



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN
BROMATOLÓGICA Y CONTENIDO DE FACTORES
ANTINUTRICIONALES Y ALCALOIDES DURANTE
EL PROCESO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE
Erythrina americana.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIBEL DÍAZ AGUILAR



MÉXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

m. 341302



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente	Profa. Angela Sotelo López
Vocal	Profa. Lucía Bascuñan Termini
Secretario	Profa. Lucía Cornejo Barrera
1er. Suplente	Profa. Leticia Gil Vieyra
2do. Suplente	Profa. Inés Miranda Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor: M. en C. Angela Sotelo López

Supervisor Técnico: M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Sustentante: Maribel Díaz Aguilar



Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The top signature is in cursive and appears to read 'Angela Sotelo'. The middle signature is also in cursive and appears to read 'Rosa María Argote'. The bottom signature is a stylized cursive signature, possibly 'Maribel Díaz'.

“El trabajo, dice, es la condición fundamental de toda nación, y
la vida humana “

Federico Engels (1890)

Este breve trabajo es dedicado a México mi patria, y a toda mi familia.

Mil gracias por todo

INDICE

	Página
• Introducción.....	1
• Objetivos.....	3
*Capítulo 1 Antecedentes	
1.1 Leguminosas.....	4
1.1.1 Aspectos nutricionales de las leguminosas.....	5
1.1.2 Aspectos toxicológicos y antinutricionales de los leguminosas.....	6
1.2 Germinación de las semillas.....	12
1.3 <i>Erythrina americana</i>	15
1.3.1 Aspectos toxicológicos y antinutricionales durante la germinación y otros estadios de desarrollo de la <i>Erythrina americana</i>	17
1.4 Triptofano.....	18
1.5 Generalidades de la cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.....	20
1.5.1 Determinación de triptofano por HPLC.....	27
*Capítulo 2 Metodología	
2.0 Metodología.....	31
2.1 Recolección de la muestra.....	31
2.2 Limpieza y selección.....	31
2.3 Tratamiento para la germinación.....	32
2.4 Liofilización.....	32
2.5 Molienda.....	32
2.6 Análisis Bromatológico.....	32
2.7 Determinación de triptofano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	33

Las semillas secas pueden ser convenientemente almacenadas por un largo período de tiempo y de 2 a 9 días cualquiera puede obtener germinados por remojo de las semillas secas viables. Así, el tiempo de germinación es corto y el rendimiento de la producción es alto.

El efecto de la germinación sobre la composición química y constituyentes bioquímicos de las semillas tiene mucha variación dependiendo de la especie de la planta, la variedad de la semilla y las condiciones de germinación. Los datos publicados relacionados con la germinación de semillas y su composición nutricional es muy limitado y las ventajas de las semillas germinadas usadas para consumo humano y alimentación animal no han sido totalmente establecidas para diferentes tipos de leguminosas. Estudios publicados mencionan leguminosas germinadas y consumidas en países desarrollados, por lo que hay poca información disponible sobre semillas consumidas en países en vías de desarrollo. En México la variedad en leguminosas es amplia, y muchas de ellas son usadas como para consumo local, por ello la importancia de su estudio durante el proceso de germinación.

Dentro de la flora silvestre de nuestro país se encuentra una leguminosa llamada *Erythrina americana*, de la cual se conoce tiene un elevado contenido en proteína, factores antinutricionales y triptofano, este último medido por casi todos los métodos colorimétricos los cuales proporcionan valores elevados que sobrestiman la concentración de triptofano, estos podrían deberse a la presencia de metabolitos de origen indólico no identificados.

La determinación de triptofano se realiza utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa HPLC, y de esta forma conocer la concentración real y las variaciones de este aminoácido, a lo largo de la germinación de *Erythrina americana*.

OBJETIVOS

- Objetivo General

Conocer los cambios que ocurren a lo largo de la germinación de semillas de *Erythrina americana* en cuanto a su composición proximal, contenido real de triptofano y de los factores tóxicos y antinutricionales.

Objetivos Específicos

Conocer los cambios de la composición proximal de la semilla seca de *Erythrina americana* durante el lapso de germinación que corresponden a 3, 6, 9 y 12 días.

Comprobar que el valor del triptofano obtenido en trabajos previos, corresponden al valor real realizando la medición por HPLC.

Conocer la concentración de factores antinutricionales y alcaloides presentes durante el proceso de germinación.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 LEGUMINOSAS

Leguminosas es el nombre común de una familia botánica (Leguminosae), que comprende cerca de 650 géneros y más de 18 mil especies de las cuales en México se han registrado casi 1500 y de éstas sólo 20 se aprovechan en la alimentación humana. (3)

Son plantas cuyas semillas se encuentran en vainas, algunas de las cuales pueden presentar dehiscencia, es decir que cuando alcanzan la madurez se abren por ambas costuras o bien ser indehiscentes (que no se abren), como el cacahuete o el tamarindo. Sus nódulos radiculares contienen bacterias que fijan en el suelo el nitrógeno atmosférico, a ello se debe el que la mayoría de ellas proporcione una gran parte de la proteína mundial que ingieren personas y animales (aportan el 20%). Son fácilmente adaptables de crecer bajo una amplia variedad de condiciones climáticas.

Aunque las leguminosas y sus semillas difieren mucho en tamaño, forma y color, sus estructuras son muy parecidas; una cubierta delgada pero dura envuelve a una semilla con un pequeño embrión que dará origen a la raíz, el tallo y posteriormente las hojas. Hay también un ojo o hilio y una especie de endospermo, los cotiledones, que almacenan el material alimenticio de la semilla. (4,5)

Estas semillas son fuentes importantes de hierro, fósforo, calcio, tiamina y aportan cantidades apreciables de niacina y energía. Son buena fuente de aminoácidos como isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina; además de tener un alto contenido de lisina.

Presentan deficiencia en aminoácidos azufrados como metionina y cistina, pero una suplementación con alimentos ricos en estos aminoácidos (cereales) eleva su valor nutricional. (3,5)

Muchos factores anitnutricionales como inhibidores de proteasas, lectinas, aminoácidos no proteínicos, alcaloides, saponinas y glucósidos cianogénicos se encuentran en semillas de leguminosas. Algunos de estos factores pueden ser eliminados durante la cocción de las semillas; además este proceso gelatiniza el almidón, mejora la textura y mejora el sabor, pero esto se logra solamente en un medio neutro o alcalino, los ácidos tienen un efecto contrario y endurecen las paredes celulares y si se adiciona un exceso de álcali las paredes celulares se desintegran tanto que las proteínas y vitaminas pasan al agua de cocción. (4,5)

La utilidad de las leguminosas es muy amplia, muchas de ellas son excelentes forrajes, fuentes de colorantes naturales y gomas de amplio uso en la industria, brindan maderas preciosas, maderas duras para la construcción y fabricación de muebles, algunas aportan materias primas para la industria química. (3)

1.1.1 ASPECTOS NUTRICIONALES DE LAS LEGUMINOSAS

El hombre aprovecha diversas partes de las leguminosas para su alimentación; sin embargo, es mayor el consumo de las semillas maduras (secas), de acuerdo con las características de cada especie también se utilizan otras partes de la planta. Así, por ejemplo, las vainas inmaduras (ejotes) de varias leguminosas se ingiere con frecuencia en numerosas regiones; en otros sitios aprovechan las hojas, los tallos, los germinados, las semillas inmaduras (verdes), las flores y las raíces. (6) Las semillas de las leguminosas se consideran fuentes de energía y otros nutrimentos aunque fluctúa en función a la especie, del clima, del almacenamiento, del período de recolección, etc.; ya que contienen: agua, proteína, hidratos de carbono, cenizas y fibra. (7)

Entre las limitantes del uso de las leguminosas, se incluye la reducida cantidad en aminoácidos indisponibles azufrados (metionina y cisteína), la presencia de factores antinutricionales y tóxicos, lo que en conjunto reduce su biodisponibilidad. (7)

1.1.2 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS Y ANTINUTRICIONALES DE LAS LEGUMINOSAS

Todos los alimentos contienen una o más sustancias de manera natural sin valor nutricional, que en ciertos casos pueden disminuir este valor. (6) Algunas de estas sustancias son peligrosas para el organismo que las ingiere, provocando distintos trastornos y con ciertas características: inhibición del crecimiento, hipertrofia pancreática, alteración o lesión de la mucosa intestinal, hipoglucemia, disminución de la eficiencia alimentaria ocasionando una pérdida de nutrientes esenciales o interfiriendo en su utilización y función metabólica.

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

Las sustancias tóxicas son compuestos cuyos efectos fatales no pueden ser compensados por una suplementación alimentaria, ejerciendo sobre el organismo un efecto puramente tóxico. Pudiendo presentar una actividad particular, ya sea como antagonistas o agonistas, inhibidores de enzimas, hormonas o aminoácidos. En casos específicos, sus modos de acción estarían favorecidos por la existencia de una dotación genética propicia a la aparición de una patología determinada. (6)

- 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 en estas 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 los cultivos. (9)

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 nutrimentos energéticos, con la 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 (10) 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.

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 habas (*Vicia faba*), donde la aglutinación de eritrocitos disminuye durante la germinación. (11)

- FACTORES TÓXICOS:

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 eritrinas deprimen el sistema nervioso central provocando la muerte por parálisis de los músculos respiratorios. Muchos de estos alcaloides se encuentran relacionados, con la estructura indólica de triptofano. Los alcaloides encontrados en *E. americana* son α y β -eritroidina, erisovina y erisodina. La β -eritroidina es la más frecuente y el derivado más potente. La erisodina y la erisovina han sido encontradas en tejidos de semilla seca y madura pero no en las flores (12) la concentración de alcaloides aumenta con la maduración de las leguminosas. El dihidro- β -eritroidina tienen una acción semejante al curare, ha sido utilizado como relajante muscular; además, los alcaloides son anticonvulsivos, agentes hipotensivos, hipnóticos y anestésicos.

Los alcaloides de *E. americana* en ratas tienen un efecto tranquilizante y sedante, esto cuando se suministra en ratas. (12) La mayor parte de los derivados indólicos, son de origen vegetal y forman parte del variado grupo de productos con estructuras de origen indólico.

- 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 enlaces peptídicos terminales) La tripsina pertenece a las endopeptidasas (proteasas), que hidrolizan en péptidos adyacentes a la lisina o arginina.

