



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos naturales de partes comestibles de guaje rojo (*Leucaena esculenta subsp. esculenta*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JUAN CARLOS SÁNCHEZ HURTADO



MÉXICO, D.F.

2014



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: PEDRO VALLE VEGA**

**VOCAL: BERNARDO LUCAS FLORENTINO**

**SECRETARIO: LUCIA CORNEJO BARRERA**

**1er. SUPLENTE: JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PEREZ**

**2° SUPLENTE: TANIA GOMEZ SIERRA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Anexos 1 de los laboratorios 4A y 4C del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edif. A, Facultad de Química, Cd Universitaria, México D.F.

**ASESOR:**

---

**M en C Bernardo Lucas Florentino**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**M. en C. Edelmira Linares Mazari**

**SUSTENTANTE:**

---

**Juan Carlos Sánchez Hurtado**

## *Agradecimientos.*

*Dedico esta tesis a mi madre  
Rosa María Hurtado Moreno, que me dio la vida  
y sin su apoyo incondicional en todo momento esto no hubiera sido  
posible, porque a pesar de desencantos y mucho tiempo siempre confió en mí para sacar  
esto adelante... En serio aun no existen las palabras adecuadas para darte las gracias  
mamá*

*A mi familia mi hermana Thanya,  
mis amados sobrinos Paloma y Daniel que aun cuando se  
desesperaban y creían que esto no funcionaba, logre terminar con esto  
y espero se sientan orgullosos de mí. Se muy bien que están ahí y yo también estaré ahí  
cuando lo necesiten*

*A mi papá Juan S. S que también me apoyo durante gran tiempo*

*A lo largo de esta aventura conocí  
a grandes personas a quien considere mis amigos  
y sin su apoyo, sin sus palabras y sin su amistad tampoco hubiera sido posible esto...*

*A todos los profesores y profesoras que me dieron  
clases, gracias por su apoyo, por sus enseñanzas y su paciencia...  
Sé que no fui el mejor alumno del mundo pero me llevo un pedacito de cada uno.*

*Agradezco todas las facilidades al M. en C. Bernardo Lucas Florentino que me apoyo  
en la realización del este trabajo tanto en material, equipo, tiempo.*

*Justo cuando creí que naufragaba hubo una persona que me saco de muchos apuros y del cual estar eternamente agradecido, por que es una gran persona y sin su apoyo, sin sus consejos y sin sus tips, sin duda me hubiera hundido. Muchas gracias profe Antonio Beaz.*

*A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron.  
Muchas gracias por el tiempo y sus correcciones,  
Gracias a ellas esto quedo increíble.*

*Y muy en especial para todos y cada uno de las personas que a lo largo de esta mágica aventura sin saberlo me impulsaron a seguir adelante con una palabra, una mirada, una palmada en la espalda o simplemente una sonrisa.... **MUCHAS GRACIAS***

*Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.*

*Para Bony (M. F) que con tanta Locura me dio el último impulso justo en el momento exacto.*

**JUAN CARLOS**

## INDICE

	Página
1.- Resumen	1
2.- Objetivos.	2
2.1.- Objetivo general	2
2.2.- Objetivos particulares	2
	3
3.- Antecedentes.	
3.1.- Familia Fabaceae	3
3.1.1.- <i>Leucaena esculenta</i>	3
3.1.2.- Distribución, hábitad y fenología	5
3.1.3.- Usos de <i>Leucaena esculenta</i>	6
3.2.- Composición química de alimentos	8
3.2.1.- Agua	9
3.2.2.- Cenizas	9
3.2.3.- Proteínas	10
3.2.4.- Grasas	10
3.2.5.- Fibra cruda	11
3.2.6.- Hidratos de carbono	12
3.3.- Calidad de una proteína y su evaluación	12
3.3.1.- Necesidades proteínicas	13
3.3.2.- Evaluación de la calidad de las proteínas	16
3.4.- Digestibilidad Proteínica " <i>in vitro</i> "	17
3.5.- Cromatografía Líquida de alta resolución	18
3.6.- Calificación química	20
3.7.- Agentes tóxicos y factores antinutricionales.	22
3.7.1.- Mimosina	23
3.7.2.- Lectinas	24
3.7.3.- Saponinas	25
3.7.4.- Inhibidores de tripsina	26
4.- Material y métodos.	27
4.1.- Diagrama de flujo	27

4.2.- Obtención del material biológico	28
4.3.- Acondicionamiento	28
4.3.- Humedad original	28
4.3.- Molienda fina	28
4.5.- Análisis químico bromatológico	28
4.5.1.- Humedad por secado al vacío	29
4.5.2.- Cenizas totales	30
4.5.3.- Proteína cruda	32
4.5.4.- Grasa cruda	35
4.5.5.- Fibra cruda	37
4.5.6.- Hidratos de carbono	39
4.6.- Digestibilidad proteínica "in vitro"	40
4.7.- Determinación del perfil de aminoácidos por HPLC	42
4.8.- Determinación de triptófano método enzimático	49
4.9.- Calificación química	53
4.10.- Agentes tóxicos y factores antinutricionales	54
4.10.1.- Mimosina	54
4.10.2.- Lectinas	58
4.10.3.- Saponinas	63
4.10.4.- Inhibidores de tripsina	68
5.- Resultados y discusión.	73
5.1.- Análisis bromatológico	73
5.2.- Digestibilidad proteínica "in vitro", determinación de aminoácidos y calificación química.	76
5.3.- Agentes tóxicos y factores antinutricionales: mimosina, lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina	80
6.- Conclusiones.	82
7.- Bibliografía.	83

## 1.- RESUMEN.

En México existen especies vegetales como fuentes potenciales de proteína, grasas e hidratos de carbono, lamentablemente estos no son aprovechados, ya sea por la falta de información en su composición química en particular de factores tóxicos naturales y se corre el riesgo de provocar un daño a la salud a corto o largo plazo. Entre estas especies se encuentra el guaje rojo (***Leucaena esculenta***). Las poblaciones silvestres de esta especie se encuentran en la porción sur de Puebla, noroeste de Oaxaca y la cuenca del Río Balsas entre otras regiones. Las semillas y renuevos foliares son ampliamente utilizados en la alimentación humana; los frutos se comercializan en los mercados locales como legumbre fresca. El follaje es ampliamente utilizado como forraje para el ganado, son arboles de 4 a 12 metros de altura y 35 cm de diámetro, de este árbol se obtienen los productos comestibles con una buena calidad proteínica así como una buena fuente de carotenos y vitaminas.

Se evaluó bromatológicamente las 4 partes comestibles del guaje rojo (***Leucaena esculenta subsp. esculenta***) que son: renuevos foliares, inflorescencias, semillas y polochocos, siendo estos últimos las agallas del árbol; con el fin de proponerlos como una buena alternativa en la complementación de la dieta de aquellas comunidades donde crece y se aprovecha esta leguminosa, sin que presente algún riesgo a la salud. Se realizó la caracterización bromatológica de dicho material biológico, para conocer su potencial nutrimental, en particular la cantidad y calidad proteínica, así como la determinación de factores tóxicos que con más frecuencia están relacionados con este género de esta familia botánica.

Los resultados obtenidos corroboran que las partes comestibles del guaje rojo tienen un alto contenido de proteína. En el caso de los factores toxicológicos analizados, las lectinas e inhibidores de tripsina en los renuevos foliares representan un efecto dañino a la salud. Por lo anterior las partes comestibles del guaje rojo (***Leucaena esculenta subsp. Esculenta***) se pueden proponer como un suplemento dietético

## 2.- OBJETIVOS.

### 2.1.- Objetivo general

Determinar la composición bromatológica de las 4 partes comestibles del guaje rojo (***Leucaena esculenta* subsp. *esculenta***) que son: renuevos foliares, inflorescencias, semillas y polochocos, así como determinar la presencia de factores tóxicos naturales que con mayor frecuencia se presentan, con la finalidad de evaluar su potencial alimenticio.

### 2.2.- Objetivos particulares

Evaluar el valor bromatológico, digestibilidad proteínica *in vitro* y toxicologicoanalítica de las 4 partes comestibles del guaje rojo (***Leucaena esculenta* subsp. *esculenta***)

Determinar el porcentaje de mimosina presente en las 4 partes comestibles del guaje rojo (***Leucaena esculenta* subsp. *esculenta***).

Determinar la composición de aminoácidos de la fracción proteínica y calcular su calificación química (CQ).

Realizar el análisis estadístico de los diferentes parámetros, para saber si hay diferencia estadísticamente significativa entre las partes comestibles del guaje rojo analizadas.

### **3.- ANTECEDENTES.**

#### **3.1 Familia *Fabaceae***

La familia de las leguminosas o familia ***Fabaceae*** es una de las más diversas de las plantas con flor, con cerca de 650 géneros y 20, 000 especies. Tiene distribución cosmopolita, quizá debido a su gran habilidad para colonizar ambientes cuyo suelo es bajo en Nitrógeno, lo cual puede ser atribuido en parte a la asociación simbiótica que mantiene con la bacteria ***Rhizobium*** [ 23 ]

El Gineceo está formado por un lóculo y dos carpelos. El fruto es una vaina que puede ser dehiscente por una o dos suturas aunque evolutivamente ha tenido pocas modificaciones dentro de la familia, si se ha diversificado el fruto de manera que muchas leguminosas presentan la forma característica de la vaina, pero presentan varios tipos de dehiscencia. [ 23 ]

##### **3.1.1 *Leucaena esculenta***

Son árboles de 4 a 12 m de alto (Fig. 1 y 2). Con corteza lisa de color gris claro brillante, suberizada, ramas angostamente aladas, cuando jóvenes con diminutas verrugas, pinnas 32 pares, 3 a 13 cm de largo; folíolos 64 pares, glándulas nectaríferas o nectario peciolar una entre el primer par de pinnas, a veces una entre los primeros dos o más pares; inflorescencia pedunculada 1.5 a 4.5 cm,; capítulos en antesis 1.3 a 2.5 cm de diámetro, en botón 7 a 12 mm de diámetro , a veces elipsoides; cáliz 2.5 a 3.8 mm de largo, corola 3.5 a 5 mm de largo, anteras incoloras, infrutescencia pedunculada de 1.5 a 4.5 cm de largo; fruto 14 a 24 cm de largo, 1.4 a 2.5 cm de ancho, membranáceo, generalmente rojizo, a veces pardo. Semillas obovadas, frecuentemente suborbiculares apiculadas, 8 a 9 mm de largo, 5 a 6 mm de ancho, castaño- rojizas o amarillentas. (Fig. 3.) [ 49 ]



Fig 1. Árbol de *Leucaena esculenta*.

Fig 2. Árbol de *L. Esculenta* con flores y frutos en el Tule. Oaxaca. (Foto E. Linares)

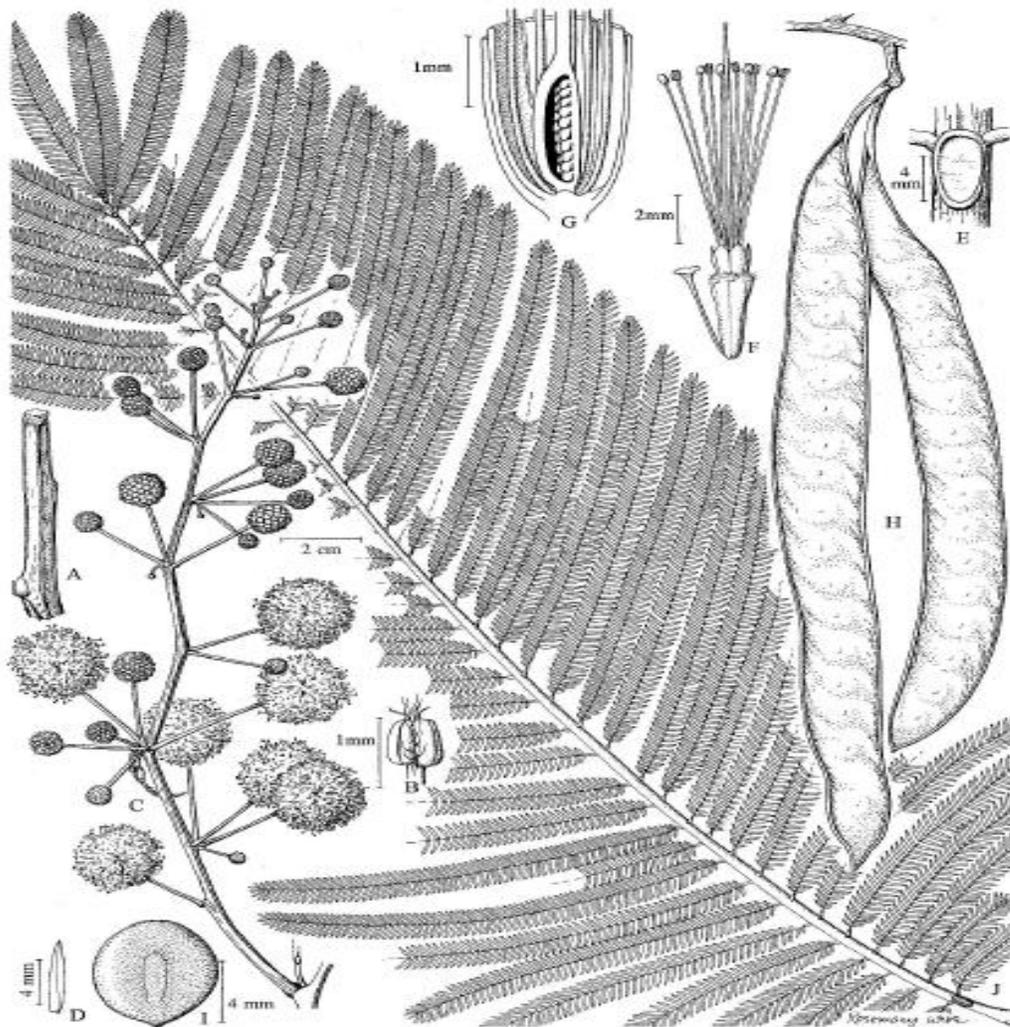


Fig. 3 *Leucaena esculenta*: A Pedúnculo alado; B anteras; C inflorescencia; D Foliolos; E Nectario peciolar; F Flor; G Sección longitudinal de la flor; H Vaina (fruto); I Semilla; J Hoja (basado en : A-G Hughes 1779; H-J, Hughes 888)

