ^a	36.97
Germinado Cocido	39.49 ± 0.91 ^a	15.34 ± 0.48 ^a	4.10 ± 0.16 ^b	3.97 ± 0.22 ^b	37.1
Semilla Seca Cruda	30.34 ± 0.88 ^b	16.40 ± 0.47 ^a	14.62 ± 0.29 ^a	5.35 ± 0.23 ^a	33.29
Semilla Seca Cocida	41.93 ± 1.36 ^a	14.56 ± 0.54 ^a	14.64 ± 0.30 ^a	4.02 ± 0.04 ^b	24.95

Los resultados son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. Los carbohidratos se obtuvieron por diferencia. Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2 FACTORES ANTINUTRICIONALES

Inhibidores de tripsina

La semilla seca de *E. americana* contiene una gran cantidad de inhibidores de tripsina tal como se muestra en las tablas 3.2.a y 3.2.b, siendo así un valor muy alto cuando se compara con la soya o frijol común, representando un riesgo a la salud como factor antinutricional. Con la cocción disminuye significativamente el contenido de inhibidores de tripsina; es sabido que procesos domésticos como la cocción disminuyen el contenido de los anteriores, lo cual es comprensible dado su naturaleza proteínica, ocasionando una disminución del 94.54 % en las semillas secas de *E. americana*.

Se observa también como la actividad inhibitoria declina grandemente durante la germinación, lo que se sugiere se debe al rompimiento de los inhibidores por la actividad proteolítica que se desarrollada durante la germinación (Al-bakir, et. al., 1981; Hatano, et. al., 1997)

La actividad inhibitoria para la semilla cocida, y semilla germinada cruda y cocida es considerada baja, por lo que no representa un riesgo a la salud, como factor antinutricional, aquí se observa el beneficio que representa la germinación y/o cocción para reducir el contenido de inhibidores de tripsina en la semilla seca de *E. americana*.

Taninos

En las tablas 3.2a y 3.2b se muestran los resultados de las determinaciones de factores antinutricionales realizadas a las cuatro muestras de *E. americana*, semilla seca cruda y cocida, y semilla germinada cruda y cocida. Se observa que durante la cocción (y drenado) de la semilla seca hay una reducción en el contenido de taninos del 55%.

Con la cocción (y drenado) de la semilla germinada la reducción en el contenido de taninos es del 28%.

Los taninos son compuestos termoestables, sin embargo varios trabajos realizados en leguminosas y sus semillas muestran que mediante un tratamiento térmico con calor húmedo (cocción normal o en autoclave) hay una disminución en el contenido de taninos, también indican que se encuentran presentes en el agua de cocción (Sharma y Sehgal 1992; Gil 2000).

Durante la germinación hay un notorio decremento en el contenido de taninos (de 0.143 a 0.032%), siendo éste del 77.46%, lo que en parte puede ser atribuido a su abundancia en la corteza (testa) de la semilla ya que al final de la germinación (12 días) se encuentra completamente separada, por lo que es eliminada y recolectado solo el germinado. Diversos estudios reportan la disminución en el contenido de taninos durante la geminación de diversas leguminosas, este decremento lo atribuyen a la presencia de la polifenoloxidasas, que, como ya se mencionó anteriormente, cataliza la hidroxilación de varios monofenoles y la oxidación aeróbica de difenoles (Savelkoul, et al. 1992)

Mediante la germinación, posterior cocción y eliminación del agua de cocción hay una reducción en el contenido de taninos, siendo en la semilla seca de *E. americana* del 80.81%.

Lectinas

En la tabla 3.2.a se muestra el título de lectinas encontrado, en todas las muestras el título obtenido es muy bajo y se considera como de bajo riesgo al alimento en cuanto al contenido de estas ya que con un título mayor a 10 un alimento ya es considerado como de relativo riesgo (no todas las lectinas son tóxicas)

Se puede decir que mediante la cocción y retiro del agua de cocción es posible disminuir el contenido tanto de taninos como de inhibidores de tripsina, sin embargo con la germinación también es posible hacerlo, lo que representa una gran ventaja para el consumo de los anteriores.