Los inhibidores de proteasas (inhibidores de tripsina) son proteínas que inhiben la actividad proteolítica de las enzimas del tracto digestivo de animales. Se encuentran distribuidas en leguminosas se encuentran principalmente en la semilla, 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 colescistoquinasa, esta hormona estimula a las células pancreáticas a poner en libertad más tripsina y quimiotripsina principalmente, para compensar los efectos del inhibidor de tripsina. (11)

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, produce hipertrofia e hiperplasia pancreática y efectos carcinogénicos. 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. (13, 14)

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. (15)

Diversos estudios practicados a varias leguminosas muestran como a través de la germinación se ve reducido el contenido de proteína (16) así como de inhibidores de tripsina, por ejemplo, para *Vicia faba* después de la germinación hay una disminución del 65% ; en *Sorgun bicolor* a los seis días de germinación ya no se detecta actividad inhibitoria (17) reportándose un efecto similar en lentejas y frijol 52 .Esta disminución es atribuida a la ruptura interna de los inhibidores por la actividad hidrolítica que es desarrollada durante la germinación. (18)

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

- 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 fenilcarboxílico.

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 leguminosas 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 verdura 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 interactúan 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 nutritivo, 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 no nutricional también tiene que ver con su capacidad para complejar iones divalentes 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 puede ser destruida, con lo anterior las necesidades de vitaminas se incrementan. (19)

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 impeden la absorción de los nutrimentos. ⁽²⁰⁾

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* ⁽²¹⁾ en *Vicia faba* hay un aumento en la destrucción de taninos durante la germinación a las 48 horas del 91%. ⁽²²⁾ 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. ⁽²³⁾

1.2 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

La germinación es el primer estado del crecimiento de una planta el cual comienza con la toma de agua (absorción) por parte de la semilla inerte, que tiene un bajo contenido de humedad (5-15%) y termina cuando la raíz primaria (radícula) rompe el recubrimiento de la semilla para pasar a través de la raíz. Por lo que la absorción de agua por las semillas es un paso inicial y esencial haciagerminación. La cantidad total de agua tomada durante la absorción es generalmente pequeña y no excede dos o tres veces el peso de la semilla seca. ⁽²⁴⁾

Durante la germinación se desarrollan numerosos eventos, por ejemplo, la hidratación de la proteína, cambios estructurales, respiración, síntesis macromolecular y extensión de las células. Así un embrión deshidratado con un metabolismo apenas detectable se transforma con un metabolismo vigoroso que culmina con el crecimiento de una nueva planta. Para que la germinación sea completa, la radícula debe expandirse y penetrar en las estructuras del medio circundante.

La germinación en el sentido estricto, por tanto, no incluye el crecimiento de la planta tierna, lo cual comienza cuando termina la germinación. En la planta tierna naciente ocurren procesos que no son parte de la germinación, sino que son eventos post-germinativos, tales como la movilización de las principales reservas de almacenamiento.

La germinación de las semillas depende de un gran número de factores, primeramente el ambiente químico debe ser el correcto: el agua debe estar disponible para el debilitamiento de la cáscara, el metabolismo y el crecimiento; el oxígeno debe estar presente para que la semilla respire. El ambiente físico también debe ser el correcto, la temperatura y la cantidad y calidad de luz deben ser las adecuadas. El grado al cual la germinación ha sido completada en una población es usualmente expresado como un porcentaje, normalmente determinado en intervalos de tiempo durante el transcurso de la germinación. El comportamiento de las semillas durante la germinación usualmente permite trazar curvas sigmoidales; es decir, primero un minoría de las semillas germina tempranamente, después el porcentaje de germinación incrementa rápidamente.

Las semillas contienen sustancias almacenadas como fuente de reservas alimenticias, éstas son principalmente hidratos de carbono, lípidos (grasas y aceites) y proteínas. El contenido de lípidos de las semillas disminuye gradualmente según la germinación progresa. La degradación de los nutrimentos de reserva (lípidos e hidratos de carbono) durante la germinación es un proceso cuyo propósito esencial es proveer la energía requerida para el crecimiento de la planta tierna, antes de que comience su metabolismo autónomo. (25)

La vía metabólica de la pentosa-fosfato es una importante fuente de NADPH, el cual sirve como donador de hidrógeno y de electrón en la biosíntesis reductiva de los ácidos grasos. La degradación de las proteínas de almacenamiento es necesaria para hacer a los péptidos y aminoácidos disponibles para estimular el crecimiento de la semilla y de la planta tierna.

Los factores antinutricionales proteínicos como los inhibidores de amilasas, lectinas e inhibidores de tripsina están presentes en las semillas de las leguminosas y protegen a éstas contra los depredadores. Sin embargo, durante la germinación de las leguminosas, son degradados hasta niveles muy bajos por la acción de muchas enzimas. ⁽²⁶⁾ Se asume que en la germinación de las semillas están activas 3 vías respiratorias: la glicólisis, la vía pentosa-fosfato y el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarbóxico).

Durante las primeras horas después de que comienza la absorción, predomina la glicólisis opera bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas para producir piruvato. En ausencia de oxígeno el piruvato es reducido hasta etanol y CO_2 , o hasta ácido láctico si la descarboxilación no ocurre. La respiración anaeróbica, también llamada fermentación produce sólo 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, en contraste con 6 moléculas de ATP producidas durante la formación de piruvato bajo condiciones aeróbicas.

Después la mitocondria llega a ser más activa y el O_2 esta más disponible por lo que las semillas entran en un período de producción de energía para incrementar su actividad metabólica asociada con el crecimiento y la movilización de las reservas, entonces predominan la vía pentosa fosfato y el ciclo de Krebs. Así en presencia de oxígeno, además de la utilización de piruvato dentro de la mitocondria ocurre una descarboxilación oxidativa de piruvato que produce acetil-CoA, la cual es completamente oxidada hasta CO_2 y agua, vía el ciclo del ácido cítrico y rinde 30 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Además, la completa oxidación de la glucosa por la vía pentosa-fosfato y el ciclo del ácido cítrico puede rendir más de 29 moléculas de ATP. ⁽²⁵⁾

La respiración de las semillas durante la germinación involucra dos fases, en la primera de ellas hay un incremento sostenido en el consumo de O_2 , el cual puede ser atribuido en parte a la activación e hidratación de las enzimas involucradas en las vías metabólicas.

La respiración durante esta fase incrementa linealmente con la capacidad de hidratación del tejido. Después hay un retardo en la respiración y el consumo de O₂ es estabilizado o incrementa muy lentamente. La hidratación de las partes de la semilla es completada y todas las enzimas preexistentes son activas. En este punto la radícula penetra las estructuras circundantes por lo que la germinación es completada. En los procesos siguientes existe otro fuerte incremento en el consumo de oxígeno para el crecimiento de la planta tierna.

En ocasiones a pesar de que las condiciones son aparentemente favorables para la germinación y se llevan a cabo la absorción, respiración, síntesis de ácidos nucleicos y de proteína, la culminación de la extensión de la raíz no ocurre, a este fenómeno se le conoce como dormancia. La dormancia es fundamentalmente la incapacidad del embrión para germinar. Cuando las semillas contienen un bloqueo propio en el embrión ante la germinación.

Se dice que muestran una dormancia primaria, en otros casos la semilla expresa dormancia porque los tejidos que cubren el embrión ejercen una fuerza que no permite la salida de la radícula. Otro tipo de dormancia se presenta en semillas maduras de muchas especies cuando éstas experimentan condiciones desfavorables para la germinación, tales como temperaturas relativamente altas o bajas, falta de oxígeno o una iluminación inadecuada. Este tipo de dormancia es llamada secundaria y generalmente se rompe lentamente al cambiar dichas condiciones ambientales.⁽²⁶⁾

1.3 *Erythrina americana*

El género *Erythrina* pertenece a la familia *Leguminosae* y comprende cerca de 115 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Una gran cantidad de estas especies se encuentran en el sur de México (27 especies) y América Central.

Este género se describe en la literatura como productor de forraje, madera para manualidades; un árbol de soporte para cultivos trepadores, un árbol que da sombra para café, cacao u otros cultivos y un árbol ornamental. Los árboles de *Erythrina* producen biomasa que mejora la estructura de la tierra, adiciona nitrógeno, ayuda al control de la maleza, reduce la erosión y evaporación y facilita la infiltración de agua. (27, 28)

La especie *Erythrina americana* Miller, es también conocida con los nombres de Tzon-pantli, Colorina, Patol, Chocolin, Madre Chontal, Chacmolé y Pureque. Es un árbol perenne de tamaño mediano; se usa con frecuencia en ornamentación pues sus flores puntiagudas, brillantes y decorativas se agrupan en los extremos de las ramas.

Las hojas trifoliadas son de color verde claro, de 7.5 a 10 cm de largo y casi triangulares. Las flores, de color rojo vivo, aparecen en racimos en forma de cono en los extremos de las ramas; sus estambres salen fuera del pétalo enrollado. Con frecuencia estas flores se cocinan y comen como legumbres o se preparan como ensalada. (29)

El fruto es una legumbre como de 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con estrangulamiento que limitan los lóbulos donde se alojan las semillas las cuales crecen de 2 a 6; su color es rojo vivo, escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante. Estas semillas se enhebran en collares y las usan los niños en sus juegos además de tener propiedades venenosas que se emplean para destruir animales nocivos y como agentes hipnóticos. La corteza y tallos tienen propiedades venenosas y se emplean como estupefacientes para los peces. La corteza del árbol da una tintura amarilla; la madera, suave y ligera se usa para tallar pequeñas figuras e imágenes y para otros fines.

Este árbol se propaga fácilmente por estacas y se encuentra distribuido en América Central, en México es frecuente encontrarlos al sur de la capital mexicana, a la orilla de la carretera que conduce a la Ciudad de Cuernavaca y en los alrededores de Tepoztlán, se ven también en los estados del sureste mexicana como Chiapas, Veracruz y Yucatán. (30, 31)

1.3.1 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS Y FACTORES ANTINUTRICIONALES DURANTE LA GERMINACIÓN Y OTROS ESTADIOS DE DESARROLLO DE *Erythrina americana*.