### 3.1.2. Distribución, hábitat y fenología de *Leucaena esculenta*

Se distribuye sobre todo en la sierra madre del sur, en la depresión del balsas, y abarcando también la región de la Cañada (depresión de Tehuacán – Cuicatlán - Quiotepec) y la zona de las sierras y tierras altas mixteco zapotecas. En Otras localidades se presenta como especie exótica cultivada. (Fig. 4 y Fig. 5). A su vez en la figura 4 se representan las zonas de México en donde se encuentran diversas variedades de *Leucaena esculenta subsp. esculenta*, *L. e. subsp. paniculata*, *e.subsp. maudae* y *L. involucrata*

Se localiza en selva baja caducifolia; cultivada o espontanea. Altitudes de 850 a 2100 msnm de preferencia en suelo calizo. Su floración y fructificación se presenta de agosto a marzo (a veces hasta mayo) y de noviembre a marzo (a veces desde agosto).

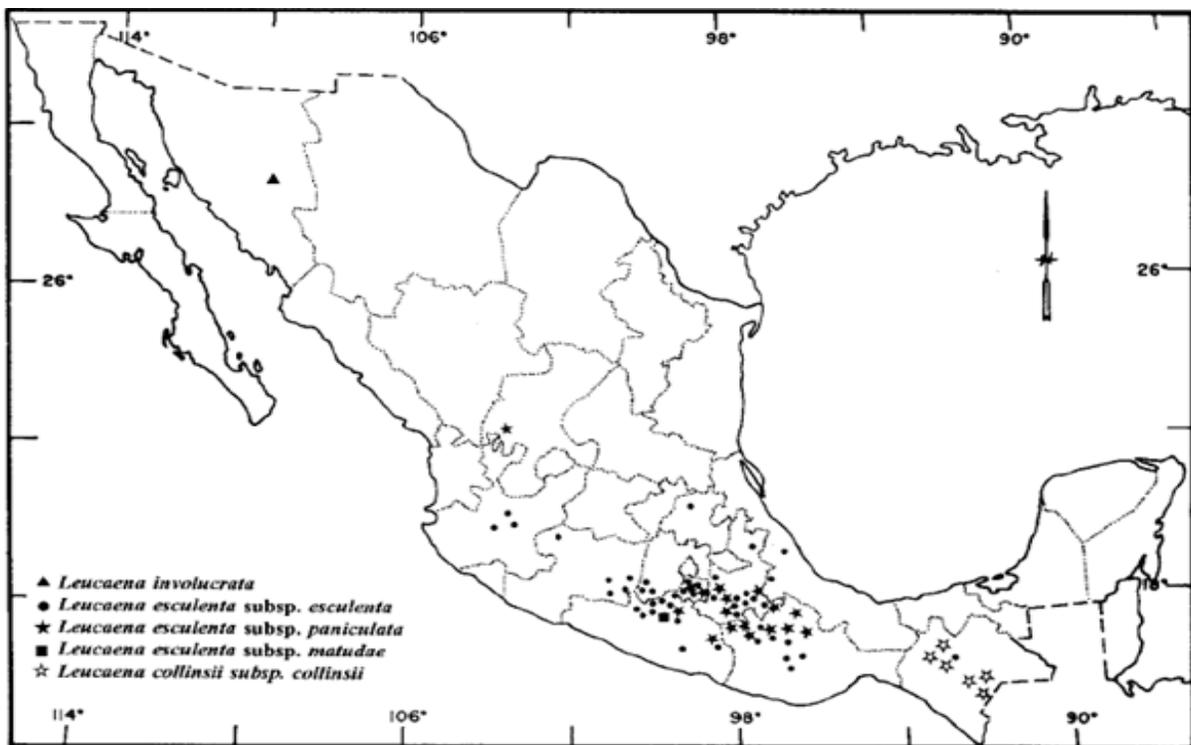


Fig. 4 Distribución conocida de *Leucaena esculenta subsp. esculenta*, *L. e. subsp. paniculata*, *e.subsp. maudae* y *L. involucrata*

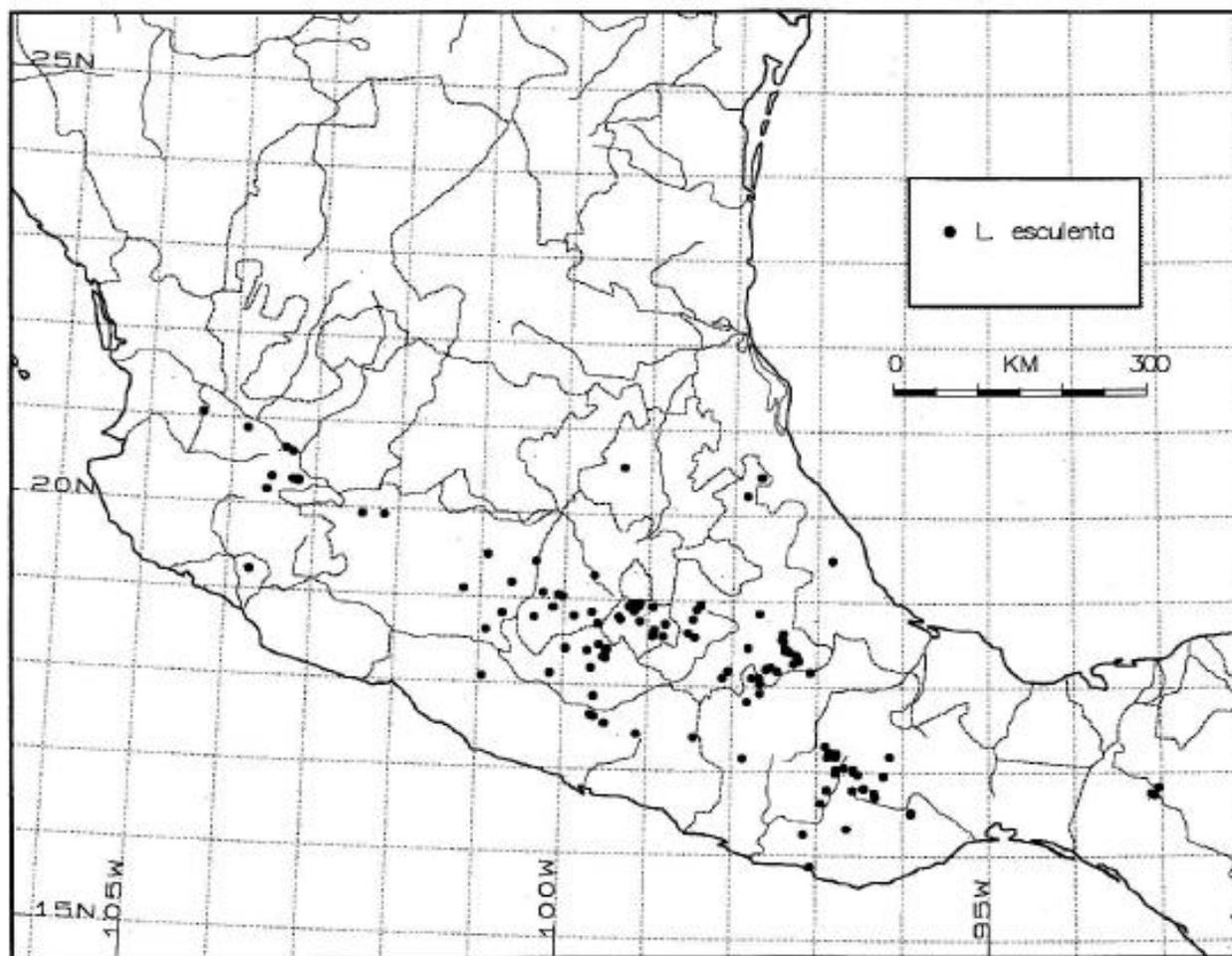


Fig 5. Rango de distribución actual de *L. esculenta*. Registros actuales de localidades alejadas en los estados de Sonora, Hidalgo, Chiapas y la costa de Oaxaca son registros de árboles cultivados. El área de distribución natural se encuentra en la zona central de Guerrero, Morelos y sur de Puebla

### 3.1.3 Usos de *Leucaena esculenta*.

En un estudio realizado por León en 2009, referentes al sistema de aprovechamiento del Guaje rojo, se encontró que el uso más importante es como especie comestible y son las mujeres las principales encargadas de la recolección de los frutos cuando estos se encuentran disponibles, de julio a noviembre.

Los botones florales se denominan totopos en el estado de México y Morelos y se consumen tiernos, al igual que los brotes o renuevos. Las agallas producidas por insectos se conocen en el área de Tehuacán Puebla como polochocos o

xolochocos (Fig 6). Las cuales se consumen como botana en crudo y como condimento para los alimentos, tienen un mayor valor comercial que las semillas contenidas en las vainas (Fig 6) estas son consumidas crudas como condimento, o también en memelitas. Como botana se comen secas y tostadas con sal, preparadas de esta forma se denominan en el estado de Morelos guajesquite. (Fig 7) Secadas al sol pueden ser almacenadas por tiempo indefinido para consumirse cuando el Guaje escasea. No obstante, la mayor forma de consumo son las semillas frescas, por lo que la venta de las vainas frescas es más redituable. [ 23 ]



Fig 6. Frutos de *L. esculenta*: vainas y agallas "polochocos" o "xolochocos"



Fig. 7. Semillas secas a la venta n Tepoztlán. Mor, para preparación de guajesquite. (Foto E. Linares)

El fruto tierno del Guaje es consumido como alimento (Fig 8), las hojas se usan como forraje, y la madera como leña y para la construcción de cercas vivas, en

general el árbol se utiliza para programas de restauración ambiental y conservación de suelos y agua tanto en zonas silvestres, como en parcelas agrícolas [ 7 ]



Fig. 8. Frutos de guaje rojo de venta en el Tianguis de Tepeaca. Puebla. (Foto E. Linares)

### 3.2.- Composición química de los alimentos.

La composición química de un alimento es demasiado compleja, ya que es una matriz que además de proporcionar nutrimentos, puede contener más de una centena de sustancias sin ninguna función nutritiva; de los principales macronutrientes tenemos las proteínas, grasas e hidratos de carbono, además los micronutrientes se tienen, como vitaminas y minerales; sin embargo hay otra gran variedad de sustancias sin valor nutritivo, como lo son los factores antinutrimientales, un ejemplo de estos son los inhibidores de tripsina. Por lo que no hay nada que sea más esencial al estudio de la ciencia de los alimentos que el conocimiento de su composición química y en consecuencia sus propiedades.[12 ]

El valor nutrimental de los alimentos depende de sus componentes, es decir, de la cantidad y calidad de los nutrimentos, así como de la presencia o ausencia de

sustancias que afectan a su utilización nutritiva (digestibilidad, absorción o metabolismo) o los efectos antinutritivos. [ 1 ]

No obstante, muchos alimentos que se consumen regularmente, incluidas algunas de las fuentes principales de proteína de alta calidad, contienen sustancias que son dañinas si se consumen en cantidades abundantes. Los tóxicos naturales son productos originados en el metabolismo de animales, plantas o microorganismos que se utilizan como alimento, se desconocen los efectos derivados de un largo periodo de exposición a dosis bajas de tóxicos presentes naturalmente en los alimentos. [ 37 ]

### 3.2.1.- Agua.

La humedad o contenido de agua en los granos de leguminosas, varía en función de la especie, del periodo de recolección, del clima, del almacenamiento etcétera. Suele representar entre el 5 y el 15% del peso total. [ 1 ]

El contenido máximo de agua para un determinado tejido vegetal depende de sus características químicas y estructurales, así como de diversos factores extrínsecos. La susceptibilidad de un producto vegetal a la deshidratación es función de la humedad relativa del ambiente y de las modificaciones estructurales y químicas con las que responde el producto para reducir la transpiración (pérdida de agua). Las pérdidas de agua provocan el marchitamiento y la pérdida de peso y además, el balance hídrico puede originar cambios fisiológicos deseables o indeseables en los alimentos [ 12 ]

Las principales funciones biológicas del agua estriban fundamentalmente en su capacidad de transportar diferentes sustancias a través del cuerpo, disolver otras y mantenerlas tanto en solución como en suspensión coloidal. [ 3 ]