Tabla 3.2.a. Factores antinutricionales de *E. americana* base húmeda

Muestra	Inhibidores De tripsina ¹ UTI/mg de Muestra seca	Taninos g taninos/ 100 g de muestra	Lectinas ² (Título) ³
Germinado crudo	0.32 ± 0.03 ^c	0.008 ± 0.001 ^c	3
Germinado cocido	ND	0.006 ± 0.000 ^o	1
Semilla seca cruda	71.60 ± 2.09 ^a	0.1 23 ± 0.002 ^a	5
Semilla seca cocida	2.01 ± 0.10 ^b	0.028 ± 0.000 ^b	2

Tabla 3. 2.b. Factores antinutricionales de *E. americana* base seca

Muestra	Inhibidores De tripsina ¹ UTI/mg de Muestra seca	Taninos g taninos/ 100 g de muestra seca	Lectinas ² (Título) ³
Germinado crudo	1.18 ± 0.08 ^c	0.032 ± 0.005 ^c	3
Germinado cocido	ND	0.023 ± 0.001 ^c	1
Semilla seca cruda	85.18 ± 2.47 ^a	0.143 ± 0.001 ^a	5
Semilla seca cocida	4.75 ± 0.24 ^b	0.064 ± 0.000 ^b	2

Para la tabla 3.2.a y 3.2.b los resultados son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. 1=UTI: unidad de tripsina inhibida, 2 = Se utilizaron eritrocitos de Hamster, 3= Título: máxima dilución en que se presenta aglutinación. ND= no detectados Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

3.3 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

En la tabla 3.3 se muestra el contenido de alcaloides obtenido para las muestras de semilla seca y semilla germinada (crudas y cocidas). En la semilla seca hay una reducción en el contenido de alcaloides del 52.6 % mediante la cocción y retiro del agua de cocimiento, los alcaloides son compuestos termoestables y fueron eliminados en parte en el agua de cocción ; en el germinado también hay una gran reducción de alcaloides por la misma razón, siendo del 71.5 %.

Al comparar los resultados en base seca, se obtiene un valor de alcaloide ligeramente mayor en el germinado, sin embargo no existe diferencia significativa al realizar el análisis estadístico con un nivel de significancia del 0.05 %, por lo que se puede decir que no hay cambios en el contenido de alcaloides durante la germinación de la semilla seca de *E. americana*.

Tabla 3.3 Determinación de alcaloides de *E. americana*

Muestra	alcaloide g /100 g de muestra seca	alcaloide g /100 g de muestra húmeda
Semilla seca	1.055 ± 0.028 (2.670) ^A	0.924 ± 0.020 (2.220) ^A
Semilla seca cocida	0.500 ± 0.014 (2.800) ^B	0.217 ± 0.005 (2.757) ^B
Germinado	1.098 ± 0.022 (2.003) ^A	0.280 ± 0.007 (2.830) ^C
Germinado cocido	0.313 ± 0.013 (4.153) ^D	0.061 ± 0.002 (4.239) ^D

Los resultados anteriores son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones, entre paréntesis su coeficiente de variación. Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

3.4 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Como se puede observar de las tablas 3.4.1 y 3.4.2 se tiene un buen perfil de aminoácidos tanto en la semilla seca (cruda y cocida), como en la semilla germinada (cruda y cocida), superando el patrón de la FAO (1985) en todos los aminoácidos excepto en los aminoácidos azufrados los cuales fueron los limitantes en todos los casos.