En el estudio realizado por A. Sotelo y colaboradores en el 2003, observaron que es la germinación, la cantidad de alcaloides es similar al obtenido en semilla seca, la explicación podría deberse al estado de latencia que guarda la semilla durante esta etapa de desarrollo. (32)

También encontraron que los factores antinutricionales como: inhibidores de tripsina y taninos disminuyen en la germinación, el valor encontrado en los inhibidores de tripsina fue importante en relación a otros reportes. (32)

Estudios anteriores muestran que la semilla de la *Erythrina americana* presenta un alto contenido de proteína y grasa (macronutrientes de gran importancia en la alimentación), además, contiene algunos factores antinutricionales y tóxicos que limitan su utilización, pero es posible su destoxificación parcial o total mediante procesos físicos y químicos como la cocción. (33)

Los tóxicos de mayor importancia contenidos en la *Erythrina americana* son los alcaloides, los cuales están distribuidos en distintas regiones de la planta.

En la *E. americana*, las flores y las semillas son ricas en alcaloides y éstas son posibles sitios de acumulación; se ha observado que el proceso de desarrollo y maduración afecta la síntesis de alcaloides en la planta. En el estudio realizado por A. Sotelo y col, en 1993, se cuantificaron algunos factores antinutricionales y tóxicos en la harina de la semilla madura de la *E. americana* (34), se reportó la presencia de inhibidores de tripsina, lectinas y alcaloides; mientras que la harina destoxificada de esta semilla solo presentó inhibidores de tripsina. Además, mediante cromatografía de gases fueron identificados los alcaloides: erisovina, erisodina, eritravina, α y β -eritroidina, siendo éste último el más abundante.

En 1996, un estudio realizado por R. García-Mateos y colaboradores⁽³⁵⁾ determinaron la acumulación de los alcaloides en todos los estadios de desarrollo de las semillas de la *E. americana*. Se detectó que el mayor contenido de éstos se encuentra en las semillas maduras; así como, el contenido de proteína y de alcaloides se incrementa simultáneamente durante la maduración del fruto y tienen una relación inversa con el contenido de nitrógeno no-proteínico.

Posteriormente en 1997, R. García-Mateos y colaboradores en un estudio realizado a los alcaloides de seis especies de *Erythrina* endémicas de México⁽³⁶⁾ concluyeron que *E. americana* contiene la mayor concentración de alcaloides en relación a las demás especies analizadas; además, los alcaloides identificados se distribuyen principalmente en las semillas maduras secas y en segundo lugar las flores de *E. americana*.

En 1998, A. Sotelo y B. Lucas⁽³⁴⁾ observaron que en las vainas inmaduras (ejotes) de la *E. americana* se detectaron inhibidores de tripsina y lectinas, mientras que el contenido de alcaloides es bajo, en comparación con otros estadios de la vaina. Por lo que la concentración de alcaloides se incrementa con el tiempo de maduración alcanzando su máximo cuando la semilla está madura.

1.4 TRIPTOFANO

El triptofano, es un aminoácido aromático, heterocíclico, definiéndose como un compuesto orgánico, que posee grupos amino, carboxilo y un anillo de naturaleza indólica. Tiene un peso molecular de 205 g/mol.

Es el único aminoácido que tiene un anillo indólico, usualmente incluido con los compuestos aromáticos. Las proteínas contienen triptofano y estas reaccionan con diversos reactivos debido a su naturaleza indólica, por lo que casi todos los métodos químicos existentes determinan grupos indólicos y no el L-triptofano, que es el aminoácido que requiere nuestro organismo⁽³⁴⁾.

El grupo indol se presenta en la naturaleza en una amplia variedad de estructuras como son los alcaloides y muchos de estos compuestos naturales tienen actividad fisiológica importante (37)

Son conocidos muchos productos naturales que tienen anillos indólicos con estructura química semejante a triptofano, el cual forma parte de las proteínas, es indispensable debido a lo cual no es sintetizado de forma natural por el hombre. La mayor parte de los derivados indólicos, son de origen vegetal y forman parte del variado grupo de los productos derivados de las plantas que contienen nitrógeno, los cuales reciben el nombre de alcaloides.(38)

El triptofano es importante como aminoácido indispensable y como precursor de diversos compuestos que intervienen en el metabolismo celular (niacina y serotonina), principalmente. La niacina es una vitamina que puede formarse por una reacción secundaria de triptofano en el hígado. La serotonina es un vasoconstrictor potente y estimulante de la contracción del músculo liso. También es un neurotransmisor que ejerce un efecto significativo en el metabolismo cerebral.(39).

Distribución de triptofano

El triptofano es un aminoácido ampliamente distribuido en la naturaleza, es indispensable para el hombre y muchos organismos vivos, y es el constituyente de muchas proteínas. La unidad indólica se presenta en la naturaleza en una amplia variedad de estructuras como son los alcaloides y muchos de estos compuestos naturales tienen actividad fisiológica importante (36).

Se conocen muchos productos naturales que contienen anillos indólicos como parte importante de su estructura, un ejemplo es el L-triptofano, que se encuentra en muchas proteínas, es un aminoácido indispensable debido a que no es sintetizado por mamíferos y debe ser proporcionado en la dieta. Basados en las necesidades proteínicas, el triptofano es necesario dentro de la dieta por lo que al ser limitante en leguminosas es necesario suministrarlo en otros alimentos, según la FAO, el valor requerido es de 0.5 g / 16g de N, en adultos. (40, 41)

Importancia en la determinación de triptofano en alimentos.

Hoy en día se sabe que las personas que reciben una dieta insuficiente en triptofano y niacina, presentan un cuadro clínico conocido como pelagra (donde el triptofano es precursor de la vitamina niacina en la síntesis del aminoácido), la cual es aún un síndrome estacional frecuente en países al norte de África y Europa, de ahí su importancia en la determinación, en diversos tipos de alimentos, los cuales aportan cantidades adecuadas para evitar esta enfermedad, que presenta diversos síntomas como: estomacales, atrofia en lengua, diarrea y alteraciones neurales. (42, 43)

1.5 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC):^(44, 45)

La cromatografía de líquidos consiste en la migración diferencial de los componentes de una mezcla, en base a sus diferentes velocidades de migración, a través de una fase estacionaria, cuando son arrastrados por una fase móvil. Fase estacionaria puede ser: sólida o líquida, y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa.

Cualquier método cromatográfico incluye cuatro pasos.

- "Unión" de la o las sustancias a la fase estacionaria.
- Separación de las sustancias entre sí.
- Recuperación de las sustancias por su elusión progresiva.
- Análisis cuantitativo y/o cualitativa de las sustancias separadas.

La cromatografía es un método de separación de mezclas químicas (principalmente orgánicas) en sus componentes individuales. Esta es una técnica de separación, no es una técnica de identificación. En contraste la espectrofotometría puede identificar la presencia de moléculas específicas en la mezcla, sin embargo esta habilidad de proveer información cuantitativa exacta es limitada cuando la muestra esta formada por componentes de estructura química similar, pues esta técnica no puede separar los componentes. Por esta razón la cromatografía de líquidos se encuentra frecuentemente asociada con la espectrofotometría.

La muestra que va a ser analizada es disuelta en un solvente adecuado idealmente este solvente es idéntico a la fase móvil e introducida, por medio de una inyección, con destino a la cabeza de la columna. La muestra es transportada a través de la columna por un flujo continuo de la fase móvil proveniente de la bomba.

Algunos compuestos de la muestra pasan a través de la columna más lentamente que otros. Aquéllos compuestos que son mejor retenidos en la columna son de este modo separados, por el tiempo en que eluyen al final de la columna. Un detector monitorea los componentes cuando emergen del final de la columna. El detector emite señales a un registrador, que traza el cromatograma en una carta el cual provee de la información cualitativa y cuantitativa de la muestra. La separación ocurre en una columna limitada estrechamente empacada con pequeñas partículas sólidas (ejemplo: sílica-gel), citada como material de empaque. La retención es generalmente condicionada por el tipo de material de empaque.

El gran potencial de la cromatografía de líquidos es comparado con el de la cromatografía de gases, por dos factores primarios: a) el primero es que una gran variedad de moléculas pueden ser disueltas en un solvente que no necesariamente debe ser volatilizar y retener la estructura molecular original. La cromatografía de líquidos, es una técnica más delicada que la cromatografía de gases ya que hay menos posibilidades de alterar las moléculas de la muestra. B) el segundo es que la cromatografía de líquidos cuenta con la habilidad de contar con una vasta variedad de moléculas ionizadas y no ionizadas, con pesos moleculares extremadamente altos y actividades biológicas (enzimas, péptido, etc.), que pueden ser determinadas por esta técnica.

En la tabla No.1, se muestran diferentes formas de separación en la cromatografía de líquidos. En suma, la cromatografía de líquidos es una innovación para la química analítica, orgánica y biológica. El campo de la química orgánica es extremadamente extenso así como su uso en investigación biomédica. En la tabla No.2, se enlista algunas áreas de aplicación donde la cromatografía de líquidos es una técnica analítica vital y es de mucha utilidad.

Tabla No.1. Formas de separación utilizadas en la cromatografía de líquidos.

Formas de separación	Mecanismo
1. Separación por tamaño. Cromatografía de Exclusión estérica.	Las moléculas son separadas por peso molecular, con la elusión de las de mayor tamaño primero (permeación en gel).
2. Adsorción	Separación de moléculas basadas en la polaridad, con las menos polares, eluyendo primero.
3. Fase reversa	Separación de moléculas basadas en una combinación de parámetros de solubilidad, coeficiente de partición y polaridad con el componente más soluble en agua. (El más polar), eluyendo primero.
4. Ión-Par	Iones contrarios (moléculas con carga opuesta a la de los iones de interés). Se adicionan a la fase móvil para formar un par neutro con la muestra iónica, la partición entre un columna de fase reversa y el eluyente sigue en cambio la fase reversa.

Tabla No. 2. Áreas de aplicación de la Cromatografía de Líquidos.

<ul style="list-style-type: none">* Farmacéutica, investigación y control de calidad.* Clínica: monitoreo de formación, caracterización de enfermedades.* Forense* Pesticidas* Investigación bioquímica.* Alimentos y bebidas* Polímeros y plásticos
--

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), es una rama de la química analítica de desarrollo más reciente crecimiento, potencialmente extensa.