### 3.2.2.- Cenizas.

Las cenizas totales son el residuo que queda de la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones

determinadas. Una vez que se eliminan otras impurezas y partículas de carbono procedentes de una combustión incompleta, este residuo se corresponde con el contenido de minerales del alimento. [ 24 ]

La incineración de la muestra destruye la materia orgánica cambiando su naturaleza, las sales metálicas se convierten en óxidos o carbonatos y reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Entre los minerales presentes se encuentran el hierro, cobre, magnesio, sodio, calcio, fósforo, azufre y zinc [ 18 ]

### 3.2.3.- Proteínas.

Las proteínas son las moléculas más abundantes en las células, suponiendo 50% o más de su peso seco. Cada proteína tiene una estructura y conformación única que le permite desempeñar una función específica en la célula viva, están constituidas por carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno, la mayoría contiene azufre y algunos elementos adicionales como fósforo en las proteínas lácticas. A su vez están hechas de aminoácidos, tiene diferentes propiedades, dependiendo de su estructura y composición. [ 15 ]

El valor biológico de estas proteínas de origen vegetal en particular de leguminosas viene condicionado por niveles relativamente bajos de aminoácidos azufrados, como la metionina y la cistina. Por ello cuando coinciden con los cereales en la alimentación, que aportan proteínas complementarias, se consigue que la calidad de la proteína de la dieta aumente y conjuntamente su valor biológico [ 1 ]

Las leguminosas se han considerado tradicionalmente excelentes fuentes de proteína vegetal, las cantidades de este nutriente en las leguminosas habituales en nuestra alimentación puede oscilar entre 17% (chicharos) y 42% (soja). [ 17 ]

### 3.2.4.- Grasas.

Los ácidos grasos son moléculas que contienen un grupo funcional carboxilo (-COOH) unido a una cadena alifática lineal de número par de carbono. Esta

estructura les proporciona un carácter anfipático, donde el extremo carboxílico tiene características polares y iónicos y el otro extremo (-CH<sub>3</sub>) tienen características apolares, puede ser saturados o sea que solo tiene enlaces sencillos entre átomos de carbono con forma lineal, pero también pueden ser insaturados, conteniendo uno o más dobles enlaces entre los carbonos. [ 17, 45 ]

Las grasas se necesitan para numerosas funciones en el cuerpo humano y son esenciales dos ácidos grasos insaturados (linoleico y linolénico) se requieren para el crecimiento. La grasa es una fuente de energía muy concentrada proporcionando 9 calorías/gramo, esto es 2 ¼ veces más calorías que las proteínas e hidratos de carbono. [ 15 ]

El contenido de grasa de las leguminosas es normalmente bajo (1 a 6 %), a excepción de la soja (17 a 20%), cacahuacate (40 a 50%) los cuales se consideran granos oleaginosos. En general las leguminosas de consumo habitual aportan pequeñas cantidades de lípidos, pero de buena calidad, siendo los ácidos grasos predominantes, el Oleico (11 a 15%); linoleico (25 a 63%) y linolénico (1 a 27%), cuya naturaleza insaturada incide en las propiedades nutritivas y bromatológicas de estas semillas. [ 17 ]

### 3.2.5.- Fibra cruda.

Con el nombre de fibra cruda se agrupa a una mezcla heterogénea de componentes de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto gastrointestinal del hombre, es un residuo orgánico insoluble constituido principalmente por celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucilagos. La celulosa es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza y es uno de los componentes estructurales de las células vegetales, representando un 20 a 40% de la materia seca de plantas verdes. La unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace β-glucósido hace a la celulosa especialmente insoluble y resistente a la degradación por enzimas digestivas. [ 26 ]

La fibra cruda se encuentra en verduras, cereales, leguminosas y en frutas, es responsable de la regulación gastrointestinal con la reducción del tiempo de tránsito de los alimentos y el aumento de la masa fecal. [ 30 ]

### 3.2.6.- Hidratos de carbono.

El contenido de hidratos de carbono de las legumbres oscila entre 26 a 90% en soja y de 55 a 60% en habas, siendo el almidón el glúcido mayoritario en estas semillas, otros hidratos de carbono como la celulosa, hemicelulosa, pectina y otros en cantidad variable, procedentes de paredes celulares de la semilla no son digeribles y forman parte de la fibra dietética, mientras que algunos galactosidos también presentes (rafinosa, estaquiosa) pueden dar lugar a procesos de flatulencia, al ser fermentados por la flora intestinal. [ 1 ]

### 3.3.- Calidad de una proteína y su evaluación.

Los aminoácidos son las unidades fundamentales de las proteínas, se caracterizan por poseer un grupo amino y uno carboxilo además de contar con un grupo funcional siendo característico para cada aminoácido. Existen en particular algunos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo, por lo que deben ser suministrados en la dieta diaria en proporciones adecuadas y a continuación se presentan los aminoácidos esenciales o indispensables: [ 29 ]

- |                       |              |
|-----------------------|--------------|
| -Fenilalanina         | - Treonina   |
| -Histidina (en niños) | - Triptófano |
| - Isoleucina          | - Valina     |
| - Leucina             | - Metionina  |
| -Lisina               |              |

Las necesidades de aminoácidos con un grupo funcional aromático (Fenilalanina, Triptófano y Tirosina) se debe a la incapacidad de tiene el organismo de no poder sintetizar anillos aromáticos. [ 12 ]

Los aminoácidos considerados dispensables, son aquellos que el organismo puede sintetizar en concentraciones suficientes para cubrir sus necesidades, si la cantidad de nitrógeno aportado por las proteínas es satisfactoria [ 38 ]

Las proteínas son los constituyentes principales de los tejidos del organismo y su principal función es la de aportar nitrógeno y aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas corporales y sustancias nitrogenadas; por lo que la calidad y cantidad de estos compuestos en a dieta son parámetro fundamental que deben ser considerados [ 29 ]

Existe una gran variedad de ellas e interviene en numerosas procesos desempeñando diversas funciones biológicas, en el organismo humano, tales como; energéticas, ya que una pequeña cantidad de energía que requieren las células es suministrada por las proteínas; plásticas. Por que participan en la construcción de órganos, tejidos; catalizadoras, interviniendo en reacciones metabólicas; mediadoras y transportadoras que se encargan de transportar sustancias a través de la sangre y otros líquidos corporales. [ 33 ]

La determinación del contenido de proteína en un alimento no es suficiente para evaluar su calidad nutrimental, debido a que diversos factores afectan su aprovechamiento por el organismo relacionados con su naturaleza, balance y biodisponibilidad. Aun cuando dos alimentos contengan la misma cantidad de proteína, es posible que uno tenga mejor aporte nutrimental. Se puede decir que una proteína de buena calidad es aquella que se digiere fácilmente y contiene aminoácidos indispensables en cantidades que corresponden a los requerimientos de los individuos. [ 33, 42 ]

### 3.3.1.- Necesidades proteínicas

Se puede establecer una calificación de la calidad biológica de una proteína en la dieta a partir de su composición de aminoácidos, una proteína deficiente en aminoácidos esenciales o indispensables tendrá un valor menor que una que los contiene en mayor proporción. Las proteínas de origen animal tienen una composición de aminoácidos adecuada para la alimentación humana y en estudios relativos a proteína pueden ser utilizadas como proteínas de referencia. Las

proteínas provenientes de otros alimentos pueden sustituir las de origen animal a condición de que satisfagan el requerimiento de aminoácidos esenciales. [ 33 ]

Las necesidades de proteína de una persona dependen de su actividad física y aporte calórico, su dieta debido a que si este último es insuficiente una buena parte de las proteínas consumidas será empleada para la producción de energía. Las necesidades energéticas se incrementan, naturalmente, durante el crecimiento, embarazo y lactancia [ 29 ]. Las cantidades indispensables de proteínas que el organismo requiere, se clasifican en 2 categorías:

1.- La cantidad necesaria de proteínas totales o nitrógeno total, que el cuerpo debe de obtener para la síntesis de aminoácidos dispensables, formación de otras proteínas distintas y otros elementos nitrogenados en los tejidos. La FAO/OMS valoró los requerimientos proteínicos diarios (Tabla 1.)

2.- La cantidad necesaria de aminoácidos esenciales o indispensables, el hombre adulto no puede sintetizar los 8 aminoácidos esenciales o indispensables tan solo hacerlo en una proporción inapreciable. Por lo tanto, estos ocho aminoácidos tienen que ser aportados por el régimen alimenticio; sin embargo no se conocen las necesidades diarias de aminoácidos indispensables. Su determinación se intento utilizando conjuntamente el método del equilibrio nitrogenado y regímenes en los que el nitrógeno era aportado por aminoácidos libres. Los valores provisionales recomendado por la FAO. Utilizando estos valores al mismo tiempo que las necesidades proteicas diarias, la FAO propuso modelos provisionales de composición de aminoácidos indispensables para un régimen proteico ideal para lactantes, niños y adultos. Se considera que estos regímenes proteicos corresponden a las necesidades del organismo para cada uno de los aminoácidos indispensables; la utilización de aminoácidos debe ser, por lo tanto, completa. En la tabla 2 se anotan. [ 4 ]

Tabla 1. Requerimientos proteicos diarios \*

Edad (años) **	g de Proteína/ Kg <sub>p</sub> corporal/día
<b>Lactantes y niños</b>	
0.25 – 0.5	1.86
0.75 – 1.0	1.48
2 – 3	1.13
9 – 10	0.99
<b>Adolescentes</b>	
10 – 11	0.99
14 – 15	0.96
17 – 18	0.86
<b>Adultos</b>	0.75

\* Fuente FAO/OMS/ONU, 1985 [ 38 ]

\*\* Durante la gestación se recomienda que la ingesta proteínica sea de 6 g/día y en la lactancia de 16 g/día

Tabla 2. Requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU [ 38 ]

Aminoácido	mg de aminoácido/g de proteína			
	Lactante [media(rango)]*	Preescolares ( 2 – 5 años)	Niños (10 – 12 años)	Adultos
<b>Histidina</b>	26 (18-36)	19	19	16
<b>Isoleucina</b>	46 (41-53)	28	28	13
<b>Leucina</b>	93 (83-107)	66	44	19
<b>Lisina</b>	66 (53-76)	58	44	16
<b>Metionina + Cistina</b>	42 (29-60)	25	22	17
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	72 (68-118)	63	22	19
<b>Treonina</b>	43 (40-50)	34	28	9
<b>Triptófano</b>	17 (16-17)	11	9	5
<b>Valina</b>	55 (44-77)	35	25	13
<b>TOTAL</b>	460 (406-588)	339	241	127

\* Composición de aminoácidos de la leche materna.

### 3.3.2.- Evaluación de la calidad de las proteínas

La evaluación de la proteína de un alimento, normalmente se lleva a cabo partiendo de lo más complejo, comienza con el análisis de nitrógeno y aminoácidos, seguido de una serie de determinaciones químicas específicas, terminando con una evaluación nutritiva. Debido a que los ensayos con animales han sido ampliamente usados para evaluar la calidad proteínica, han logrado tal reconocimiento, que frecuentemente se considera que los resultados obtenidos suministran toda la información requerida. [ 9 ]

Para determinar el valor nutritivo de las proteínas se puede hacer uso de métodos químicos o biológicos:

#### - Métodos químicos:

Utilizando los patrones de la FAO/OMS de 1985 [ 38 ], la cantidad adecuada de proteína que se debe de consumir en cada etapa de la vida puede estimarse a partir de su composición en aminoácidos, para lo cual se determinan la Calificación Química (C.Q) relacionada con el patrón FAO/OMS para los aminoácidos individuales, siendo esta forma de evaluar la calidad de las proteínas por un método químico. La C.Q expresa la relación entre el porcentaje de cada aminoácido en la muestra y el porcentaje del mismo aminoácido en la proteína de referencia. Para la proteína a analizar, el aminoácido limitante es el componente que determina el valor global de la proteína [ 9 ]

La calidad de proteína de un alimento es un parámetro que incide en su valor comercial. Además, existen varias razones que obligan a la industria alimentaria a medir el valor biológico de la proteína de sus productos, entre estas destacan las regulaciones de la Food and Drug Administration, sobre todo en casos de exportación en los que este organismo establece valores mínimos de calidad biológica de la proteína o mezclas de estas, con el propósito de desarrollar nuevos productos o realizar cambios en los ingredientes [ 9, 32]

#### - Métodos biológicos

Una forma de expresar la calidad de una proteína, es por medio de los ensayos biológicos que se basan en medir el incremento o el balance de nitrógeno en

animales experimentales y la relación de eficiencia proteínica (REP) constituye ese parámetro, siendo el método más ampliamente utilizado. [ 32 ]

#### 3.4.- Digestibilidad proteínica *in vitro*

La digestibilidad proteínica *in vitro* es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento aunque no siempre se cumple y es definida como "la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba" [ 38 ]

Durante la digestión de las proteínas por animales monógtricos como el hombre los enlaces peptídico se deben hidrolizar en forma relativamente rápida mediante la acción de enzimas proteolíticas específicas, las cuales son secretadas por el estomago, la mucosa intestinal y el páncreas, de tal forma que se liberan aminoácidos y péptidos, los cuales en la mucosa intestinal pasan a aminoácidos libres y son absorbidos en el intestino delgado, donde pasan a la vena porta para distribuirse a través del sistema cardiovascular a todo el organismo [ 31 ]

En general se conoce que los alimentos proteínicos de origen animal son mas digeribles que los de origen vegetal [ 8 ] Algunos factores que pueden influir en la digestibilidad de la proteína dietética son:

- La fracción proteínica dentro de los alimentos de origen vegetal, pueden estar protegida por la acción enzimática por materiales celulares estructurales, como son hemicelulosa, lignina, etc.
- El procesamiento térmico en ocasiones puede mejorar la digestibilidad, debido a la desnaturalización de la proteínas nativas y hacerlas más susceptibles a la acción de las enzimas digestivas; sin embargo lo anterior se puede revertir para el caso de un sobrecalentamiento, ya que se puede modificar la solubilidad de las proteínas y hacerlas poco digeribles.
- Algunos alimentos de origen vegetal pueden contener factores tóxicos y antinutricionales que disminuyen la función de absorción de la mucosa intestinal o bien disminuyen la biodisponibilidad de los aminoácidos.