Tabla 3.4.1. Perfil de aminoácidos del germinado crudo y cocido de *E. americana*

Aminoácido	Germinado Crudo	Germinado Cocido
	(g / 16 g de N)	
Aspártico	9.15 ±1.09	7.99 ±0.34
Serina	2.48±0.33	2.86± 0.27
Glutámico	9.07 ±1.34	9.21 ±0.10
Glicina	1.87±0.11	2.23 ±0.11
Histidina	1.58 ±0.10	1.79± 0.09
Arginina	3.92±0.12	4.59 ±0.30
Treonina	2.40± 0.02	2.81± 0.23
Alanina	3.30± 0.36	3.63± 0.14
Prolina	3.75±0.29	4.42 ±0.32
Cistina	0.47± 0.10	0.48 ±0.03
Tirosina	1.67± 0.09	2.76± 0.15
Valina	3.92± 0.17	4.69± 0.35
Metionina	0.87± 0.04	1.00 ±0.04
Lisina	5.15± 1.34	5.47± 0.20
Isoleucina	3.21± 0.07	3.97± 0.17
Leucina	5.96± 0.14	5.48 ±0.33
Fenilalanina	1.00± 0.23	0.75± 0.00
Triptofano	2.73±0.02	2.63±0.09
Suma de a.a indispensables	27.28	30.14
a.a Limitante	Metionina + cistina	Metionina + cistina
Cuenta química**	79.82	87.05

Donde n = 3, se representa el promedio y la desviación estándar

**La cuenta química de cada aminoácido fue calculada usando como referencia las necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO/WHO/UNU (1985) para adultos (Tabla 3), y se expresa como (g aminoácido/16 g de N de la proteína de la muestra/ g aminoácido/16 g de N de la proteína de referencia) X 100

Tabla 3.4.2. Perfil de aminoácidos de la semilla cruda y cocida de *E. americana*

Aminoácido	Semilla Seca	Semilla Seca
	Cruda	Cocida
	(g / 16 g de N)	
Aspártico	7.86±1.29	7.99 ±0.33
Serina	2.43±0.33	2.86± 0.13
Glutámico	9.64 ±0.22	10.9 ±0.39
Glicina	2.42±0.30	2.13 ±0.20
Histidina	1.53 ±0.22	1.88± 0.14
Arginina	4.08±0.77	3.85±0.25
Treonina	3.63± 0.70	2.53± 0.16
Alanina	4.20± 0.09	3.70± 0.20
Prolina	3.75±0.22	3.85 ±0.18
Cistina	0.30± 0.05	0.32 ±0.02
Tirosina	0.90± 0.01	1.39± 0.12
Valina	4.05± 0.17	4.18± 0.17
Metionina	0.75± 0.07	0.74 ±0.02
Lisina	6.26± 0.15	6.10± 0.30
Isoleucina	2.83± 0.04	3.43± 0.12
Leucina	5.55± 0.01	6.49 ±0.12
Fenilalanina	0.51± 0.01	0.52± 0.04
Triptofano	2.34±0.00	1.80±0.08
Suma de a.a indispensables.	27.12	27.6
a.a Limitante	Metionina + cistina	Metionina + cistina
Cuenta química**	61.76	62.94

Donde n = 3, se representa el promedio y la desviación estándar

**La cuenta química de cada aminoácido fue calculada usando como referencia las necesidades de aminoácidos sugeridas por la FAO/WHO/UNU (1985) para adultos (Tabla 3), y se expresa como (g aminoácido/16 g de N de la proteína de la muestra/ g aminoácido/16 g de N de la proteína de referencia) X 100.