Cromatografía en fase normal

La cromatografía en fase normal, se basa en la cromatografía de adsorción, siendo esta la forma más antigua de la cromatografía de líquidos. La lectura depende de las interacciones específicas del soluto con la superficie de un adsorbente finamente dividido. El adsorbente puede ser:

- Silica-gel (SiO_2)X
- Albúmina (Al_2O_3)X
- Carbón (poco utilizado)

Generalmente, se entiende que la fase móvil, y las moléculas del soluto están en competencia por los sitios activos del adsorbente, la interacción adsorbente-soluto, es el parámetro molecular importante que gobierna la separación.

Cromatografía en fase normal ligada

Esta técnica similar a la cromatografía en fase normal, es la que utiliza sílica como adsorbente, en este caso se utilizan silanos que se encuentran químicamente ligados a la fase estacionaria polar. El mecanismo básico, de este tipo de cromatografía está basado en las partículas del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Las técnicas de extracción son muy similares a las de cromatografía en fase normal.

Las columnas utilizadas en la cromatografía en fase normal ligada son:

- Alquilamina: separación de monosacáridos
- Alquilonitrilo: Detección de catecolaminas

Cromatografía en fase reversa

Se define a la cromatografía en fase reversa, como una técnica de cromatografía de partición:

- Partición del soluto entre dos solventes inmiscibles, uno que es fijo (fase estacionaria) y el otro es la fase móvil.

- El material de empaque, fase-ligada donde la fase estacionaria esta químicamente ligada al soporte.
- El material de empaque de la fase normal ligada es más polar que la fase móvil, mientras tanto el empaque de la fase reversa ligada es menos polar que la fase móvil.

El material de empaque de la columna de la cromatografía en fase reversa, esta basado en la utilización de la sílica.

- Las propiedades químicas del grupo sílica gel (-Si-O-Si-), y silanol (-Si-OH-) pueden ser importantes para una ligadura covalente de especies orgánicas con la superficies de la sílica.
- Diferentes tipos de silanos son usados en sílica ligadura: el monoclorosilano y el di-orto-trifuncional silano.

Características generales de la cromatografía de líquidos en fase reversa:

- Puede ser utilizado para muestras con un extenso rango de polaridades y pesos moleculares
- La rapidez general de equilibrio de la columna con la fase móvil, durante los métodos desarrollados.
- Es aplicable en la separación de compuestos iónicos por manipulación y equilibrio iónico secundario semejante al control de ionización ión-par en la fase móvil.
- La disponibilidad de especial selectividad para cada estructura o forma estérica por aditivos específicos de la fase móvil.

Selección de solventes por HPLC en fase reversa.

La forma más simple de fase móvil, que emplea la cromatografía de líquidos en fase reversa, consiste en agua y un solvente orgánico. Los solventes orgánicos más comunes son metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano y otros.

Diferentes solventes orgánicos pueden ser usados para regenerar grupos funcionales específicos. La forma más simple de control de equilibrio químico es amortiguar el pH de la fase móvil. Los factores que deben ser considerados para seleccionar un solvente regulador:

- Debe ser suficientemente puro para evitar contaminación de la columna y minimizar el ruido de impurezas.
- Debe ser muy soluble en la fase móvil
- La compatibilidad de la solución con el sistema de detección empleado es esencial.

Selección de la columna por HPLC en fase reversa: Esta selección de la columna se realiza obteniendo un alquil apropiado y este se hace combinando la longitud de la cadena C₁₈, C₈, C₆, o C₂. La diferencia de selectividad de grupos alquilos de diferente longitud no está entendida completamente, ya que la relación entre el contenido de carbón, la longitud de cadena carbonada y las propiedades del soluto no son simples.

Con un empaque C₁₈, la retención del soluto y la selectividad son grandes. Este empaque es el más utilizado para la cromatografía ión-par, porque la matriz fundamental del silica gel está mejor protegida para el ataque de la fase móvil conteniendo aditivos químicos, las separaciones con columnas C₈ y otros, son más rápidas, aptas para un factor de transferencia de masa del soluto. Para la separación de moléculas polares por la técnica de fase reversa, han sido sugeridas fases ligadas a cadenas cortas, ya que se obtienen picos más simétricos comparándolas con los obtenidos con fases ligadas a cadenas más largas.

Detector para HPLC

El propósito de un detector para HPLC, es el monitorear la cromatografía de líquidos, eluido por la columna cromatográfica y como varía la composición del eluyente, como transcurre el tiempo. Estos datos pueden ser presentados en la carta de un registrador, pueden ser analizados por un integrador. En el detector, la respuesta producida es directamente proporcional a la masa o concentración de los compuestos que pasan a través de él.

Los detectores pueden ser clasificados en dos tipos: detector de tamaño o volumen que funcionan por medio de una propiedad física del eluyente de la columna. El segundo son aquellos basados en las propiedades de los solutos cuya función de medición es una propiedad química y/o física, que es característica solamente del soluto.

A continuación se describen tipos de detectores más utilizados en HPLC:

* **Detector de Absorción ultravioleta:** El detector de absorción ultravioleta es el más utilizado en HPLC, ya que responde a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. El rayo de luz es transmitido hacia la onda de flujo del detector, cuando los solutos pasan a través de la celda, disueltos en la fase móvil, la luz es absorbida y de este modo la intensidad de la luz baja en la fotocelda, esta reducción produce un cambio en la salida eléctrica, que puede ser analizada y transmitida al registrador o sistema de datos.

* **Detección de fluorescencia:** La detección fluorescente provee una técnica muy eficaz para el análisis de trazas, ya que la mayor ventaja de la fluorescencia es la selectividad y sensibilidad. La fluorescencia se presenta cuando una molécula absorbe energía, pasando a un estado más alto de excitación.

Bombas

A la fase móvil en HPLC, se le da propulsión a través de la columna con bombas que pueden ser de dos tipos, las de presión constante y la de desplazamiento constante.

Inyectores

La muestra puede ser introducida en la cabeza de la columna sin afectar el empaque. Hay dos tipos de inyección: Flujo suspendido y solvente fluido.

Ventajas de utilizar equipo HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución, puede ser considerada complementaria a la cromatografía de gases. En muchos casos las dos técnicas se usan para afectar la misma separación.

En la cromatografía de gases es necesario la formación de derivados, en cambio en la cromatografía de líquidos estos no es factible, para los materiales que son termolábiles o no volátiles la selección de la cromatografía es importante. Ventajas en utilizar equipo de HPLC:

- Rapidez
- Resolución
- Sensibilidad, detección única
- Columnas reusables
- Ideal para grandes moléculas y especies no iónicas
- Fácil recuperación de la muestra

1.5.1 DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO POR HPLC

Muchos métodos han sido propuestos para la determinación de triptofano en proteínas puras o en materiales biológicos más complejos. La cuantificación de este aminoácido tiene importancia desde el punto de vista nutricional, ya que es uno de los aminoácidos indispensable para ciertos animales incluyendo al hombre. Ya anteriormente se había hecho la observación de que algunas proteínas al ser tratadas en experimentos de métodos colorimétricos producían poco o nada de indol, por lo que este derivado era asociado a un factor nutricional que hacía inadecuadas a ciertas proteínas por su carencia. (46, 47)

La multitud de métodos propuestos para la estimación del triptofano muestra la importancia de dicha determinación; sin embargo la inconsistencia de los valores obtenidos evidencia la nulidad de muchos de ellos. Uno de los principales métodos para la cuantificación del triptofano lo constituye el método químico-colorimétrico, que aprovecha la capacidad que tiene el núcleo de indol y sus derivados para producir un compuesto colorido con algunos aldehídos aromáticos en medio ácido fuerte.

Las proteínas que contienen triptofano reaccionan con reactivos que identifican anillos indólicos en las muestras estudiadas, por lo que casi todos los métodos químicos existentes determinan el grupo indólico y no el triptofano del aminoácido que requiere el organismo.

Este aminoácido es particularmente inestable y es fácilmente destruido por ácidos, aunque es más estable bajo condiciones alcalinas. En ácido caliente, su estabilidad puede ser reducida por la presencia de otros aminoácidos y puede también afectar su recuperación. El triptofano no puede ser determinado exactamente en hidrolizados completos de proteína y requiere métodos especiales de análisis.

La degradación oxidativa de triptofano durante la hidrólisis ácida en proteínas, excluye a su vez el análisis y determinación de otros aminoácidos esenciales en determinaciones cromatográficas. El inconveniente de llevar a cabo la separación analítica en la determinación de triptofano, frecuentemente omite el registro total de aminoácidos presentes en la muestra. Particularmente la determinación de este aminoácido es esencial, porque después de lisina, metionina y cistina, triptofano es el aminoácido que frecuentemente se encuentra limitado en alimentos. (48)

Han sido numerosos los esfuerzos por encontrar un método apropiado en los análisis de triptofano. Algunos investigadores han propuesto reacciones en hidrolizados de la muestra, y en la proteína intacta, ambos procedimientos llevan a cabo una segunda derivatización espectroscópica con p-dimetilbenzaldehído (DMAB), p-fenileldiamina y ninhidrina en medio fuerte ácido.