La digestibilidad de una proteína alimenticia se puede determinar por procedimientos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vitro* simulan condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo, sin embargo aunque son más precisos y reproducibles, pueden dar resultados inexactos. Por lo tanto, hasta la fecha los ensayos *in vivo* para la digestibilidad son más confiables.

[ 8 ]

### 3.5.- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés). Es un método de separación física basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil que en este caso es un líquido. La cromatografía líquida "clásica" se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de colocar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que la fase móvil fluya a velocidades razonables. De esta manera, nació la técnica de cromatografía de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumentación especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas. Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede clasificarse en:

1.- Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido y se utiliza casi exclusivamente sílice y en casos discretos alumina.

2.- Cromatografía de reparto o partición. Actualmente se utiliza como fase estacionaria compuestos ligados químicamente a un soporte sólidos de sílice. Se puede subdividir en cromatografía en fase normal y en fase inversa (usualmente mal llamada reversa por su traducción de "reversed"). En la cromatografía en fase normal la fase estacionaria es polar (como por ejemplo sílice) y la fase móvil es poco polar (hexano, diclorometano, cloroformo). En esta modalidad los

compuestos más polares quedan más retenidos mientras que los menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase inversa, el compuesto unido químicamente es no polar, frecuentemente hidrocarburo alifático, y se emplean las fases móviles con solventes polares (agua, metanol, acetonitrilo). En este caso, las sustancias más polares eluyen primero y las hidrofóbicas quedan más retenidas.

3.- Cromatografía de iones: Se utilizan columnas rellenas con fases estacionarias con una determinada carga que retiene iones de carga opuesta. Las fases estacionarias para la modalidad clásica de esta cromatografía son las resinas de intercambio iónico.

4.- Cromatografía de exclusión por tamaño: La fase estacionaria está formada por partículas de porosidad definida y uniforme. Las moléculas de mayor tamaño tienen menor capacidad para acceder a los poros y por mantenerse "excluidas" eluyen más rápido, mientras que las de menor tamaño que pueden penetrar en los poros y permanecer allí más tiempo eluyen en último lugar.

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome solventes de diferentes recipientes en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina isocrática, sin embargo es normal realizar gradientes de composición de solvente para aumentar el rango de polaridades de sustancias a separar acortando el tiempo total de análisis. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas. La bomba envía al solvente hacia la válvula inyectora a través de tuberías de diámetro pequeño, de acero inoxidable o de plásticos especiales. [ 43 ]

Luego de que se produce la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector que genera una señal eléctrica ante el pasaje de los analitos proporcional a la cantidad de sustancia. Esa señal es enviada al registrador de donde queda registrado el cromatograma. En el caso ideal los picos cromatograficos son gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador puede calcular además el área correspondiente a

cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del loop de inyección, de la columna y del tipo de bomba, es posible realizar además de separaciones analíticas, cromatografías preparativas. Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir las tuberías y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y producir inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0.45 a 0.22  $\mu\text{m}$ . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con degasificadores de solvente por vacío o por burbujeo con He, y, en el caso de no contar con los mismo, se deben degasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil. [ 43 ]

### 3.6.- Calificación Química (CQ)

Es un método para evaluar la calidad proteínica basada en los requerimientos de aminoácidos del humano. Este método fue adoptado recientemente por la Food and Drug Administration (FDA) y por la Food and Agricultural Organization of United Nations/World Health Organization (FAO/WHO 1993), y que es mencionado como el mejor método predictivo para determinar la calidad proteínica de alimentos que beneficien el sustento y desarrollo de los humanos. [ 4 ]

La evaluación de la proteína en la calificación química es diferente que en el REP y demás métodos biológicos, el PER se basa en los requerimientos que necesitan las ratas para su desarrollo, lo cual es significativamente diferente a los de los humanos. La calificación química se basa en las necesidades de aminoácidos de los humanos para evaluar la calidad proteínica (ajustado por digestibilidad), considerando que los niños de 2 a 5 años de edad son el grupo con una mayor demanda de aminoácidos. Otros métodos de evaluación biológica usan la absorción de nitrógeno como base; sin embargo no toma en cuenta ciertos factores que influyen en la digestión de las proteínas y tiene limitaciones para el

uso en humanos ya que no se sabe cuál es el verdadero valor de los requerimientos de nitrógeno, pero si puede ser usado para evaluar alimentos con diferencias proteínicas conocidas y para conocer cantidades absorbidas de nitrógeno, que se asume son las utilizadas para la síntesis de proteínas como indicado de evaluación de estas.

Este método nos da la siguiente escala

Tabla 3. Valores de referencia para la calificación química\*

Referencia	
<b>Huevo blanco</b>	(1.0)
<b>Leche</b>	(1.0)
<b>Carne</b>	(0.92)
<b>Soya</b>	(0.91)
<b>Frijol</b>	(0.68)
<b>Trigo</b>	(0.54)
<b>Lentejas</b>	(0.52)
<b>Cacahuates</b>	(0.52)

\* Valores expresados tomando como referencia el huevo (C.Q =1)

Usando la calificación química la calidad proteínica es determinada por comparación del perfil de aminoácidos de un alimento en específico contra un perfil estándar de aminoácidos que tiene el valor más alto 1.0, que significa que dicho alimento al ser ingerido provee el 100% de aminoácidos requeridos o más.

La FDA dio dos razones del porque se adoptó la calificación química como método oficial y son:

El método de la calificación química se basa en requerimientos de aminoácidos de humanos a diferencia de otros métodos en donde se utilizan requerimientos de animales

Debido a la previa recomendación de la FAO de implementarlo con propósitos regulatorios.

Sin embargo tiene limitaciones como cualquier otro método de predicción como son:

Los aminoácidos que llegan a porciones del ileum en el organismo son menos absorbidos que otros, además de que estos pueden ser utilizados por bacterias, lo cual repercute directamente en la cantidad de nitrógeno en heces y que no se pueden medir ocasionando una variación en la medición de absorción de nitrógeno debido a la digestión. Además de que no sabemos cuáles fueron las proteínas utilizadas por el hombre. [ 4 ]

Este método aun es incompleto ya que en las dietas normales no se tiene un solo tipo de proteína, sin embargo permite calcular la calificación química ya que se puede obtener un perfil de aminoácidos y la cantidad que provee cada uno de los alimentos en la dieta, y que es diferente a los demás perfiles.

Por ejemplo las proteínas de los cereales tiene un score químico de 0.4 a 0.5 limitado por Lisina, pero por otro lado las leguminosas tienen un valor de 0.6 a 0.7 limitado por metionina. Cuando los dos son consumidos juntos, el valor que se tiene es de 1.0 ya que las proteínas se suplementan.

### 3.7.- Agentes tóxicos y factores antinutricionales.

Los agentes tóxicos son sustancias que tienen un efecto toxico directo sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse por su particular reactividad, que hacen que sean sustancias con alto grado de toxicidad y pueden actuar por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos o en ciertas casos por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología y produce una intoxicación aguda en ocasiones con una sola dosis. [ 25 ]

Los factores antinutricionales son sustancias que disminuyen la disponibilidad o provocan una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio y a largo plazo determinan la aparición de una patología particular, pero se puede compensar con un aporte adicional de los nutrientes implicados en un inicio de su acción [ 25 ]

### 3.7.1.- Mimosina.

Es conocido que el género *Leucaena* contiene un aminoácido no proteico llamado mimosina y sus efectos tóxicos en los animales ha ocasionado una baja aceptación de esta planta en algunos países. A partir de 1937, se llevaron a cabo estudios para el aislamiento y determinación estructural de este compuesto y posteriormente para la definición de sus efectos citotóxicos y depilatorios. [ 5 ]

Químicamente la mimosina es el ácido  $\beta$ -[N-(3-hidroxi-4-piridona)] aminopropiónico, compuesta por el aminoácido alanina, ligado a un núcleo de piridina. (Figura 9). Constituye a su vez un compuesto análogo del 3,4 dihidróxifenil alanina (DOPA) y tiene una estructura cristalina, muy similar a la de esta sustancia. [ 5 ]

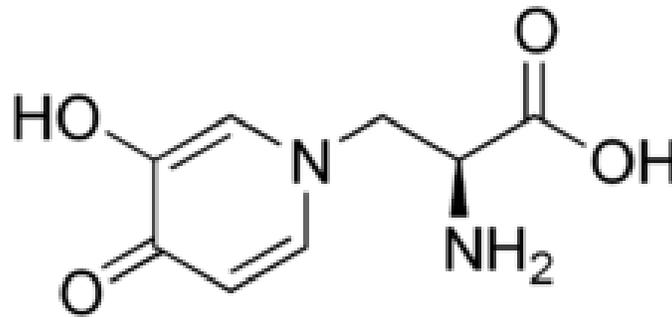
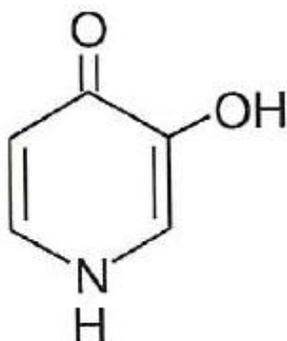
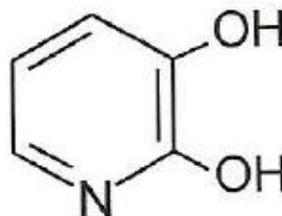


Figura 9. Estructura de la molécula de mimosina.

Cuando se administra oralmente los productos de excreción son en primer lugar mimosina como compuesto dominante sobre todo un día después de suministrar la dosis y 3-hidroxi-4(1H)-piridona (3,4 DHP) y su isómero el 2,3 dihidroxi-piridina (2,3 DHP) (Fig. 10,) que es un producto de la hidrólisis de la mimosina por microorganismos del rumen, durante el segundo y tercer día de excreción de la mimosina resulta ser la mimosinamina o mimosina descarboxilada que es el metabolito de menor excreción. [ 5 ]



3,4DHP



2,3DHP

Figura 10. Estructura de la molécula 3,4 DHP y 2,3 DHP

La sintomatología se caracteriza por: pérdida de cabello, anorexia, crecimiento retardado, parálisis de las extremidades, cataratas, salivación profusa, lesiones a nivel esófago,. Además se tiene indicios de que este aminoácido puede interactuar con el fosfato piridoxal inhibiendo a las enzimas (decarboxilasas) que contengan este cofactor. En animales se puede presentar bocio. Los efectos sobre la reproducción incluyen bajo índice reproductivo debido a la mortalidad embrionaria precoz y a la muerte perinatal. La toxicosis puede ser aguda o crónica y conllevar incluso a la muerte. Esta leguminosa se ha recomendado como planta forrajera e incluso sugiere inactivar térmicamente a la mimosina en las plantas jóvenes o verdes, no siendo esto posible en las maduras [ 46 ]

### 3.7.2.- Lectinas (Fitoheماغلوتينinas)

La mayoría de estos tóxicos se encuentran en las semillas de leguminosas y poseen afinidad específica por los residuos glucosídicos localizados en la superficie de los eritrocitos (glóbulos rojos). La presencia de fitoheماغلوتينinas, en las semillas, las hace un alimento no apto para el ser humano, pero afortunadamente pierden su actividad debido a la cocción ya que son termolábiles por su naturaleza proteínica. [ 11, 24 ]

Debido a su especificidad hacia ciertos hidratos de carbono, a las hemaglutininas también se les conoce con el nombre de lectinas. En la semilla las lectinas se encuentran presentes en cuerpo proteínicos en el endospermo, donde llegan a constituir hasta el 10% de las proteínas totales; durante la germinación las proteasas son responsables de la inactivación de las lectinas. [ 36 ]

Muchas lectinas son destruidas por la cocción, existen otras extraordinariamente resistentes al calor como las contenidas en la glutelina y la gliadina de trigo, resisten una temperatura de 100 °C durante 30 minutos. Todas las lectinas tóxicas producen síntomas parecidos de mayor o menor gravedad, entre los que resalta en primer lugar la intensa inflamación de la mucosa intestinal con la posterior destrucción de los epitelios, el edema y la hemorragia del sistema linfático. [ 24 ]

### 3.7.3.- Saponinas

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal en hojas, raíces, tallos y flores. Son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosa, hexosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser de naturaleza esteroidea o triterpenoide, aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides. [ 25 ]

Algunas saponinas son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea, tienen una acción irritante sobre las células. En el parénquima pulmonar se traduce en una acción expectorante, sobre las células renales produce una acción diurética y sobre los glóbulos rojos una acción hemolítica.