3.5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

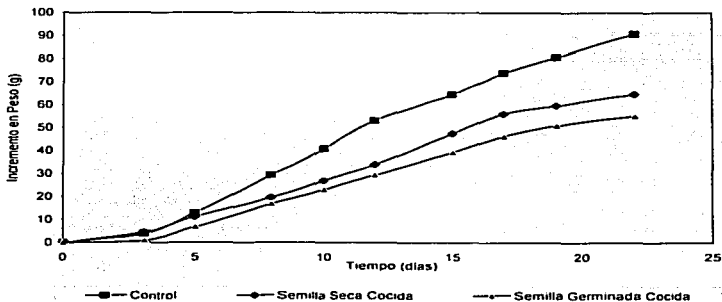
En la tabla 3.5.a y la gráfica 1 se observa la diferencia en el incremento en peso acumulado por las ratas alimentadas con las dietas experimentales y control (caseína), hay una mayor ganancia en peso en la dieta control, es seguida por la semilla seca cocida y finalmente por el germinado cocido.

Tabla.3.5.a Incremento en peso de las ratas alimentadas con las diferentes dietas (gramos)

Dieta / Día	0	3	5	8	10	12	15	17	19	22
Caseína (Promedio) (DE)	0	3.8 3.56	12.93 5.69	29.31 8.33	40.90 11.00	53.15 23.99	64.66 14.05	73.90 14.93	80.86 14.71	90.76 18.95
Semilla seca cocida (Promedio) (DE)	0	4.46 17.42	11.25 17.57	19.56 17.41	26.90 18.41	33.96 19.9	47.61 21.68	56.10 22.29	59.78 23.48	64.81 25.06
Semilla germinada cocida (Promedio) (DE)	0	0.95 2.62	6.87 0.86	16.81 2.71	22.86 1.97	29.50 2.67	39.41 7.55	46.35 8.76	51.10 9.22	55.25 9.09

Los resultados son el promedio \pm DE. (n=6)

Gráfica 1. Comparación del Crecimiento de ratas alimentadas con diferentes dietas a base de *E. americana*



3.5.1. RELACIÓN DE LA EFICIENCIA PROTEÍICA (REP)

Las ratas alimentadas con la dieta de semilla seca cruda y la dieta de germinado crudo ingirieron poca cantidad de alimento, con lo anterior fueron bajando de peso y murieron entre el día 12 y 15 del ensayo, por lo que el REP no fue posible calcularlo para estas dietas. La muerte se asume debida a la alta concentración de alcaloides en la semilla seca y semilla germinada con que se prepararon las dietas (Derache, 1990)

REP corregido para la semilla seca cocida fue de 1.75, mayor que para la semilla germinada cocida que fue de 1.56 (Tabla 3.5.1) los valores para ambos sugieren que la calidad proteica es buena, aunque presentan un bajo contenido de aminoácidos azufrados. Se deduce que de las dos dietas la semilla seca cocida es la que mejor utilizan las ratas para su desarrollo y mantenimiento, es decir proporcionan una proteína más eficiente; quizás debido a que el contenido de aminoácidos azufrados es mayor en ésta.

Existen trabajos previos donde reportan un REP de 2.3 con una dieta a base de semilla seca destoxificada (Sotelo, et. al., 1993), donde muestra que *E. americana* tiene una buena calidad proteínica. Probablemente el tratamiento térmico influyó en la utilización de algunos aminoácidos, por lo que se obtuvo un REP más bajo.

Tabla 3.5.1 Resultados de La Relación de Eficiencia Proteica en la semilla seca y semilla germinada (cocidas) de *E. americana*

Muestra	REP	REP ajustado
Control (caseína)	4.0 ± 0.26 ^a	2.5
Semilla seca cocida	2.87 ± 0.43 ^b	1.75 ± 0.26
Semilla Germinada cocida	2.48 ± 0.29 ^c	1.51 ± 0.17

Los resultados anteriores son el promedio ± Desviación estándar (n=6). Letras diferentes (A,B,C.) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

3. 5.2 DIGESTIBILIDAD

De la tabla 3.5.2 se observan los valores de digestibilidad aparente para la semilla seca y germinado cocidos, para las muestras crudas no se determinaron porque, como ya se mencionó los animales murieron. La digestibilidad para el germinado cocido fue muy buena, de hecho no se encontró diferencia significativa ($\alpha=0.05$) con la dieta control de caseína, es decir los aminoácidos de la proteína están disponibles para ser absorbidos por el organismo de las ratas. La digestibilidad para la semilla seca cocida fue menor, lo que indica una digestibilidad baja al compararse el su control.