El análisis espectroscópico directo en la proteína es rápido y no requiere llevar a cabo una hidrólisis previa, no obstante esta determinación esta sujeta a errores, debido a la interferencia de compuestos presentes que son detectados, y los datos obtenidos pueden ser solo considerados como aproximaciones. Los métodos colorimétricos suelen ser tediosos, requieren un largo periodo de hidrólisis y frecuentemente la muestra sufre problemas como estabilidad en color y la presencia de interferencias. (49)

Los métodos para la determinación de triptofano, consisten en llevar a cabo una hidrólisis, en condiciones especiales, utilizando reactivos como: ácido clorhídrico más aditivos o ácido tioglicólico; ácido sulfónico-mercaptoetanol; mercaptoetanol; fenol o triptamina; ácidos orgánicos como ácido mercaptoetanolsulfónico; enzimas y bases. La mayoría de estos procedimientos siguen los siguientes pasos básicos: a) hidrólisis alcalina de la muestra a 110-125°C, privadas de la presencia de oxígeno, utilizando nitrógeno de altísima pureza, de 16-20 horas; b) dilución del hidrolizado, neutralizado con HCl, con buffer cromatográfico; c) clarificación del hidrolizado; d) separación cromatográfica por HPLC; e) detección espectrofotométrica o fluorométrica.^(49, 50)

Yust y Pedroche en 2004, realizaron modificaciones al procedimiento básico, este consiste en utilizar NaOH, el cual reduce el tiempo de hidrólisis, y simplifica en gran medida el tiempo de análisis. El resultado de este método permite una rápida detección de triptofano por hidrólisis alcalina, desarrollada por HPLC en fase reversa. El método propuesto por los investigadores informan que llevando a cabo este análisis la destrucción de aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina no es total, antes de la hidrólisis es notoria la presencia de tres aminoácidos aromáticos: tirosina, fenilalanina y triptofano, después de la hidrólisis la detección espectroscópica a 280nm, detecta destrucción parcial de tirosina y fenilalanina, no así de triptofano, que es el aminoácido de interés.⁽⁴⁸⁾

METODOLOGÍA

Diagrama de trabajo experimental

Recolección y acondicionamiento de la muestra

Germinación

Cáscaras

Germinados

Liofilización y molienda

Análisis Proximal

Determinación
de triptofano
por HPLC

Determinación
de factores
antinutricionales

Determinación de alcaloides

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La semilla seca fue recolectada en un árbol clasificado como *E. americana*, situado en Ciudad Universitaria, y en colonias aledañas a ella, en Julio del 2003.

2.2 LIMPIEZA Y SELECCIÓN

Las semillas fueron separadas de cualquier materia extraña como piedras, basura, después fueron lavadas con una solución al 10% de cloro comercial, enjuagadas y secadas con una franela. Una fracción del total fue destinada a la germinación.

2.3 TRATAMIENTO PARA LA 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. Se colectaron germinados a los 3, 6, 9 y 12 días, una vez desprendida la cascarilla de la semilla.
4. El crecimiento se llevo a cabo a temperatura ambiente y diariamente se observó que no haya contaminación por hongos.
5. Cuando el tamaño de la acróspira alcanza aproximadamente 4cm y aun no hay hojas, lo cual sucede de los 10 a 12 días, donde se termina el periodo de germinación y los germinados son retirados del recipiente.
6. Se registró cuantas semillas germinaron del total.

2.4 LIOFILIZACIÓN

Las muestras se cortaron en fragmentos pequeños con ayuda de unas tijeras y se congelan, para proceder a la liofilización.

2.5 MOLIENDA

Una vez liofilizadas las muestras se llevan al molino utilizando una malla de 0.5mm, 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 posteriores.

2.6 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Para su realización se siguieron las técnicas descritas en el AOAC (1990) ⁽⁵¹⁾. Se efectuaron análisis de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda, proteína y por diferencia los carbohidratos.

2.7 DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)⁽⁺⁸⁾

Fundamento

La cuantificación de triptofano por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC de fase reversa (partición de un soluto entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar), con detección espectrofotométrica de triptofano a 280nm, previa hidrólisis del material proteínico con NaOH ó LiOH 4N, a 100°C por 4 horas.

Material y Equipo

- Balanza analítica
- Digestor marca TECATOR mod. AB
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta interior de teflón
- Potenciómetro marca CORNING, mod. 10
- Vórtex marca Lab-line, mod. Mistral
- Embudo de filtración rápida
- Agitador magnético
- Matraz Buchner
- Embudo Kistato
- Sistema HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución)
- Termómetro

Análisis cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (Waters mod. 510)
- Inyector con loop de 20µl (Rheodyne)
- Jeringa para HPLC (25µl Hamilton)
- Detector UV-Vis Waters 486 (Waters)
- Columna: MILLENNIUM 32 program A 300 X 3.5 mm I.D. Nova-Pack C₁₈ 4µm (Waters).

- Flujo 1 ml / min.

Reactivos

- A) Solución estándar de triptofano (0.51 mg/ ml). Se pesan 12.75mg de triptofano (sigma No. T-0256) y aforar a 25ml con buffer de boratos pH 9.
- B) Buffer de borato de sodio 0.06 N (pH 9). Se pesan 6g de borato de sodio, se disuelven en 70ml con agua desionizada caliente, se ajusta el pH a 9.0, y se afora a 100 ml.
- C) Ácido clorhídrico 12 N
- D) Hidróxido de Litio 4 N
- E) Acetonitrilo grado HPLC
- F) Agua desionizada
- G) Buffer de acetato de sodio 25 mM pH 6.00. Se pesan 3.402 g de acetato de sodio $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ PM 136.08 MERK, se ajusta a pH 6, posteriormente se agrega 0.2 g de azida de sodio para su conservación, se afora a 1 L con agua desionizada, esta debe estar previamente filtrada a través de una membrana 0.45 micras, en un equipo Millipore con ayuda de vacío. Esta solución amortiguadora se filtra dos veces en un equipo Millipore, con ayuda de una membrana 0.45 micras con vacío.

Elaboración de una curva estándar.

Hacer una curva estándar, a partir de la solución estándar de triptofano 0.51 mg/mL LiOH 4N. Medir 10, 20, 30, 40 y 50 μl , de la solución estándar de triptofano, llevar a un volumen de 10ml con buffer de boratos 0.06N (pH 9). Cada punto de la curva se inyecta por triplicado.

Hidrólisis

Se pesan 0.20 g de muestra finamente molida (malla 0.5mm) y desengrasada, dentro de un tubo de hidrólisis, a continuación se adiciona 6ml de LiOH, procurando que toda la muestra quede humedecida con el álcali, antes de iniciar la hidrólisis, los tubos se insuflan con nitrógeno de altísima pureza. Posteriormente se lleva a cabo la hidrólisis durante 4 horas manteniendo la temperatura a 100°C.

Una vez finalizada la hidrólisis, los hidrolizados son neutralizados con HCl 12 N, hasta pH 7.0, llevando este volumen a 25ml con buffer de borato de sodio 0.06 N. Finalmente se filtra el hidrolizado en un filtro Millipore de 0.45 μm , un volumen suficiente para iniciar la corrida cromatográfica.

Cromatografía

Se inyectan 20 μl de muestra, dentro de una columna, la cual se mantiene a una temperatura de 18°C durante el análisis.

Se utiliza un sistema isocrático con una fase móvil de buffer de acetato de sodio 25mM y acetonitrilo en proporción 97:3 a un flujo de 1ml/min. El triptofano se detecta a 280nm, por medio del detector UV del equipo.

Cálculos.

El valor del área de triptofano de las muestras se extrapola en la curva estándar, la cual deberá estar dentro de un rango de valores adecuado, y de esta forma se conoce los μg de triptofano. Los cálculos son de la siguiente forma:

$\mu\text{g trp}/100 \text{ g de muestra desengrasada} = (\mu\text{g Trp}/1\text{ml}) (\text{Vol}_{\text{HID.}}) (100\text{g/g muestra seca y desengrasada})$

Dónde:

Vol_{HID} = volumen del hidrolizado

Posteriormente corregir el valor, considerando el contenido de proteína y grasa, de esta forma se reporta el valor en triptofano $\mu\text{g}/100\text{g}$ de Proteína:

$\text{Trp } \mu\text{g}/100\text{g de Proteína} = (\text{Trp } \mu\text{g}/100\text{g muestra seca}) * (\text{muestra seca } 100\text{g/ g de Proteína})$

2.8 DETERMINACIÓN DE FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS

2.8.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA ⁽⁵²⁾

Fundamento

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 múltiple con agitación marca THERMOLINE, mod. 4
- Espectrofotómetro marca SEQUOI-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 0.05M: 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 900mL 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 disuelve en 2.5mL de dimetil sulfóxido, se diluyen en 250 mL con amortiguador TRIS pH 8.2 previamente calentado a 37°C. Esta solución debe ser preparada el mismo día.

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

Procedimiento

- A) Preparación del extracto: se pesa 1 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado y se le adiciona 45mL de NaOH 0.01N, se ajusta el pH a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50ml. Se transvasa a un vaso que contenga un magneto para poner en agitación $2 \frac{1}{2}$ h a 300rpm. Transcurrido el tiempo, se quita el magneto y se deja en reposo 30 min. por decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto que 1ml produzca una inhibición de 40-60 %.
- B) Cuantificación de la actividad: la siguiente tabla No. 3 Muestra en forma esquemática la serie de tubos que se deben preparar para poder medir la actividad inhibitoria de la muestra. Porciones de 0.0, 0.6, 1, 1.4, y 1.8mL del extracto directo o diluido se pipetea a tubos de ensaye por duplicado y se ajusta el volumen a 2mL con agua destilada, se introducen a baño maría (a 37° C). Se adicionan 2mL 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 enzimático se detiene agregando 1 mL de ác. Acético y homogeneizarse inmediatamente.

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

Tabla No. 3 Adición de reactivos (mL)

Tubo	Extracto	Agua	Tripsina	BAPNA	Ácido 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
B5	0.0	2.0	2 + 1 Ac	5.0	----
5	0.0	2.0	2.0	5.0	1.0

Dónde:

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 410nm y es necesario para cada una de las alícuotas ajustar el aparato a 100% de transmitancia con su respectivo blanco.

Cálculos:

La lectura en Absorbancia (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 gráfica 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 1mg de muestra, de la siguiente forma:

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

Donde:

B = valor extrapolado o promedio en UTI / mg

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

Cuando se emplea el extracto directo F = 1

2.8.2 DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LECTINAS ⁽³⁹⁾

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 Internacional Clinical Centrifuge, mod. A3076X-2
- Tubos de centrifuga de 15ml con graduación
- Incubadora marca BLEU-M
- Espectrofotómetro marca SEQUOI-TURNER, mod. 340
- Adaptador para celdas de 10X75mm (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

- 3 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 300rpm a temperatura ambiente.
- 4 Transcurrido el tiempo se centrifuga a 1400rpm 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 Hámster, se lleva a un matraz con anticoagulante (heparina) y agita suavemente, se transvasa 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 1500rpm por 10 min., en cada ocasión. En el último lavado medir en el tubo de centrifuga el paquete de eritrocitos.
3. Diluir al 4% (24ml 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 1ml de solución de tripsina al 0.2% e incubar 1h a 37°C.
2. Centrifugar e eliminar el sobrenadante dando 3 lavados con solución salina al 0.9%.
3. Resuspender en sol. salina (24ml 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 $25 \pm 1\%$ 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 en 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.