#### 3.7.4.- Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de tripsina son sustancias antinutrimientales de naturaleza proteínica presentes en la mayoría de las leguminosas y cereales; tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina.

Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que inhiben, la enzima e inhibidor experimentan algún tipo de interacción enzima-sustrato, los inhibidores son resistentes a la proteólisis; sin embargo tienen un efecto protector en las plantas que los contienen ya que impiden la digestión de las proteínas de las semillas por lo animales o los insectos herbívoros. [ 40 ]

El calentamiento de leguminosas puede mejorar el valor nutritivo y producir un suplemento proteínico de mayor calidad, no obstante en algunas leguminosas puede detectarse actividad inhibidora de la tripsina después de haberlas calentado. Con esto se recomienda buscar un equilibrio de tiempo y temperatura con el fin de que no se dañen las sustancias nutritivas sensibles al calor. [ 38 ]

#### 4.- Material y métodos.

A continuación se presenta la figura 11. que nos muestra de forma ilustrativa la forma de desarrollar el presente trabajo.

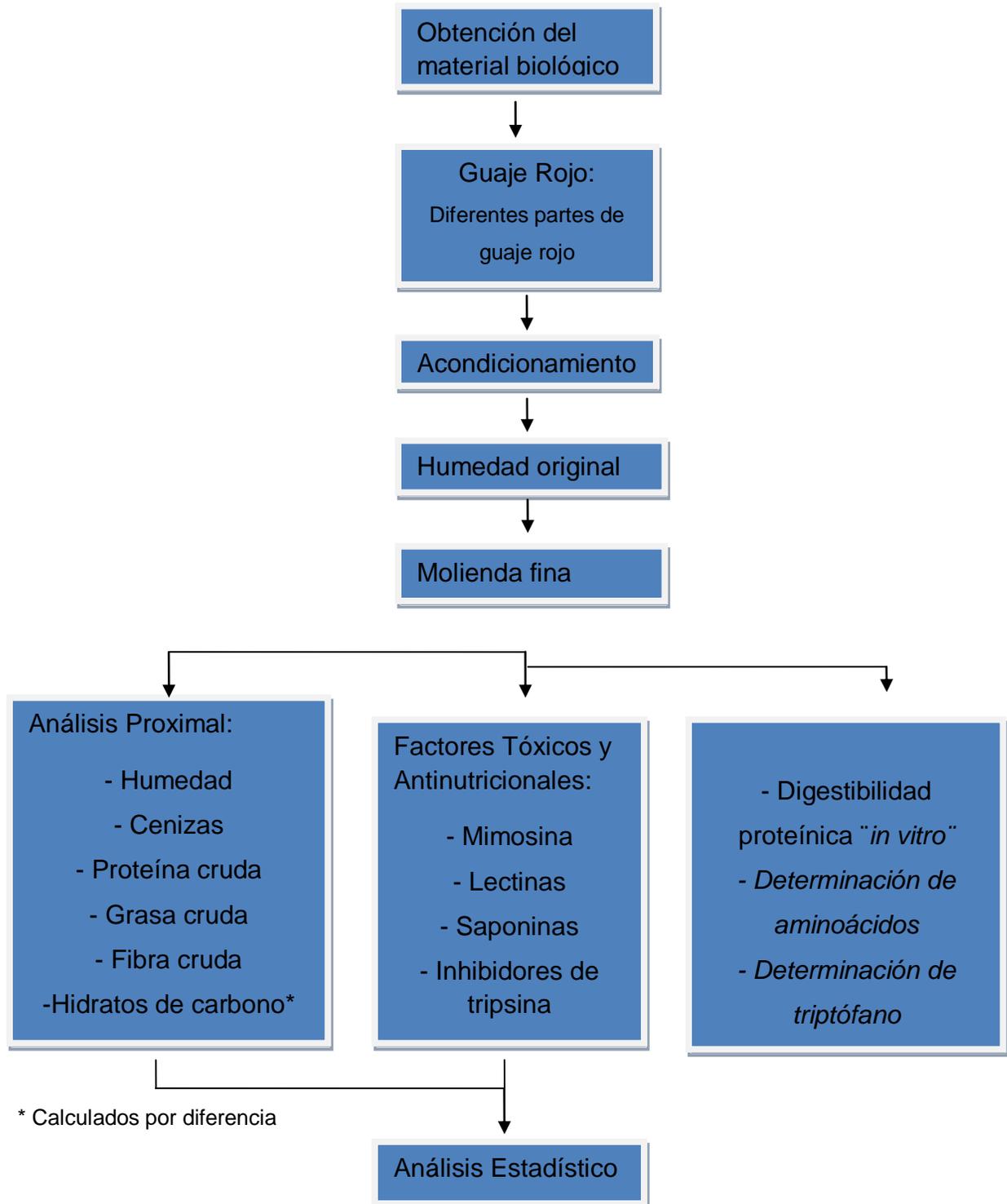


Figura 11. Diagrama general de trabajo.

#### 4.1.- Obtención del material biológico.

Para la realización del proyecto se partió de las partes comestibles del guaje rojo (*Leucaena esculenta*) que fueron; hojas, flores, semillas y polochocos. Las cuales se obtuvieron en Cuautla, Morelos y Puerto Escondido, Oaxaca.

#### 4.2 Acondicionamiento.

Para el acondicionamiento del material biológico se comenzó haciendo una limpieza a la muestra de forma manual. Para separar material biológico dañado y partículas extrañas.

#### 4.3.- Humedad original.

La humedad original se obtuvo colocando la muestra en charolas grandes para proceder a introducir las en una estufa de circulación forzada a una temperatura de  $55 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente de 18 a 24 horas en las cuales se pesaron las charolas con el material biológico fraccionado hasta obtener un peso constante.

#### 4.4.- Molienda fina

Se llevo a cabo una molienda en el molino Foss cyclotec con una malla de tamaño de partícula 0.5 mm con el fin de tener una harina homogénea para las determinaciones

#### 4.5.- Análisis proximal

A las cuatro partes comestibles del guaje rojo se les determinaron los siguientes parámetros bromatológicos basados en el sistema de Weende: humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, los hidratos de carbono por diferencia. Los cuales se realizaron de acuerdo a los métodos establecidos en el AOAC con ligeras modificaciones. [ 20 ]

#### 4.5.1.- Determinación de humedad en estufa con vacío

Fundamento.

Cuando se tienen muestras que a la temperatura de 100 a 110° C se dañan o descomponen, es conveniente realizar esta determinación en una estufa a presión reducida, con el fin de abatir la temperatura de ebullición del agua. Es un método de determinación directa por gravimetría, mide la diferencia de masa, al pesar la muestra después de retirada el agua mediante evaporación.

Material y reactivos.

- Balanza analítica (Sartorius Extend)
- Charolas de aluminio
- Desecador de vidrio
- Estufa con vacío (LAB LINE DUO-VAC OVEN Mod 3620)

Procedimiento.

- Se pone a peso constante en la estufa al vacío la charola de aluminio en donde se efectuará la determinación es suficiente colocarlas de 2 a 4 horas.
- Pesar en la charola de aluminio a peso constante de 2 a 5 g de muestra y distribuirla tratando de que presente la mayor superficie de evaporación e introducirla en la estufa que se encuentre entre 65 a 70° C.
- Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerán durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta peso constante.
- Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

Cálculos.

El cálculo de humedad en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

$P_i$  = Peso en gramos de la charola con muestra antes de ser secada

$P_f$  = Peso en gramos de la charola con muestra después de ser secada

$m$  = Peso en gramos de muestra

#### 4.5.2.- Determinación de cenizas.

Fundamento.

Es el producto de la eliminación del material orgánico a altas temperaturas (550°C) este residuo contiene óxidos y sales que corresponde a la parte inorgánica del material biológico.

Material.

- Balanza analítica (Sartorius Extend)
- Cisoles de porcelana tipo Gooch
- Desecador de vidrio
- Mechero Bunsen
- Mufla THERMOLYNE mod 1500
- Tripie, anillo de fierro, triangulo de porcelana o tela de asbesto

## Procedimiento.

- Poner a peso constante los crisoles en la mufla a una temperatura de 550 °C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia (sol. de cloruro férrico) que no se elimine en el proceso de incineración. Para pesar el crisol, una vez que se retira de la mufla dejarlo enfriar un poco y colocarlo en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente (aproximadamente 20 min).
- Se considera a peso constante cuando la última pesada en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.
- Pesar en el crisol a peso constante de 2 a 3 g de muestra y carbonizarla en una campana de extracción, a la flama de un mechero, hasta que no desprenda humo. Introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500 a 550 °C.
- Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras, es conveniente adicionarle unas gotitas de agua destilada a estas cenizas una vez que estén frías, con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas; lo que nos indica el punto final de esta determinación. El tiempo de permanencia es muy variable, y depende del material que se esté trabajando.

## Cálculos.

El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso en gramos del crisol con la muestra después de incinerada

Po = Peso en gramos del crisol a peso constante

m = Peso en gramos de la muestra

#### 4.5.3.- Determinación de proteína cruda.

Fundamento.

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado,

formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que

se destila recibiendo en:

a) Acido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o

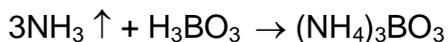
b) Acido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

A continuación se presentan las reacciones que se llevan a cabo.

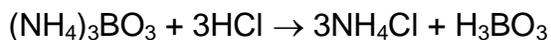
Digestión.



Destilación:



Titulación:



Material y reactivos.

- Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer .
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL
- Mezcla digestiva (a)

- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Sulfato de potasio
- Solución de hidróxido de sodio al 40 % (p/v)
- Solución de ácido bórico con indicadores (**b**)
  - Verde de bromocresol al 0.1 % en metanol
  - Rojo de metilo al 0.1 % en metanol
- Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

(a). Disolver 3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) en 20 mL de agua destilada y una vez que esté bien disuelto, agregar 50 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); a continuación adicionar con precaución 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitar por aproximadamente 30 minutos

(b). Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1 L; se adiciona agua y agitar hasta disolverlo, a continuación se adiciona 10 mL del indicador de verde de bromocresol al 0.1 % en metanol (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo al 0.1% en metanol (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

Procedimiento.

- Pesar de 10 a 100 mg de muestra y colocarla en el tubo de digestión, agregar aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio ó potasio y 3 mL de mezcla digestiva; colocar el tubo en el digestor durante de 15 minutos a una temperatura de  $340^\circ\text{C}$ .
- Retirar los tubos del digestor y dejar que se enfríen para adicionarle 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % y colocarlos en el digestor que se

encuentra a una temperatura de 370 °C. Se considera que la digestión esta realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es translucida con un ligero tono verde-azuloso. Una vez efectuada la digestión se deja enfriar.

- La titulación se realiza en el equipo KJELTEC AUTO 1030 Analyzer, se utiliza HCL 0.01 N y NaOH al 40 % y como indicador ácido bórico con indicadores verde de bromocresol y rojo de metilo.

Cálculos.

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; trabajándolo de la misma forma que las muestras.

El cálculo de Nitrógeno en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% N_2 \cdot F$$

Donde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión (6.25)

Con respecto al factor de conversión se debe aclarar que este depende de cada tipo de muestra, el cual está relacionado al contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

#### 4.5.4.- Determinación de grasa cruda.

Fundamento.

La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutricional, aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides. El método usado para esta determinación, es el método de Goldfish, el cual se basa en la extracción continua por disolvente donde a la muestra se le hace pasar vapor de disolvente y la grasa se cuantifica por grasa removida.

Material y reactivos.

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO
- Balanza analítica (Sartorius Extend)
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- Estufa con vacío (LAB LINE DUO-VAC OVEN Mod 3620)
- Éter de petróleo p. eb. 30 a 60 °C
- Vasos de borde esmerilado, LABCONCO

Procedimiento.

- Se Ponen a peso constante en la estufa blue M a 100 °C durante 2 horas vasos de borde esmerilado.
- Pesar de 2 a 5 g de muestra, colocándolos envueltos en papel dentro del tubo de celulosa tapado con algodón.

- Se coloca en el portadedal y este en el sostenedor del aparato de extracción en un vaso esmerilado con 50 mL de éter de petróleo asegurándolo con un anillo metálico, se comienza la extracción con circulación de agua, por un periodo de 4 horas aproximadamente. Para verificar la extracción de toda la grasa, se deja caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.
- Al finalizar la extracción se recupera el disolvente y el vaso esmerilado con grasa restante, se introduce a la estufa Blue M a 100 °C durante 1 hora, se deja enfriar y se pesa.

Cálculos.

Se debe de tener los pesos del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción. A esta determinación se le conoce como extracto etéreo.

El cálculo de grasa cruda en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

Po = Peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m = Peso de la muestra seca (en gramos)

#### 4.5.5.- Determinación de fibra cruda.

##### Fundamento.

Por definición de acuerdo al método Weende, la fibra cruda es la perdida por ignición, del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25% e hidróxido de sodio al 1.25% bajo condiciones bien especificadas, de una muestra previamente desengrasada.