Es sabido el efecto positivo de la cocción y la germinación sobre la digestibilidad, durante la cocción se inactivan algunos factores antinutricionales de naturaleza termolábil (lectinas e inhibidores de tripsina), con la germinación algunos factores antinutricionales (inhibidores de proteasas, polifenoles, etc.) son catabolizados con lo que se deja a las proteínas más accesibles a la acción enzimática (Kataría, et al. 1992, Mulimani and Vadiraj 1993; Salvelkoul, et al 1992), con lo que se explica la mayor digestibilidad del germinado cocido sobre la semilla cocida, aunado a un mayor contenido de fibra en la semilla seca cocida (5.3% de fibra en la semilla seca cocida y 3.3 % en la semilla germinada cocida) (Tabla 1.a y tabla 5)

Tabla 3.5.2 Digestibilidad aparente de las muestras de *E. americana*

Dieta	Digestibilidad aparente promedio(%)	\pm desviación estándar	coeficiente de variación (%)
Caseína o control	92.83 ^a	1.016	1.093
Semilla Germinada cocida	87.19 ^A	1.519	1.743
Semilla seca cocida	71.92 ^B	2.56	3.57

Letras diferentes (A,B) indican diferencia significativas con $\alpha=0.05$

CONCLUSIONES.

La harina de la semilla seca cruda y la semilla germinada cruda de E americana tienen un alto porcentaje de proteína, mayor al de muchas leguminosas comestibles.

El contenido de inhibidores del tripsina es muy alto en la semilla seca, y disminuye con la germinación y con la cocción (y drenado). El contenido de taninos también disminuye con la cocción y drenado, así como con la germinación (con eliminación de la testa principalmente). Se encuentra un título bajo de lectinas en la semilla seca cruda, el cual disminuye ligeramente con la germinación y con la cocción (y drenado).

Mediante la cocción y eliminación del agua de cocción el contenido de alcaloides se ve disminuido tanto en la semilla seca como en la semilla germinada.

Los aminoácidos limitantes en las semillas secas(cruda y cocida) y semillas germinadas (crudas y cocidas) fueron los azufrados, siendo mayor su calificación química en la semilla germinada cocida.

Se obtiene una eficiencia proteínica mayor en la semilla seca cocida que en la semilla germinada cocida; aunque existe una menor digestibilidad de los aminoácidos en la semilla seca cocida.

La semilla seca cocida y semilla germinada cocida tienen una buena calidad nutricia.