2.8.3 TANINOS ⁽⁵⁴⁾

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 520nm.

Material y equipo

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

Reactivos

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

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

C) Citrato férrico de amonio. Pesar 0.35 g de citrato férrico de amonio * (ALDRICH 22,896) y aforar a 100mL 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 0.8928g/L) y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Procedimiento

Método de extracción de taninos

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

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

B) Posteriormente se deja reposar 15min, se transfiere cuantitativamente el sobrenadante para centrifugar 10 min. a 3000rpm, enjuagando el vaso con 2ml 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)	Solución citrato férrico amoniacal (0.35g/100mL) (mL)	Solución de hidróxido de amonio (0.232g/100ml) (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 525nm y ajustar contra un blanco de agua.

E) Después de 10 ± 1 min medir las absorbancias de las muestras.

F) Elaborar una curva patrón y extrapolar el valor obtenido del problema en la curva patrón.

Curva Patrón

A) Utilizar 8 matraces volumétricos de 25mL y con micropipeta añadir 1,2,3,4,5,6,7ml de solución de ácido tánico (2 mg/mL) respectivamente a cada matraz.

B) Aforar a 25ml cada uno con dimetilformamida al 75 %

C) De cada uno de los matraces tomar 1ml de solución y colocarlos en un tubo de ensaye

D) Añadir 5ml de agua y 1ml 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 ± 1 min leer las absorbancias a un longitud de onda de 525nm. Trazar un 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

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

Dónde:

AT = ácido tánico

- Interpolación de la absorbancia.
- 10^6 = factor para transformar μg a g de Acido tánico.

2.8.4 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES POR TITULACIÓN (33)

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.

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 Etilico RA
- I) Cloroformo RA

Procedimiento

- Triturar la muestra y tamizarla (pasando por una malla de 0.5mm)
- Pesar 5 gramos de muestra, adicionar 50mL 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 50ml 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 20ml de metanol alcalinizado.
- Evaporar el disolvente en un rota vapor (50°C) casi a sequedad para proseguir con la purificación.
- Disolver el extracto en 15mL de éter y 5mL de H_2SO_4 1 N
- 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 5mL de ácido cada vez. Reunir las fases acuosas con la anterior y verter en un embudo de separación.
- Adicionar 25mL de cloroformo, agitar y recuperar la fase acuosa (superior)
- Extraer la fase orgánica tres veces más adicionando 5mL de H_2O y 5mL de H_2SO_4 - Reunir las fases acuosas con la anterior.
- Extraer 2 veces con 10mL de cloroformo. Recuperar la fase acuosa (superior)
- Filtrar a través de papel Whatman N. 2, enjuagando el papel con 2mL de agua.
- Alcalinizar la fase recuperada con NH_4OH concentrado hasta un pH de 9 o mayor.
- Extraer 3 veces con 35mL 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 rota vapor.
- Redisolver el residuo en 3mL de etanol (redisolver de mL en mL), transvasando cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer que contiene 7mL de agua destilada y una gota de indicador de rojo de metilo.
- Titular con H_2SO_4 0.02 N
- Utilizar un blanco con 3ml de metanol y 7mL de agua.

Cálculos

Se cuantifican como:

$$g = (\text{mL } H_2SO_4 \text{ gastados por la muestra} - \text{mL } H_2SO_4 \text{ blanco}) \times N_{H_2SO_4} \times 0.273 \times 100 / (\text{g de muestra})$$

Dónde:

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

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

N = la normalidad del H_2SO_4

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 GERMINACION

En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos del proceso de germinación en *Erythrina americana*. La germinación se llevo a cabo en un lapso de 12 días de los cuales en los días 3, 6, 9 y 12 se recolectaron los germinados. Además se muestran los porcentajes de germinación en cada día seleccionado (se considero un promedio de todos los lotes) al término de esta es decir, el número total de semillas que germinó. La eficacia de la germinación es muy elevada. El incremento en peso del germinado no excede el doble del peso de la semilla, esto es debido a que durante la germinación se inicio dicho incremento con la absorción de agua, generando una ruptura externa de la cáscara, por lo que su capacidad de absorción es adecuada, si no llegó a serlo la semilla entro en estado de dormancia, el cuál es un proceso que hidrata los componentes de la semilla, pero no llega a germinar adecuadamente, y esta termina por descomponerse y contaminarse con hongos.

Tabla 3.1 Datos del proceso de germinación de *E. americana*.

Días de control de los germinados	Semilla seca Peso (g)	Número de semillas secas	% germinación	Peso húmedo (Germinado) (g)	Peso húmedo (Cáscaras) (g)
3	23.32	67	97	57.2	17.58
6	16.70	48	89	68.5	19.44
9	43.85	126	95	101.6	20.98
12	34.80	100	98	203.6	98.70

3.2 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

En la tabla 3.2.a se muestran los resultados obtenidos de la composición proximal en base húmeda de las muestras analizadas, donde se observa un importante aumento en el contenido de humedad de los germinados del inicio al final de la germinación.

El contenido de proteína, grasa, fibra, cenizas de los germinados es menor que el de la semilla cuando se expresan en base húmeda, esto es debido al incremento en el contenido de agua que se da durante la germinación.

Tabla 3.2.a. Análisis proximal en base húmeda de las muestras de semilla seca y germinados de *E. americana*. (g / 100g de muestra)

Muestra	Humedad	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	CHO'S
Semilla seca	5.52	25.61±0.59 ^A	10.78±0.55 ^A	17.01±0.08 ^A	5.06±0.08 ^A	36.02
Germinado (Día 3)	69.83	14.03±0.33 ^B	6.32±0.20 ^B	0.52±0.01 ^B	0.33±0.01 ^B	8.97
Germinado (Día 6)	75.74	11.081±0.12 ^C	5.03±0.02 ^C	0.46±0.01 ^C	0.26±0.03 ^C	7.43
Germinado (Día 9)	79.06	8.98±0.05 ^D	3.04±0.11 ^D	0.40±0.03 ^D	0.11±0.01 ^D	8.41
Germinado (Día12)	85.31	6.12±0.10 ^E	1.83±0.02 ^E	0.31±0.01 ^E	0.07±0.01 ^E	6.36

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

En la tabla 3.2.b se presentan los resultados obtenidos en base seca, llevado a cabo en las cinco muestras, semilla seca cruda, a los tres, seis, nueve y doce días de la germinación. Es en la fase de germinación, donde se aprecia un elevado contenido en proteína, superior al reportado en otras leguminosas. Cuando los resultados son expresados en base seca, el contenido de proteína de los germinados es mayor que el de la semilla.

Es necesario recordar que durante la germinación se desprende la cascarilla, lo que origina que se eleve bruscamente la concentración de proteína y grasa y disminuya la de fibra y cenizas en los tres primeros días de germinación. Además en la determinación de proteína por el método Kjeldahl mide el nitrógeno total de la muestra (proteínico y no proteínico), por lo que su incremento durante la germinación puede ser debido en parte al aumento de compuestos nitrogenados no proteínicos. Del tercer al doceavo día de la germinación se observa una disminución en el contenido de proteína, aunque esta tendencia no es significativa.

La proporción de grasa de la semilla seca es menor al de los germinados, porque se elimina la cáscara y la proporción aumenta, pero hay una disminución al final de la germinación probablemente porque se utiliza como fuente de energía para sintetizar nuevo tejido (radícula).

Durante la germinación la síntesis de fibra es muy pequeña en los germinados, ya que la mayor proporción se encuentra en la cáscara que se elimina. En cuanto a los minerales en el germinado sin cáscara su concentración disminuye significativamente durante el periodo estudiado.

Tabla 3.2.b. Análisis proximal en base seca de las muestras de semilla seca y germinado de *E. americana* (g/100g de muestra)

Muestra	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	CHO's
Semilla seca	27.10±0.40 ^C	11.40±0.65 ^E	18.00±0.15 ^A	5.36±0.02 ^A	38.14
Germinado(Día 3)	46.49±1.09 ^A	20.95±0.68 ^A	1.72±0.26 ^C	1.06±0.02 ^B	29.77
Germinado (Día 6)	45.67±0.51 ^B	20.89±0.21 ^B	1.89±0.03 ^B	1.07±0.03 ^B	30.48
Germinado (Día 9)	42.90±0.24 ^C	14.49±0.530 ^B	1.91±0.01 ^B	0.51±0.06 ^C	40.19
Germinado (Día 12)	41.66±0.69 ^D	12.47±0.140 ^D	2.10±0.05 ^B	0.50±0.00 ^C	43.27

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

3.3 DETERMINACIÓN DE TRIPTOFANO POR HPLC.

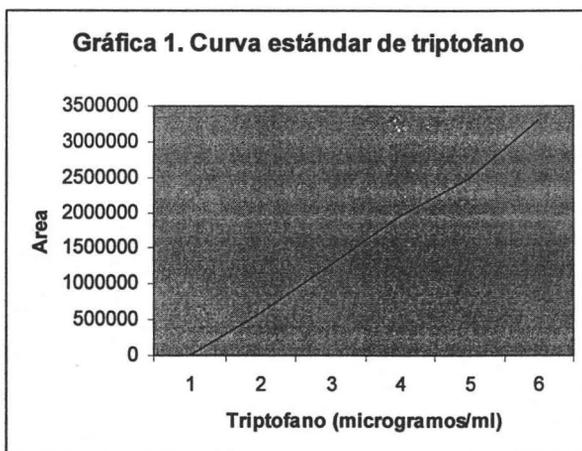
En la tabla 3.3.a, se muestran los datos obtenidos para la curva estándar utilizadas en la determinación de triptofano por HPLC, en las condiciones óptimas establecidas para su determinación.

Tabla 3.3.a. Curva estándar de triptofano

Triptofano µg/ml	Área m ²	Coefficiente de Variación %
10	595,128±29540.2	4.69
20	126,634±51651.6	4.08
30	194,836±21305.4	1.09
40	249,388±33287.8	1.33
50	329,608±14637.7	0.44

Los resultados anteriores son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. CV= coeficiente de variación expresado en %.

En la grafica 1. Se muestra la curva estándar de triptofano, utilizada para calcular la concentración de triptofano de las muestras.