##### Material y reactivos.

- Aparato de digestión marca LABCONCO
- Crisol de porcelana a peso constante
- Embudo buchner con malla metálica tipo California
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Mufla THERMOLYNE, Mod. 1500
- Vasos de Berzelius de 600 mL
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico
- Silicato de aluminio (limpio y calcinado)
- Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)

##### Procedimiento.

- Pesar de 3 a 5 g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio, adicionar 200 mL de  $H_2SO_4$  al 1.25% hirviendo, y unas gotas de

antiespumante y colocarlo inmediatamente en el aparato de digestión Labconco, el cual debe estar previamente caliente.

- Digerir por espacio de 30 minutos exactos. Después de dicho período vaciar el contenido sobre un buchner con malla metálica (tipo California) realizar la filtración con ayuda de vacío; lavar el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL).
- Una vez lavado el residuo transferir nuevamente al vaso Berzelius y adicionar unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25% que este hirviendo y colocar inmediatamente en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos.
- Transcurrido el tiempo filtrar en el mismo buchner california y lavar el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 mL), hasta eliminar el álcali y quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.
- El residuo se transfiere de forma cuantitativa en un crisol de porcelana (a peso constante). Colocarlo en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 a 8 horas) y después pesar.
- A continuación se carboniza y se introduce en la mufla para su incineración, para después de realizada dicha operación volver a pesar el crisol previamente enfriado en un desecador.

Cálculos.

Ya que se requiere de trabajar con muestras previamente desengrasadas, es recomendable usar la muestra a la que se le determino humedad y grasa; por lo cual el peso de la muestra será el referido a peso inicial previo de las anteriores determinaciones.

El cálculo de fibra cruda en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

Ps = Peso crisol con residuo después de secado (en gramos)

Pc = Peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = Peso de muestra sin desengrasar (en gramos) sin desengrasar

#### 4.5.6.- Hidratos de carbono por diferencia.

El porcentaje de hidratos de carbono (% HC) se obtienen por diferencia, de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\% \text{ HC} = 100 - (\% \text{ H} + \% \text{ C} + \% \text{ PC} + \% \text{ GC} + \% \text{ FC})$$

Dónde:

% H = Porcentaje de Humedad

% C = Porcentaje de Cenizas

% PC = Porcentaje de Proteína cruda

% GC = Porcentaje de Grasa cruda

% FC = Porcentaje de Fibra cruda

#### 4.6.- Digestibilidad proteínica *in vitro*

Fundamento.

Se fundamenta en que, al llevarse a cabo la digestión de las proteínas (por proteólisis) se libera al medio  $H^+$  (por la ruptura del enlace peptídico), disminuyendo así el pH. Asumiendo una correlación entre la liberación de  $H^+$  y la digestibilidad de la proteína, esta última puede evaluarse por el registro de la disminución de pH, mientras más bajo sea el pH más digerible será la proteína. La AOAC describe un método que utiliza un sistema multienzimático. Se mide el pH al final del experimento y se determina el % de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro. [ 16 ]

Material y reactivos.

- Baños de recirculación a 37°C y 55°C de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT conectados por mangueras
- Potenciómetro
- Tripsina pancreática de porcino (SIGMA – T0303)
- $\alpha$ -quimiotripsina bovina (SIGMA - C4129)
- Pepsina gástrica de porcino (SIGMA – P7000)
- Proteasa bacteriana (SIGMA – P5147)
- Solución A: Disolver 227040 BAEE unidades de Tripsina (SIGMA – T0303) (1.), 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimiotripsina (SIGMA - C4129) (2.), 2321 unidades de pepsina gástrica de porcino (SIGMA – P7000) (3.), en 10 mL de agua.
- Solución B: Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (SIGMA – P5147) (4.), en 10 mL de agua.

Donde BAEE es el sustrato N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginina etil ester.

1) Una unidad de tripsina produce un  $DA_{253}$  de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25°C, usando BAEE como sustrato. Contiene 17953 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg de tripsina} \times 227040 \text{ unidades BAEE})}{17953 \text{ Unidades BAEE}} = 12.65 \text{ mg de tripsina}$$

2) Una unidad de  $\alpha$ -quimiotripsina hidroliza 1.0  $\mu\text{mol}$  de BTEE (N-benzoil-L-Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25°C. Contiene 65.622 BAEE unidades por mg de  $\alpha$ -quimiotripsina. Por lo tanto, para disolver 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimiotripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg de } \alpha\text{-quimiotripsina} \times 1860 \text{ unidades BAEE})}{65.622 \text{ Unidades BAEE}} = 28.34 \text{ mg de } \alpha\text{-quimiotripsina}$$

3) Una unidad de pepsina libera 1.0  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -naftilamina de L-Leucina- $\beta$ -naftilamina por minuto a pH 7.1 a 37°C. Contiene 423.94 unidades por mg de pepsina. Por lo tanto para disolver 2321 unidades de pepsina L-Leucina- $\beta$ -naftilamina se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg de Pepsina} \times 2321 \text{ unidades BAEE})}{423.94 \text{ Unidades BAEE}} = 5.47 \text{ mg de tripsina}$$

4) Una unidad de proteasa hidroliza para producir color equivalente a 1.0  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto a pH a 37°C. Por lo tanto para disolver 65 unidades de proteasa bacterial, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg de Proteasa} \times 65 \text{ unidades BAEE})}{5.0 \text{ Unidades BAEE}} = 13.0 \text{ mg de proteasa}$$

Procedimiento.

- Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37 °C durante 1 hora

- A continuación se mide el pH el cual se ajusta a  $8.0 \pm 0.03$  con HCl o NaOH 0.1N según sea el caso
- Inmediatamente se le adiciona 1.0 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 minutos exactamente en agitación a una temperatura de 37 °C.
- Transcurrido el tiempo, se añade 1.0 mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 minutos a una temperatura de 55 °C.
- Al término se coloca la muestra a 37 °C durante 1 minuto y a los 20 minutos exactos de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de  $6.42 \pm 0.05$  y solo hasta que se obtiene este pH en la serie de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

Cálculos.

El cálculo de digestibilidad en términos de porcentaje es el siguiente:

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

#### 4.7.- Determinación del perfil de aminoácidos por HPLC

Fundamento.

La cuantificación de los aminoácidos de una proteína en un alimento permite realizar una evaluación predictiva de la calidad de dicha proteína en términos de cantidad y proporción de los aminoácidos indispensables que contiene.

El procedimiento más generalizado para esta determinación es la hidrólisis acida, donde las muestras son tratadas con HCL 6N, manteniéndolas bajo reflujo a 145°C por espacio de 4 horas. Después de la hidrólisis y debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, es necesaria la formación de un derivado previamente al análisis por HPLC de fase

reversa, utilizando norleucina como estándar interno. Se ha visto que los derivados formados con 6-aminoquinilil-N-hidroxisuccinimidilcabamato son estables y permiten incrementar la sensibilidad del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización pre columna, dada la relativamente menor manipulación de la muestra, durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados. Las condiciones y el procedimiento se describen a continuación. [ 41 ]

#### Material y reactivos.

- Digestor marca TECATOR, mod ab. 20/40
- Sistema CLAR (o HPLC, por sus siglas en inglés), Agilent Technology, Mod. 1100
- Horno y unidad de control de temperatura modelo 111, WATERS
- Potenciómetro marca CORNING, mod 10
- Rotavapor marca BUCHI, mod. R.
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm CORNING
- Agitador Vortex Marca LAB-LINE INSTRUMENTS
- Agua destilada y desionizada
- Metanol (Q.P)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%) INFRA
- Solución lavadora: agua-metanol (3:1; v/v) con hidroquinona al 0.01% como agente antioxidante
- HCl 6N, 0.1% fenol
- Pipetas Pasteur

- Matraces aforados de 5 mL
- Jeringas de 10 mL
- Acrodiscos de nylon, 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y de 13 mm de diámetro GELMAN
- Tubos de ensayo de 10 x 70 mm PIREX
- Agua destilada y desionizada
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM
- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil Nhidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de borates (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERSb
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Micropipeta y puntas con capacidad de 5 a 50  $\mu\text{L}$  'FINNNPIPETTE
- Micropipeta y puntas con capacidad de 50 a 200  $\mu\text{L}$  'FINNNPIPETTE
- Micropipeta y puntas con capacidad de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  'FINNNPIPETTE
- Micropipeta y puntas con capacidad de 200 a 1000  $\mu\text{L}$  'FINNNPIPETTE
- Vortex
- Parrilla de calentamiento con baño de agua a 55°C
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos H: 2.5 mM de todos los aminoácidos con excepción de cistina: 1.25, PIERCE

Procedimiento.

- Preparación del hidrolizado

Pesar dentro de un tubo de hidrólisis la cantidad finamente molida y desengrasada, adicionar la cantidad de ácido requerida, humedeciendo totalmente la muestra. Estos valores se obtienen aplicando las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{0.05 \times 100}{\% \text{ Proteína}}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\% \text{ Proteína}}$$

Donde;

A= cantidad de muestra en g

B= mL de HCl 6N

Se añaden 3 gotas de antiespumante e insufla nitrógeno, se cierra el tubo perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón

- Hidrólisis de la muestra.

Se coloca el tubo con la muestra en el digestor a  $145^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 4 horas.

- Concentrado del hidrolizado

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar y se transvasa cuantitativamente a un matraz bola de 100 mL, Se agregan 5 mL de norleucina (estándar).y se lavo el tubo con solución lavadora. El hidrolizado se concentra en el rotavapor a una temperatura de 75 a 80 °C, llevándolo a sequedad, con el fin de eliminar el exceso de HCl;

El hidrolizado concentrado se filtro a través de papel filtro (Whatman # 52) sobre un Buchner y Kitazato y con ayuda de vacío, también se realizó un lavado con 5 mL solución lavadora. Se ajustó el pH del hidrolizado a  $6.8 \pm 0.2$  con NaOH 5 N se aforó a un volumen de 25 mL

- Reconstrucción de AQC

Se precalentó la parrilla a 55°C. Una vez que todo el reactivo de derivatización AQC (vial 2ª) se encontró en la parte interior del vial, se enjuagó la punta de una micropipeta de 1000 µL y cargó con 1000 µL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B), y desechándolos para después transferir 1000 µL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstruir el reactivo de derivatización AQC. Se cerró el vial 2ª herméticamente y agito (con vortex) por 10 s. Se calentó (no más de 10 min) en la parrilla hasta la disolución del reactivo de derivatización AQC. El reactivo se almacenó en refrigeración cuando no fue utilizado, cuidando de exponerlo lo menos posible a la humedad del ambiente para evitar su degradación.

- Preparación de un estándar de aminoácidos

Se mezclaron 80 µL de la solución stock de aminoácidos (2.5mM) con 20 µL de norleucina en 0.1 mM. HCl 10 mM y 900 µL de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Mer, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM (cistina, 0.1 mM) con 0.1 mM de norleucina como estándar interno.

- Derivatización de aminoácidos.

Se depositaron en un tubo de ensayo de 4 x 50 mm, 10 µL de estándar de aminoácidos, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70 µL de buffer de boratos y se agitó el tubo en un vortex por 10 s. Finalmente se añadieron 20 µL del reactivo de derivatización ya reconstruido, vial 2ª y se agitó en el vortex durante un minuto (tiempo durante el cual se llevara a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC).

Se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a 55°C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina.

- Preparación de la fase móvil

Buffer de acetatos-acido fosfórico (Fase A), pH 5.02 ± 0.02. Se diluyeron 100 mL de concentrado A (Accq tag) hasta 1000 mL con agua purificada utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. Se hizo pasar toda la fase a través de un sistema

de filtración a vacío con un filtro de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  tipo HA. La fase preparada se almacena en refrigeración conservándose hasta por un mes, filtrándose y desgasificándose cuando no fue utilizada por más de dos días. El pH debe ser de 5.02, ajustándolo con ácido fosfórico concentrado e hidróxido de sodio 5 N, cuando fue necesario.

Acetonitrilo; agua 60:40 (Fase B)

En una probeta de 1000 mL, se vertieron 600 mL de acetonitrilo grado HPLC y se añadieron 350 mL de agua purificada. Después de que salió el aire en la probeta, se ajustó a 1000 mL con agua purificada. Se filtró y se desmasificó la fase B de la misma forma que la A pero empleando un filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  tipo GV. Se almacenó en refrigeración para conservar su composición por una semana, volviendo a filtrar y desgasificar al momento de emplearla.

- Acondicionamiento del equipo

Se encendió el equipo (computadora, bombas, desgasificador y detector, en ese orden), después de asegurar que había suficiente fase A y B para cada una de las bombas y que la columna se encontraba en la dirección correcta. El acondicionamiento del equipo se programó en la computadora como se muestra en la tabla 4.

A partir del minuto 37, el gradiente ya no tiene influencia en la separación de los derivados de los aminoácidos. A partir del minuto 64, el gradiente se diseñó para lavar la columna al finalizar cada inyección.

Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de aminoácidos derivatizada, durante la etapa de adecuación y 10  $\mu\text{L}$  de hidrolizados de aminoácidos derivatizados en el análisis de la muestra.