RECOMENDACIONES

Aunque la cantidad de alcaloides disminuyó significativamente mediante la cocción y drenado, restaría hacer un estudio DOSIS-DEPENDIENTE para observar el efecto de los alcaloides residuales después del tratamiento térmico y drenado, y de esta manera saber si pueden o no ser consumidos (por animales) como fuente de proteína.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar I; Giral F. and Espejo O. (1981) *Alkaloids from the flowers of Erythrina americana*. *Phytochemistry*. 20:2061-2062
- Al-Bakir A; Sochde A; Nacum I (1981) *Occurrence and stability of trypsin inhibitors in Iraqi local legumes*. *J Agric Chem* 30:1184-1186
- AOAC Official Methods of Analysis, 15th ed; Association of Official Analytical Chemist. Arlington, VA 1990.
- Bates P; Knapp F. and Aravio P. (1977) *Protein quality of green -mature, dry mature and sprouted soy beans (research)*. *J Food Sci*. 42: 271-272.
- Bidlingmeyer, B. Cohen, S; Tarvin, T. (1984) *Rapid Analysis of amino acids using pre column derivatization*. *J. Chromatogr*. 336:93-104
- Brian A; Allan G; Cameron (1997) *Ciencia de los alimentos y salud*. Editorial Limussa. 5a. Edición. México. Pág. 183-184.
- Carias D; Cioccia A. y Hevia P. (1995) *Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto entre el cómputo químico*. *Arch. Latin. de Nut.*, 45(2):111-115
- Casanueva E; Kaufer M; Pérez A. Y Arroyo P. (1996) *Nutriología Médica*, Editorial Panamericana, México, Pág. 389-395
- Cavada B; Santod C; Grangeiro T; Nunes E; Sales P; Ramos R; Sousa F; Crisostomo C; and Calvete J. (1998) *Purification and characterization of a lectin from seeds of Vatairea macrocarpa duke*. *Phytochemistry*. 49(3): 675-680
- Cohen, S. Michaud, D. (1993) *Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hidroxy succinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hidrolisate amino acids via HPLC*. *Anal. Biochem*. 211:27-287
- Derache R. (1990) *Toxicología y seguridad de los alimentos*, Ediciones Omega, Barcelona, Pág. 82-84.
- FAO WHO (1985) *Necesidades de energía y proteína*. Serie de informes técnicos, No 724
- García-Mateos R. (1996), *Estudio químico-biológico de los alcaloides de Eiythrina americana*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Montesillo, Edo. de México, pag. 13-50.

García-Mateos R; Lucas B; Zendejas M; Soto-Hernández M; Martínez M. y Sotelo A. (1996) *Variation of total Nitrogen, Non-protein Nitrogen content, and types of alkaloids at different stages of development in E. americana seeds.* J. Agric. Food Chem. 44:2987-2991.

García-Mateos R; Soto Hernández and Kelly D. (1998) *Alkaloids from six eritrina species endemic to Mexico,* Biochem. System. and Ecol. 26: 545-551.

Garín-Aguilar M; Ramírez J; Soto-Hernández M; Valencia del Toro G. and Martínez M. (2000) *Effect of crude extract of Erythrina americana mill on aggressive behavior in rats.* J. of Ethnophar. 69 :189-196

Gil M. (2000) *Efecto de los taninos del frijol negro (Phaseolus vulgaris) en la mucosa intestinal de rata a nivel ultraestructural.* Tesis de Licenciatura UNAM. Pág. 5-30

Guerrero L. (1980) *Estudio comparativo de la composición química y factores tóxicos de dos variedades de Eritrina.* Tesis de Licenciatura UNAM Pág. 46

Hagen S; Frost. B; Augustin, J. (1989) *Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in foods.* J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72:112-116

Hatano K; Shimada T; Hiraiwa N; Nishimura M. and Nishimura I. (1997). *A rapid increase in the level of binding protein (BIP) is accompanied by shynthesis and degradation of storage proteins in pumking cotyledons,* Plant Cell Physiol. 38(3): 344-351.

ISO 9648 (1988) *Sorghum- determination of tannin content,* 1st ed,pág12-15

Kakade. M; Rackis J; Mcghee J. and Puski G. (1974) *Determination of trypsin Inhibitor Activity of soy Products: A Colaborative. Analysis of Improved Procedure.* Cereal Chem. 51:376-382.

Kataria A. Chauan B. and Punia D. (1992) *Digestibility of proteins and starch (in vitro) of amphidiploids (black gram X mung bean) as affected by domestic processing and cooking.* Plant Food Hum Nut. 42:117-125.

Kigel J and Galili G. (1995) *Seed development and germination,* Marcel Dekker Inc., New York, EUA, Pág. 307.

Liener I.E.(1980) *Toxic constituents of plant foodstuffs,* Series of monographs, Academic Press, segunda ed. , New York. Pág. 14-16.

Lloyd I.E, Mcdonald B, Crampton E. (1982) *Fundamentos de nutrición,* editorial Acribia, Zaragoza, España, Pág. 122-132.