Como se puede observar en la grafica anterior se tiene tendencia lineal de los datos en el rango de concentraciones utilizadas. La linealidad de la curva estándar es la adecuada para llevar a cabo los cálculos correspondientes.

$$r=0.9998 \quad b=66294.34 \quad m=-68869.52$$

En la figura 1. Se muestra el cromatograma del estándar de triptofano, el pico presentado corresponde al estandar, para el germinado al tercer día de la semilla de *Erythrina americana*.

Figura 1. Cromatograma del estándar (50mg/ml de triptofano) de *Erythrina americana*.

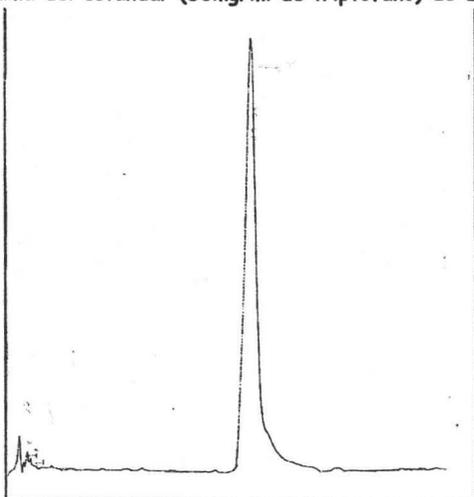


Figura 1. Elusión del estándar (50mg/ ml de triptofano), realizado por HPLC, con detección espectroscópica a 280nm. (pico

5)

En la figura 1, se muestra el cromatograma del estándar de triptofano, para conocer el tiempo al cual aparece el aminoácido.

En la tabla 3.3.b. Se muestran los resultados de la determinación de triptofano medidos por HPLC en la que se observa, que el contenido en triptofano en semilla es significativamente mayor que en los geminados, la tendencia es a aumentar su concentración, sin embargo el contenido de este aminoácido en semilla seca es significativamente mayor, en relación al periodo de germinación estudiado.

Tabla 3.3.b. Determinación de triptofano en *E. americana* por HPLC

Muestra	Triptofano mg/100g de Proteína
Semilla seca	663.1±0.98 ^A
Germinado (Día 3)	396.7±0.55 ^D
Germinado (Día 6)	408.6±3.02 ^D
Germinado (Día 9)	535.4±3.52 ^C
Germinado (Día 12)	601.0±6.33 ^B

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

Nutricionalmente el valor obtenido de *Erythrina americana* en triptofano, tanto en la semilla seca, como en los germinados medidos por HPLC, muestran un valor en este aminoácido indispensable similar al reportado en leguminosas.

Es importante recordar que estudios anteriores informan un valor elevado de triptofano en *Erythrina americana*, medido por el método colorimétrico, dichos valores pueden ser debidos a la presencia de metabolitos de origen indólico no identificados, el valor encontrado en HPLC, es significativamente menor ⁽²⁾.

3.4 FACTORES ANTINUTRICIONALES

En la tabla 3.4.a. se muestran los valores obtenidos de las determinaciones de factores antinutricionales y tóxicos de *E. americana* en base húmeda. Las concentraciones en los germinados frescos, presentan un contenido significativamente menor al de la semilla seca debido a su alto contenido en humedad, y no representan un riesgo a la salud.

Tabla 3.4.a. Factores antinutricionales y tóxicos de *E. americana* en base húmeda

Muestra	Inhibidores de tripsina ¹ UTI/ mg muestra seca	Taninos g/100 g de muestra	Lectinas ² (Título) ³
Semilla seca	70.13±0.56 ^A	0.12±0.01 ^A	5
Germinado (Día 3)	0.75±0.09 ^B	0.09±0.00 ^B	4
Germinado (Día 6)	0.54±0.07 ^C	0.02±0.00 ^C	4
Germinado (Día 9)	0.30±0.04 ^D	0.01±0.00 ^D	3
Germinado (Día 12)	0.32±0.03 ^D	0.01±0.00 ^D	3

Para la tabla 3.3.a los resultados son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. 1 = UTI: unidad de tripsina inhibida, 2 = se utilizaron eritrocitos de Hámster, 3 = Título máxima dilución en que se presenta aglutinación. Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativa con $\alpha = 0.05$.

Analizando los resultados de los factores antinutricionales y tóxicos de *E. americana* en base seca (tabla 3.4.b), se observa un contenido menor de estos durante la germinación en relación al de la semilla seca. Del inicio al final de la germinación los niveles disminuyen significativamente. También en este caso en base seca, los niveles encontrados no representan un riesgo para la salud.

Tabla 3.4.b. Factores antinutricionales y tóxicos de *E. americana* en base seca

Muestra	Inhibidores de tripsina ¹ UTI/mg muestra seca	Taninos g/100g de muestra	Lectinas ² (Título) ³
Semilla seca	74.32±4.67 ^A	0.84±0.01 ^A	5
Germinado (Día 3)	2.40±0.24 ^B	0.10±0.01 ^B	4
Germinado (Día 6)	2.21±0.18 ^B	0.02±0.00 ^C	4
Germinado (Día 9)	1.41±0.11 ^C	0.01±0.00 ^D	3
Germinado (Día 12)	1.09±0.21 ^D	0.01±0.00 ^D	3

Para la tabla 3.4.a y 3.4.b los resultados son el promedio ± Desviación estándar de tres determinaciones. 1 = UTI: unidad de tripsina inhibida, 2 = se utilizaron eritrocitos de Hámster, 3 = Título máxima dilución en que se presenta aglutinación. Letras diferentes (A,B,C,D) indican diferencia significativa con $\alpha = 0.05$

Los resultados encontrados en lectinas son concordantes con la información obtenida en la literatura, donde indican una disminución en el contenido de lectinas durante la germinación.¹¹

En la tabla 3.4.a y 3.4.b se muestran los valores promedio del contenido de inhibidores de tripsina, expresados en base húmeda. Se observa que el contenido de inhibidores de tripsina, expresados tanto en base húmeda como en base seca, disminuye con el proceso de germinación, dicha disminución es debida a la degradación enzimático de las proteínas, incluyendo a los inhibidores de tripsina, de las semillas durante la germinación. Esta reducción en los inhibidores de tripsina es útil para el mejoramiento de la calidad nutricia de las semillas respecto a la digestibilidad de las proteínas de la dieta.

Por lo que se puede observar en las tablas 3.4.a y 3.4.b la semilla seca de *E. americana*, contiene una gran cantidad de inhibidores de tripsina, siendo así un valor alto cuando se compara con la de soya (80 UTI), representando un riesgo a la salud como factor antinutricional. Puede observarse como la actividad inhibitoria declina notablemente durante la germinación estudiadas, probablemente se deba al rompimiento de los inhibidores por la actividad proteolítica, que se desarrolla por lo cambios bioquímicos, que van sucediendo durante el proceso de formación de plántula. ⁽¹⁵⁾

En cuanto a taninos es en esta fase donde se observa una disminución en el contenido de taninos, aunque comparado con semilla seca no es notable su contenido, el decremento en su contenido de 0.14 a 0.01g, no es alta, lo que en parte puede ser atribuido a la poca abundancia en su corteza (testa) de la semilla ya que al final de la germinación (día 12) se encuentra perfectamente separada y fue eliminada en la recolección.

No obstante estudios reportan la disminución en el contenido de taninos durante la germinación de diversas leguminosas, este decremento lo atribuyen a la presencia de la polifenoloxidasa, que como se mencionó, cataliza la hidroxilación de varios monofenoles y la oxidación aeróbica de difenoles. (23)

La eliminación de los taninos durante la germinación trae consigo un mejoramiento en la digestibilidad de los nutrientes y en la biodisponibilidad de los minerales y de algunas proteínas.

3.5 ALCALOIDES

La tabla 3.5 muestra los resultados de alcaloides encontrados en las muestras de semilla seca y los germinados. Se observó que durante la germinación se produce una reducción significativa de alcaloides, por lo que en la semilla la concentración es significativamente mayor en relación con

los germinados. **Tabla 3.5 Determinación de alcaloides en *E. americana***

Muestra	Alcaloide g/100g muestra húmeda	Alcaloide g/100 g de muestra seca
Semilla seca	1.16±0.06 ^A	1.39±0.07 ^A
Germinado (Día 3)	0.32±0.04 ^B	1.05±0.01 ^B
Germinado (Día 6)	0.24±0.07 ^C	1.00±0.01 ^B
Germinado (Día 9)	0.14±0.09 ^D	0.99±0.02 ^B
Germinado (Día 12)	0.15±0.08 ^D	0.68±0.04 ^C

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

Durante la germinación observamos un decremento importante, en el contenido de alcaloides en la semilla de *E. americana*, esto es importante debido a que los alcaloides encontrados en esta semilla, son abundantes como la β -eritroidina, Estos cambios pueden deberse a los cambios estructurales de los diversos componentes, que pudieran estar actuando en la formación de plántula y tallo. (12)

En relación al contenido de alcaloides en base húmeda con respecto al encontrado en base seca, es en esta última donde se observa una contracción mayor de alcaloides debido a que en base húmeda el contenido de humedad a lo largo de la germinación va en aumento. El contenido de alcaloides en base seca tiene una concentración elevada de alcaloides elevados de alcaloides los cuales no presentan diferencia significativa del día 3 al día 9 de germinación, no así al último día donde se observó un decremento notorio.