El orden de elución de los aminoácidos fue el siguiente; Aminoquinolina (AQC), ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina, histidina, amoníaco, arginina, treonina, alanina, prolina, cistina, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina, norleucina, fenilalanina

Tabla 4. Programa del gradiente

Tiempo	Flow Rate	% A	% B	Curve
<b>Inicial</b>	1.0	100	0	*
<b>0.5</b>	1.0	98	2	6
<b>15.0</b>	1.0	93	7	6
<b>19.0</b>	1.0	90	10	6
<b>32.0</b>	1.0	67	33	6
<b>33.0</b>	1.0	67	33	6
<b>34.0</b>	1.0	0	100	6
<b>37.0</b>	1.0	0	100	6
<b>38.0</b>	1.0	100	0	6
<b>64.0</b>	1.0	100	0	6

Cálculos.

Previamente se debe correr una solución estándar que contenga 0.2 mM de cada aminoácidos con 0.1 mM de norleucina como estándar interno, para obtener de este aminograma tanto el área de cada uno de los aminoácidos como el área de la norleucina y así poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

Del aminograma del hidrolizado, se debe calcular el área de cada uno de los aminoácidos, Para obtener el contenido en gramos del aminoácido en 100 g de proteína en la muestra, se realiza el cálculo siguiente:

$$\text{g a.a /100 g Proteína} = \frac{[A \text{ a.a} \times (1/A \text{ a.a std}) \times (\text{Conc Std}) \times \text{P.M} \times \text{Vol}_{\text{aforo}}]}{\text{pm} \times \% \text{ Proteína}} \times 10000$$

Donde:

A a.a = Área del aminoácido en la muestra

A a.a std = Área del aminoácido en el estándar

Conc Std = Concentración de aminoácidos en el estándar

P.M = peso molecular del aminoácido

pm = peso de la muestra en mg

#### 4.8.- Determinación de triptófano. Método enzimático

Fundamento.

Debido a las condiciones en las que se someten a las muestras para la preparación de los hidrolizados en la metodología anterior; siendo estas, altas temperaturas a un tiempo prolongado, el triptófano se pierde a estas condiciones, esto lleva a hacer una hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina para que esté disponible este aminoácido para su cuantificación al romper el enlace peptídico.

El método se basa en la condensación del triptófano con el p-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido. Dicho producto de condensación es tratado con solución de nitrito de sodio, produciéndose una coloración azul proporcional a la cantidad de triptófano presente en la muestra. En la figura 12. que se muestra a continuación se presenta dicha reacción. [ 35 ]

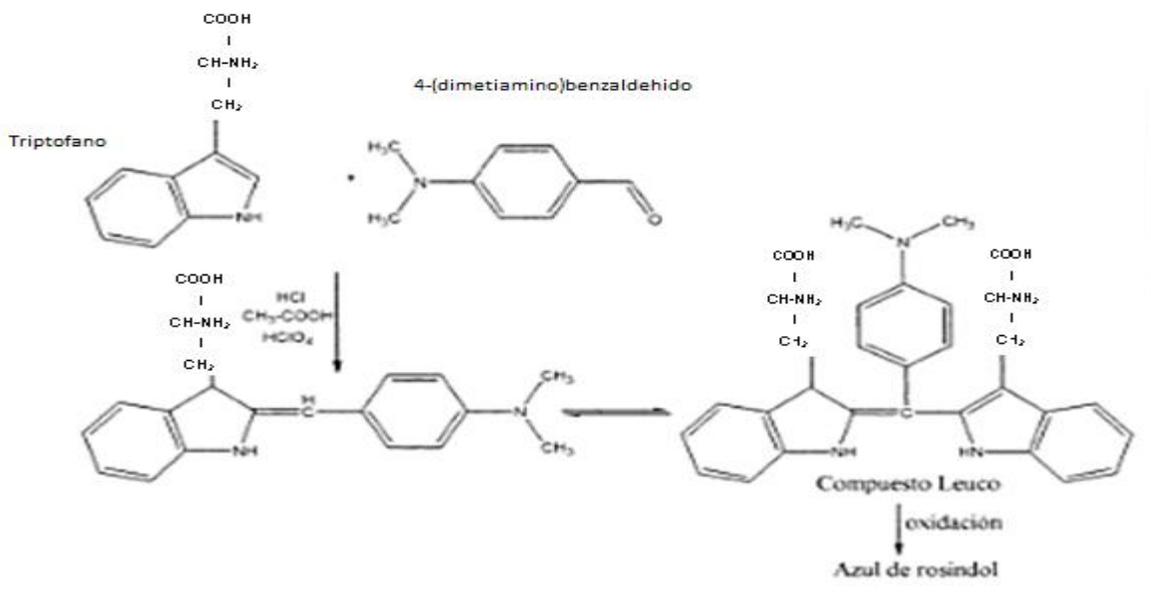


Figura 12. Reacción química para el desarrollo de color del triptófano con p-dimetilaminobenzaldehído

## Materiales, equipo y reactivos.

- Incubadora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Matraz aforado de 500 mL
- Matraz aforado de 200 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Termómetros de  $-20$  a  $110^\circ\text{C}$
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- Potenciómetro Corning
- Tapón de hule del # 1
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensaye
- Vortex
- Cronometro digital
- Buffer de fosfatos de  $\text{pH } 8.00 \pm 0.05$
- Solución A: Pesar 2.78 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck No. 3646) y aforar a 100 mL
- Solución B: Pesar 35.81 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck No 206579) y aforar a 500 mL. Se toman 5.3 mL de la solución A y 94.7 mL de la solución B y se llevan a un volumen de aproximadamente 185 mL, se coloca en un potenciómetro para medir el pH, que debe ser de  $8.00 \pm 0.05$ , ajustando con unas gotas de solución A o B y finalmente se afora a 200 mL con agua destilada
- Acido Clorhídrico 0.1N
- NaOH 0.1N

- Pepsina 0.3%: se pesan  $300 \pm 1$  mg de pepsina (Sigma P-700) y se aforan a 100 mL con HCl 0.1N
- Pancreatina 0.4%: se pesan  $400 \pm 1$  mg de pancreatina (Sigma P-1500) y se aforan a 100 mL con buffer de fosfatos pH 8.00.
- Solución estándar de triptófano (50  $\mu$ g/mL): Se prepara una solución stock de  $50 \pm 0.5$  mg de triptófano (fluka No 93659) y se afora a 100 mL con agua destilada y de esta solución stock se realiza una dilución 1:10 para tener la solución deseada
- Acido Clorhídrico 11N: Se tiene que partir de HCl concentrado tomando en cuenta la pureza y la densidad, para medir un volumen del acido concentrado y llevar con agua destilada al volumen necesario.
- DMAB 0.5%: Pesar 0.5 g de p-dimetilamino-benzaldehido (Merck No3058) y disolverlos con HCl 11N, aforar a 100 mL con el mismo acido concentrado
- NaNO<sub>2</sub> 0.2%: Pesar 0.2 g de nitrito de sodio cristalino (Sigma S-2252) y se lleva a 100 mL con agua destilada.

#### Procedimiento.

- Pesar 0.25 g de proteína de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, adicionar 10 mL de pepsina cerrándolo con el tapón de hule y colocarlo en el baño de agua a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con agitación por 3 horas.
- Retirar del baño el matraz, se adiciona 10 mL de NaOH 0.1N agitando suavemente, posteriormente añadir 10 mL de solución de pancreatina, cerrar con el tapón de hule y dejar con agitación (3.0) por espacio de 24 horas en el baño de agua a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Sacar el matraz del baño, se trasvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL y se afora con agua destilada, se filtra a través de papel filtro de poro cerrado (Whatman # 5 o equivalente)
- Tomar tres alícuotas de 2 mL cada una, se colocan en tubos de ensaye, uno será el blanco de la muestra y a este se le adiciona 7.5 mL de HCl 11N,

a los otros dos se les agrega 7.5 mL de DMAB, se agitan con cuidado utilizando el vortex y se deja en reposo 15 minutos en la oscuridad

- Transcurrido el tiempo se le adiciona a cada uno de los tubos 0.5 mL de  $\text{NaNO}_2$  se agitan con mucha precaución y se dejan otros 5 minutos en reposo en la oscuridad
- Pasado el tiempo anterior, leer la absorbancia a 590 nm, usando el tubo del blanco de la muestra para ajustar a cero de absorbancia.

NOTA: Es necesario realizar un blanco de reactivos, usando gelatina (Difco o grado Farmacopea) como proteína de referencia y una vez calculada la cantidad de triptófano presente, restárselos a la muestra ensayada. Considerando que en promedio la gelatina tiene 93.75% de proteína, poner 0.27 g de muestra.

Elaboración de la curva estándar:

Para poder calcular la concentración de triptófano en la muestra, es necesario correr a la vez una curva de calibración, la cual debe cumplir la ley de Lambert y Beer para poder interpolar las lecturas de las muestras y a continuación en la tabla 5, se describe, la cual va de 0 a 100  $\mu\text{g}$  de triptófano.

Tabla 5. Relación de los reactivos para la curva estándar de triptófano.

Sol Estándar de triptófano (mL)	H <sub>2</sub> O Destilada (mL)	DMAB 0.5% (mL)	NaNO <sub>2</sub> 0.2% (mL)
0.0	2.0	7.5	0.5
0.2	1.8	7.5	0.5
0.4	1.6	7.5	0.5
0.8	1.2	7.5	0.5
1.2	0.8	7.5	0.5
1.6	0.4	7.5	0.5
2.0	0.0	7.5	0.5

Después de adicionar el DMAB se agita con vortex con mucha precaución y se deja en oscuridad durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se adiciona el  $\text{NaNO}_2$  0.2% agitar con cuidado y dejar en reposo otros 15 minutos en la oscuridad. Leer

la absorbancia de los tubos de la curva a 590 nm, usando el tubo del blanco (0.0 mL de estándar) para ajustar a cero de absorbancia.

Cálculos.

Los tubos de la muestra una vez ajustado el cero con el blanco respectivo, la lectura obtenida se interpola en la curva estándar para obtener la cantidad de triptófano en la alícuota (CM) y a esta, se le debe restar el valor obtenido para el blanco de reactivos (valor promedio de la gelatina CG). A continuación se describe la siguiente fórmula para calcular la concentración de triptófano en la muestra, expresada en g de triptófano/100 g de proteína.

$$\text{g Trip100 g proteína} = \frac{[(\text{CM} - \text{CG}) \times \text{A}]}{(\text{M} \times \text{a} \times \% \text{P} \times 100)}$$

Donde:

CM= Cantidad de triptófano en la alícuota de la muestra

CG= Cantidad de triptófano en la alícuota del blanco de reactivos (gelatina)

A= Aforo del hidrolizado

M= Cantidad de muestra expresada en gramos

a= Alícuota del hidrolizado para desarrollar color

%P= Porcentaje de proteína de la muestra

#### 4.9.- Calificación química

La Calificación Química se basa en las necesidades de aminoácidos de los humanos para evaluar la calidad proteínica, este parámetro químico de evaluación predictivo de la calidad nutritiva de una proteína se obtiene por comparación del perfil de aminoácidos de un alimento específico contra un perfil de referencia (leche materna humana); así el valor más bajo en dicha comparación, indica el

porcentaje del requerimiento de un aminoácido y por consiguiente esto se denomina como aminoácido limitante de la proteína en evaluación. Este método tiene como ventaja la sencillez al identificar el aminoácido limitante (lo cual no es posible en un bioensayo) y el diseño de las mezclas de proteínas complementarias para obtener una mayor calidad. [ 4 ]

Esta relación está determinada de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{C.Q} = [(\text{mg de a.á /g de proteína a evaluar}) / \text{mg de a.á en la proteína de referencia}] \times 100$$

En donde la cantidad en mg de aminoácido de referencia para niños de 2 a 5 años se muestra en la tabla 2.

#### 4.10.- Agentes tóxicos y factores antinutricionales.

Se presentan las metodologías analíticas para la determinación de mimosina, lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina respectivamente, siendo la primera la más importante debido a la especie biológica estudiada.

##### 4.10.1.- Método colorimétrico para la determinación de mimosina.

Fundamento.

Se basa en la reacción de la mimosina con cloruro férrico en medio ácido, midiendo la coloración resultante en un espectrofotómetro a 535 nm e interpolando en una curva de calibración estándar de mimosina. [ 28 ]

## Materiales, equipo y reactivos.

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Matraz aforado de 25 mL
- Matraz aforado Kitazato de 125 mL
- Espátula
- Vasos de precipitado de 123 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENTS
- Crisol de filtración
- Espectrofotómetro a 535 nm
- Baño a temperatura controlada 80°C LAB-LINE
- Solución de mimosina 0.1% en HCl 0.1N (L-Mimosine M-0253 from koa hoale sedes)
- Solución de cloruro férrico al 0.5% en HCl 0.1N
- Acido Clorhídrico 0.1N
- Carbón activado granulado
- Agua desionizada

## Procedimiento.

### Curva de calibración.

- Pesar exactamente 25.5 mg de estándar de L-Mimosine de (koa hoale) de Sigma-Aldrich con numero de catalogo M0253 y aforar a 25 mL con HCl 0.1N, a partir de la solución concentrada preparar las siguientes soluciones de los estándares, ajustar el pH  $2.00 \pm 0.5$  de cada una de ellas, antes de aforar a 25 mL con agua desionizada.