Lucas B; Sotelo A. (1980) *Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and Feeds*. Anal. Biochem 39:192-197

Lucas B; Sotelo A. (1993) *A useful modification of the hemagglutination method for screening of lectin in legume seeds*. Second International workshop on ANF's in legume seed. EAPP Wageningen. Publication N. 70 pág. 71-74

Mongeau R; Sarwar G; Peace R. and Brassard R. (1989) *Relationship between dietary fiber levels and protein digestibility in selected foods as determined in rats*. Plant Foods Hum Nut. 39:45-51.

Mulimani V.H. & Vadiraj S. (1993) *Effects of heat treatment and germination on trypsin and chymotrypsin inhibitory activities in sorghum (Sorghum bicolor Moench) seeds*. Plant Foods Hum Nut. 44:221-226.

Muller H. G & Tobin G. (1998). *Nutrición y ciencia de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pág. 82-98

Nielsen S. & Liener I.E. (1984) *Degradation of the major storage protein of P. vulgaris during germination*. Plant Physiol . 74:494-498.

Pellet P; Young V. (1980) *Nutritional evaluation of protein foods*; The United Nations University World Hunger Programme, Food and Nutrition Bulletin Supplement 4; The United Nations University; Tokyo. Pág. 1-6,27-64.

Qin G; Versteegen M. and Van der Poel A. (1998) *Effect of temperature and time during steam treatment on the protein quality of full-fat soybeans from different origins*. J. Sci Food Agric. 77: 393-398.

Rama R; Tara M; Chandra K. (1974) *Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses*. Journal of Food Sci. Tech. 11:213-216.

Rao Y Dosthale G. (1982) *Tannin content of pulses : varietal differences and effects of germination and cooking*. J. Sci Food Agric. 33: 1013-1016.

Rao Y Dosthale G. (1987) *Polyphenoloxidase activity in germinated legume seeds*. J. Food Sci. 52:1549-1555.

Savelkoul F; Van Der Poel A. and Tamminga (1992). *The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins, and amylase inhibitors in legume seeds during germination*. A review, Plan Food Hum Nut. 42:71-85.

Sarwar G; Peace R; Botting H. and Brule O. (1989) *Relationship between amino acid scores and protein quality indices based on rat growth*, Plan Foods Hum Nut. 39:33-44.

Sarwar G; Peace R; Botting H. and Brule O. (1989) *Digestibility of protein and aminoacids in selected foods as determined by a rat balance method* Plan Foods Hum Nut. 39:23-32.

Secretaría de Salud. (2000) Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo 1. México. Séptima edición. Pág.184-48.

Sharma A. & Sehgal S. (1992) *Effect of domestic processing, cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of faba bean (Vicia faba)*, Plant Foods Hum Nut. 42:127-133.

Sotelo A. y Lucas B. (1998) *Variation in antinutritional factors at different development stage in seed of Phaseolus vulgaris and Erytrina americana*. Recent Advances of Resech in Antinutricional factors in Legume seeds and Repessed. Pág. 409-412.

Sotelo A; Soto M; Lucas B. and Giral F. (1993). *Comparative studies of the alkaloidal composition of two mexican erytrina species and Nutritive value of the detoxified seeds*, J. Agric. Food Chem. 41: 2340-2343.

Thompson L; Rea R and Jenkins D. (1983) *Effect of heat processing on hemagglutinin activity in red kidney beans*. J Food Sci. 48:235-236.

Van Der Poel T and Blonk J. (1990) *Thermal inactivation of lectins and inhibitor activity during steam processing dry beans (P. Vulgaris) and effects on protein quality*. J. Sci. Food Agric. 43:215-228.

Ziena H; Yousset M. and El-Mahdy A. (1991) *Aminoacid composition and some antinutritional factors of cooked faba beans (Medamnis):Effects of cooking temperature and time*, J. of Food Sci. 56(5):1347-1350.