CONCLUSIONES

- La harina liofilizada de la semilla seca y los germinados de *Erythrina americana* muestra una tendencia a disminuir a lo largo de la germinación en proteína, grasa y cenizas.
- En los germinados sin cáscara la concentración de proteína en base seca es mayor que en la semilla seca. La disminución de proteína durante la germinación fue de 50-68%.
- La concentración de grasa y cenizas disminuyen del inicio al final del periodo germinativo.
- Los niveles de fibra se incrementaron poco durante la germinación (1%).
- El contenido de triptofano fue inferior al inicio de la germinación y fue aumentando, siendo mayor en el último día de germinación.
- Los miligramos de triptofano /100g de proteína, en semilla seca y germinados medidos por HPLC fueron menores a los medidos en trabajos previos por métodos colorimétricos.
- El contenido de inhibidores de tripsina es alto en la semilla seca, y disminuyen de manera importante durante la germinación. El contenido en taninos también disminuye notablemente.
- Mediante la germinación el contenido de alcaloides no muestra diferencia significativa, no así al último día de germinación (Día 12) donde disminuye.
- La germinación de la semilla de *Erythrina americana* es benéfica, ya que aumento el contenido en proteína y disminuyeron en los factores antinutricionales y tóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gueguen, J; Cerletti, P. 1994. Proteins of some Legume Seeds: Soybean, Pea, Fababean, and Lupin. In *New and Developing Sources of Food Proteins*; Hudson, B.J.F, Ed.; Chapman and Hall: London. Pp 145-183.
2. Sotelo A.; Argote R.M, ; Moreno R.I, ; Flores N. I, and Diaz M. 2003. Nutritive Evaluation of the Seed, Germinated Seed, and String Bean of *Erythrina Americana* and the Detoxification of the Material by boiling. *J. Sci. Food Agric.* 51. pp 2821-2825.
3. Ramírez R.G., 1996. Cambios en la composición química y contenido de tóxicos en el fruto de colorin (*Erythrina americana*) durante su maduración, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., pp 1-3, 5-10, 22-26.
4. Coenders. 1996. *Química Culinaria. Estudio de lo que les sucede a los alimentos antes, durante y después de cocinarlos.* Acribia, Zaragoza España, pp 93-95.
5. Charley H. 1998. *Tecnología de Alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la Preparación de Alimentos.* Ed. Limusa. D.F. México, pp. 623-633.
6. Bourges H. 1987. Las leguminosas en la alimentación humana (1er. Parte). *Cuad. Nutr.* 10. pp 17-32.
7. Linden G., Lorient D. 1994. *Bioquímica Agroindustrial. Revalorización alimentaria de la producción agrícola.* Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 99-106.
8. Coen A. 1992. Son muchos nombres y una sola legumbre verdadera. *Cuad. Nutr.* 15. pp 5-6.
9. Cheftel Jean-Claude. 1983. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos.* Vol. II. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 106- 110, 117-119.
10. Cavada B; Santod C; Grangerio T; Nunes E; Sales P; Ramos R; Sousa F; Crisotomo C; and Calvete J. 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. *Phytochemistry.* 49. pp 675- 680.

11. Savelkoul F; Van der Poel a. and Tamiming. 1992. The presence and inactivation of trypsin inhibitors tannins, lectins and amuyase inhibitors in legume seeds during germination. A review, *Plan Food Hum Nutr.* 42. pp 71-85.
12. García-Mateos R. 1996. Estudio químico-biológico de los alcaloides de *Eritrina americana*. Tesis de doctorado en Ciencias. Colegio de postgraduados. Instituto de México, pp. 13-50.
13. García M. R.; Soto H. M. ; Nelly D. 1997. Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico, *Bioch. System. Ecol.* 26, pp. 545-551.
14. Garín-Aguilar M; Ramírez J; Soto-Hernández M; Valencia del Toro G. and Martínez M. 2000. Effect of crude extracts of *Erythina americana* mill on agresive behavior in rats. *J. of Ethnopharm.* 69. pp 189-196.
15. Van Der Poel T and Blonk J. 1990. Termal inactivation of lectins and inhibitor activity during steam processing dry beans (*P. vulgaris*) and effects on protein quality, *J. Sci. Food Agric.* 43. pp 215-228.
16. Thompson L; Rea R, and Jenkins D. 1983. Effect of heat processing on hemagglutinin activity in red kidney beans. *J Food Sci.* 48. pp. 235-236.
17. Hantano K; Shimada T; Hiraiwa N; Nishumura M. and Nishimura I. 1997. a rapad increase in the level of binding protein (BIP) is accompanied by síntesis and degradation of storage proteins in pumking cotyledons. *Plant Cell Physilogy.* 38 pp 344-351.
18. Bates P; Knapp F. and Aruro P. 1977. Proteins quality of green-mature dry matura anda spro Nielsen S. & Liener I.E. 1984. Degradation of the major storages protein of *P. vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* 74. pp 494-498.
19. Nielsen S. & Liener I.E. 1984. Degradation of the major storages protein of *P. vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* 74. pp 494-498
20. Mulimani V.H and Vadiraj S. 1995. Effects of heat treatment and germination and germination on trypsin and chymotrypsin inhibitory activities in sorghum seeds. *Plant Food Hum Nut.* 44. pp 221-226.

21. Sotelo A. y Lucas B. 1998. Variation in antinutritional factors at different development stage in seed of *Phaseolus vulgaris* and *Erythrina americana*. Recent Advances of Reseach in Antinutricional factors in Legumes seeds and Repessed. Pp. 409-412.
22. Derache R. 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, Barcelona España. pp 82-84.
23. Sharma, and Sehgal S. 1992. Effects of domestic processing cooking and germination on the trypsin inhibitor activity and tannin content of *Faba beans*. Plant Foods Hum. Nutr. 42. pp 127-133.
24. Bau H. and Villaume C. 1997. Effect of germination on chemical composition biochemical constituents and antinutritional factors of *Soya beans* (*Glycine max*) seeds. J. Sc. Food Agric. 73. pp 1-8.
25. Kigel J. and Galili G. 1995. Seed development and germination, Marcel Dekker Inc., New York U.S.A. pp 306.
26. Bewley J. and Blanck M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. Plenum, Press, New York. Pp 1-30, 147-195, 199-201, 254-257, 329 y 330.
27. Rao y Dosthale G. 1987. Polyphenoloxidase activity in germinated legume seeds. J. Food Sci. 52. pp 1549-1555.
28. García M. R. ; Lucas B. ; Zendejas M. ; Soto H. M. ; Martínez M. ; Sotelo A. 1996 Variation of the Total Nitrogen, Non-protein Nitrogen Content and Types of Alkaloids in Diferente Stages of Development in *Erythrina Americana* Seeds. J. Agric. Food Chem.44. pp 2987-2991.
29. García M. R.; Soto H. M. ; Martínez V. M. ; Villegas M. A. 1999. Isolation of Alkaloids of *Erythrina* from Tissue Cultura. Phytochem. Anal. pp 12-16.
30. O'Gorman H. 1993. Plantas y Flores de México. Dirección General de Publicaciones UNAM, México D.F. pp. 24-25.
31. Guerrero L.M. 1980 Estudio comparativo de la composición química y los factores tóxicos de dos variedades de *Erythrina* (*Erythrina brevipflora* y *Erythrina americana*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, D.F. México pp 1, 4-6.

32. Garcia S. & Baxter J. 1992. Determination of tryptophan content in infant formulas and medical nutritionals. Journal of the AOAC International 75. pp 1112-1119.
33. Jiménez L. V. 1994. Eliminación de los componentes tóxicos de dos semillas del género de *Erythrina* y su evaluación bromatológica. Tesis de Licenciatura. UNAM. D.F. México 75. pp. 25-28.
34. Sotelo A.; Soto H. M. ; Lucas B. ; Giral F. 1993. Comparative Studies of The Alkaloidal Composition of Two Mexican *Erythrina* Species and Nutritive Value of the Detoxified Seeds. J. Agric. Food Chem. 41. pp 2340-2343.
35. Paquette L.A. 1993. Fundamentos de Química Heterocíclica. Ed. Limusa. México. pp 363-365.
36. Romero C. P. 1984. Biosíntesis y farmacología de los alcaloides de *R. roseus*. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. México D.F. pp 12-25.
37. Dalton D.R. 1990, The Alkaloids: The fundamental Chemistry. Wiley-Inter Science. pp 243 y 258.
38. Cordell G.A. 1990. Alkaloids in plants. Wiley- Inter Science. N.Y. pp 40-42.
39. Bohinsky C.R. 1987. Modern concepts in Biochemistry. Ed. Allyn and Bacon. INC. 5 th edition. U.S.A. pp 569-571.
40. FAO WHO (1985) Necesidades de energía y proteína. Serie de informes técnicos, No. 724.
41. Muller H.G & Tobin G. 1998. Nutrición y ciencia de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 82-98.
42. Lloyd I.E. McDonald B. Crampton I. 1982. Fundamentos de Nutrición. Ed. Acribia, Zaragoza España. pp 122-130.
43. Barrera E. M. M.; 1958. Valoración de alcaloides en colorín. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, D.F. México, pp 30-36, 35-40, 43-47.
44. Swoog F, R. 1999. Análisis Químico Instrumental. Editorial Interamericana México. Paginas: 303-341.
45. Waters Corporation. 1994. Waters AccQ-Tag. Chemistry Packeage Instruction Manual Waters. Corporation. U.S.A.

46. Rama Rao, M.; Tara, M.; Chandra, K. 1974. Colorimetric Estimation of Tryptophan content of Pulses. *J. Food Sci. Technol.* 11, pp. 213-216.
47. Lucas, B.; Sotelo, A. 1980. Effect of Different Alkalies, Temperatura, and Hydrolysis Times on Tryptophan Determination of Pure Proteins and Feeds. *Anal. Biochem.* pp. 109. 192-197.
48. Yust M; Pedroche J; Giron-Calle J; Vioque J; Millán F. and Alaiz M. 2004. Determination of tryptophan by high performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Analytical Nutritional and Clinical Methods Section. Food Chemistry* 85. pp 317-320.
49. Mansou, E. H, and Adauy T.A. 1999. Nutritional Potencial and Functional Proprieties of Heat Treated and Germinated Fenugreek Seeds. *Lebens-Wiss. Technol.* 27. pp 568-572.
50. Yu-Haeg Kuo, ; Pascale Rozan, ; Fernand Cambern. 2003. Effects of Different Germination Conditions on the Contents of Free Protein and Non-protein Amino Acids of comercial Legumes. *Food Chemistry*.31. pp. 243-259.
51. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1990. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C, U.S.A Vol. 1 y 2. pp 17-18, 40-62, 69-83 y 1012.
52. Kakade M; Rack J; Mcghee J. and Puski G. 1974. Determination of trypsin inhibitors activity of soy products. A collaborative. Analysis of improved procedure. *Cereal Chem.* 51. pp 376-382.
53. Lucas B; Sotelo A. 1993. A useful modification of the hemagglutination meted for screening of lectin in legume seeds. *Second International woishop on ANF's in legume seed.* Publication 70. pp 71-74.
54. ISO 9648. 1988. Sorghum determination of tannin content. 1st ed. pp 12-15.
55. Secretaria de Salud 2000. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo 1. México. Séptima edición.* pp 184-186.