Tabla 6. Relación de reactivos para determinación de la curva estándar de mimosina.

mL de solución concentrada	HCl 0.1N (mL)	FeCl <sub>3</sub> al 0.5% en HCl 0.1N(mL)	Carbón activado (mg)
0.00	2.5	1	30
0.25	2.5	1	30
0.50	2.5	1	30
0.75	2.5	1	30
1.00	2.5	1	30
1.25	2.5	1	30
1.50	2.5	1	30
1.75	2.5	1	30

#### Extracción.

- Pesar 1.25 g de muestra seca de inflorescencias, renuevos foliares y polochocos, en el caso de semilla seca pesar de 0.2 a 0.5 g de Leucaena, depositarlo en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, adicionar 25 mL de HCl 0.1N, agitar en un baño de temperatura controlada a 80°C durante una hora, transcurrido el tiempo se deja en reposo esperando la disminución de temperatura hasta que se pueda soportar en el cachete, aproximadamente 35 °C

#### Clarificación.

- Transferir 10 mL del sobrenadante a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 30 mg de carbón activado (granulado) y adicionar 15 mL de agua desionizada, dejar en el baño con agitación a temperatura de 80°C por un espacio de 15 minutos, transcurrido el tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente, se filtra utilizando crisoles de filtración de poro grueso empleando vacío, en el caso de formarse espuma se puede utilizar dos gotas de antiespumante. Se realizan tres lavados de 5 mL con HCl 0.1N posteriormente transferirlo a un matraz aforado de 50 mL y aforar con HCl 0.1N.

Determinación colorimétrica.

- Con pipeta tome alícuotas de 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 mL del filtrado y deposite cada uno de los volúmenes en un matraz aforado de 25 mL y adicione 2.5 mL de HCl 0.1N y 1 mL de cloruro férrico al 0.5% en HCl 0.1N, el pH  $2.0 \pm 0.5$ . Llegar al volumen de aforo con agua desionizada, medir en el espectrofotómetro a 535 nm

Cálculos.

Se parte de cierta cantidad de muestra (g), y se consideran los aforos y alícuotas que se realizaron, por ejemplo:

$$\frac{1 \text{ g Muestra}}{25 \text{ mL HCl}} \times \frac{10 \text{ mL alic}}{50 \text{ mL aforo}} \times \frac{2 \text{ mL alic}}{25 \text{ mL aforo}} \times 3.5 \text{ mL HCl FeCl}_3 = 6.4 E - 4 \text{ g/mL}$$

En seguida se hace una regresión lineal con los datos de la curva de calibración de mimosina, graficando ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs % Abs, obteniendo:

$Y = mx + b$  De donde "x" es el valor de la absorbancia en la muestra y se obtienen unidades de ( $\mu\text{g/mL}$ )

Ya con el dato de la muestra con las alícuotas y el de la interpolación, se tiene la siguiente relación para obtener el % de mimosina en la muestra:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{mL HCl}} \times \frac{1 \text{ g}}{1 E6 \mu\text{g}} \times \frac{\text{mL HCl}}{6.4 E - 4 \text{ g/mL}} \times 100 = \% \text{ Mimosina}$$

Para obtener los g de mimosina en la muestra, simplemente hay que dividir entre 100.

$\% \text{ Mimosina} / 100 = \text{g Mimosina en la muestra.}$

#### 4.10.2.- Determinación de lectinas.

##### Fundamento.

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

El método de micro titulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

[ 47 ]

##### Material y reactivos.

- Centrífuga (Dynac).
- Incubadora bacteriológica (BLUE M).
- Espectrofotómetro (COLEMAN, Junior II-A)
- Balanza analítica (Sartorius Extend).
- Tubos de vidrio para centrifuga 15 mL con graduación.
- Parrilla de agitación (Wisestir).
- Matraces Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Embudo de filtración de tallo corto.
- Filtros de vidrio de poro grueso.
- Gasa.
- Pipetas graduadas de 0.5 y 2 mL.
- Jeringas (BDPlastipack® 5 a 10 mL, calibre 22).

- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Placas de microdilución tipo “V”
- Solución salina al 0.9 % preparado con agua desionizada.
- Solución salina al 1 % preparado con agua desionizada.
- Sangre de hámster joven-adulto Sirio macho, desfibrinada y lavada.
- Solución anticoagulante. **(a)**
- Proteasa de (***Bacillus polymyx***) al 0.2 % en solución salina 0.9 % (Sigma P-5647).
- Solución de lectinas purificada de frijol red kidney bean (***Phaseolus vulgaris***) (PHT) (SIGMA L-8754) **(b)**
- Extracto de frijol peruano (prepararlo como extracto de muestra).
  - a) Solución anticoagulante: cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede usar heparina (solución de heparina: sangre = 15 a 20 UI: 1 mL de sangre). Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración, se debe usar solución ALSEVER (glucosa 0.6833 g, citrato de sodio 0.8080 g, ácido cítrico 0.0550 g, cloruro de sodio 0.4200 g, agua destilada 100 mL).
  - b) Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina (SIGMA L8754) y pasarla a un matraz aforado de 10 mL, aforar con solución salina 0.9 %. de esta solución, se realiza una dilución 1: 100 para ocuparla en la placa de microdilución tipo “V”, con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación.

Procedimiento.

Preparación del extracto.

- Pesar 0.1 g de muestra finamente molida y desengrasada (menor 5 %), suspender en 10 mL de solución salina 1 % y efectuar extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente.
- Posteriormente se centrifuga el extracto a 1500 rpm durante 10 minutos, se elimina el residuo insoluble y el sobrenadante se filtra a través de un filtro de vidrio de poro grueso. Finalmente se afora a 10 mL con solución salina 1%.

Preparación de la sangre.

- En un matraz de 25 mL con anticoagulante (0.1 mL de heparina de 5000 UI/5 mL de sangre), obtener 30 a 50 gotas de sangre de hámster (técnica realiza por punción ocular). Agitar suavemente para lograr la homogeneización.
- La sangre con anticoagulante se transfiere a tubos de centrifuga para su lavado (3 veces) con solución salina 0.9 %. Se centrifuga a 1500 rpm, 10 minutos decantar el líquido sobrenadante.
- Al terminar el tercer lavado, quedando el paquete de eritrocitos en el fondo, a este paquete se le agregó 24 mL de solución salina 0.9 %, por cada 1 mL de glóbulos rojos (suspensión al 4 %). En caso de la presencia de coágulos, filtrar a través de una gasa.

Sensibilización de glóbulos rojos.

- A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % de eritrocitos, se agrega 1 mL de solución de proteasa al 0.2 %. Se incuban 1 hora 37 °C.

- Posteriormente se distribuye en tubos graduados para centrífuga, se centrifugan a 1500 rpm, 10 minutos. Finalmente se realizan 3 lavados con solución salina, para eliminar la enzima.
- Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se re suspende al 4 %. Por lo que, por cada mL del paquete se añade 24 mL de solución salina 0.9 %, filtrar a través de una gasa y colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.

#### Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

- Se ajusta el espectrofotómetro al 100 % de Transmitancia (T) con solución salina 0.9 % a una longitud de onda de 620 nm.
- Para ajustar la suspensión de eritrocitos (procurando que esté lo más homogénea posible), se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica, colocar en una celda y adicionar 2 mL de solución salina 0.9 %, homogeneizar e introducir al espectrofotómetro. Se diluye lo necesario, hasta obtener una lectura de  $26 \pm 1$  % T.

#### Microtitulación.

- Se realiza en placas tipo "V", en cada pozo se colocan 100  $\mu$ L de solución salina 0.9 %.
- Con un microdilutor se toman 50  $\mu$ L de extracto obtenido o del estándar de faseolotoxina y se realizan diluciones (desde el primer pozo, siguiendo la hilera horizontal), eliminando el residuo de la última dilución.
- Una hilera control negativo (sin muestra) un control positivo (50  $\mu$ L extracto de referencia) y las hileras restantes de la muestra.

- Realizadas las diluciones se agregan una vez con el pipeteador de gota 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados (cada que se adiciona, se homogeneiza suavemente la suspensión).
- Las placas se rotan en forma circular e incuban 1 hora a 37 °C. La lectura de las placas se lleva a cabo en el dispositivo de lectura. Se reporta la máxima dilución que presenta aglutinación.

Cálculos.

A continuación, se explica la definición de las unidades del método las cuales se definieron como unidades de hemaglutinación por gramo de muestra (UHG/g muestra). La solución estándar de lectinas (faseolotoxina) tiene una concentración de 0.001  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 50  $\mu\text{L}$ , entonces se tiene una concentración de 0.05  $\mu\text{g}$  de faseolotoxina en dicho volumen. En una dilución seriada, se tiene la siguiente fórmula:

$$L = 2 \times e / 3^t$$

Dónde:

L= mínima aglutinación para producir una prueba positiva.

e= concentración del extracto

t = título de la aglutinación.

Por ejemplo, si la solución estándar de lectinas tiene un valor promedio de 2 para el título de aglutinación, entonces, en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$2 \times 0.05 \mu\text{g} / 3^2 = 0.011 \mu\text{g} = 0.000011 \text{ mg de faseolotoxina}$$

El cálculo para la muestra es el siguiente:

La concentración del extracto de la muestra es de 70 mg/mL (0.1 g de muestra en 10 mL de sol. salina 1 %), por lo tanto, en 50 µL tenemos 0.5 mg. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para un título de aglutinación con valor de 3, se tiene la siguiente concentración:

$$2 \times 0.5 \text{ mg} / 3^3 = 0.037 \text{ mg de muestra} = 0.000037 \text{ g muestra}$$

Por definición: 1 mg del estándar de lectinas (faseolotoxina) es equivalente a 1 Unidad de Hemaglutinación (UHG). El resultado se reporta como Unidades de Hemaglutinación por g de muestra (UH/g de muestra).

$$\frac{0.000011 \text{ mg faseolotoxina}}{0.000037 \text{ g de muestra}} \times \frac{1 \text{ UHG}}{1 \text{ mg de faseolotoxina}} = 0.30 \frac{\text{UHG}}{\text{g de muestra}}$$

#### 4.10.3.- Determinación de saponinas

Fundamento.

La detección de saponinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de sangre humana.

El método de microtitulación es rápido y requiere de una mínima cantidad de muestra. Se necesita sensibilizar los glóbulos rojos lavados con una solución de tripsina, ya que la sensibilidad de los eritrocitos se mejora considerablemente con este tratamiento. [ 43 ]

Material y Reactivos.

- Aparato de extracción Goldfish LABCONCO.
- Cartuchos de celulosa 22 x 80 mm.
- Rotavapor Büchi 461, mod. RE-111.

- Centrífuga (Dynac).
- Incubadora bacteriológica (BLUE M).
- Espectrofotómetro (COLEMAN, Junior II-A)
- Balanza analítica (Sartorius Extend).
- Tubos de vidrio para centrifuga 15 mL con graduación.
- Parrilla de agitación (Wisestir).
- Matraces Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Embudo de filtración de tallo corto.
- Filtros de vidrio de poro grueso.
- Gasa.
- Pipetas graduadas de 0.5 y 2 mL.
- Jeringas (BDPlastipack® de 5 a 10 mL, calibre 22).
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Placas de microdilución tipo "U"
- Solución salina al 0.9 % preparado con agua desionizada.
- Solución salina al 1 % preparado con agua desionizada.
- Solución de metanol (RA): agua al 85:15 (v/v).
- Sangre de conejo macho raza Nueva Zelanda desfibrinada y lavada.
- Solución anticoagulante. **(a)**
- Tripsina de páncreas bovino (Sigma T-8128 Tipo II). **(b)**
- Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina. **(c)**
- Solución anticoagulante: cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede usar heparina (solución de heparina: sangre = 15 a 20 UI: 1 mL de sangre). Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración, se debe usar como solución ALSEVER (glucosa 0.6833 g, citrato de sodio 0.8080 g, ácido cítrico 0.0550 g, cloruro de sodio 0.4200 g, agua destilada 100 mL), para conservar las células.
- Tripsina de páncreas bovino (Sigma T-8128 Tipo II) al 0.1 % en solución salina 0.9 %.

- Solución estándar de saponinas: el estándar es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina esteroideal) y un extracto de quijalla (saponina tipo triterpenoide), al 0.5 % en solución salina 0.9 %.

Procedimiento.

Preparación del extracto.

- Pesar 3.5 g de muestra finamente molida y desengrasada (menor 5 % de grasa), se coloca un cartucho de celulosa dentro de un porta dedales del extractor de Goldfish, se realiza la extracción durante 2 horas con 50 mL de metanol: agua (85:15).
- Se concentra a sequedad en rotavapor Büchi a 65 °C, la muestra se re-dissuelve con solución salina 0.9 %, se filtra y afora a 50 mL con la misma solución. El extracto puede ser guardado en refrigeración, con una duración de 2 semanas y/o en congelación con una duración de 1 mes aproximadamente.

Preparación de la sangre.

- En un matraz de 25 mL con anticoagulante (0.1 mL de heparina de 5000 UI/5mL de sangre), obtener de 5 a 10 mL de sangre humana. Agitar suavemente para lograr la homogeneización.
- La sangre con anticoagulante se transfiere a tubos de centrifuga para su lavado (3 veces) con solución salina 0.9 %. Se centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos decantar el líquido sobrenadante.
- Al terminar el tercer lavado, quedando el paquete de eritrocitos en el fondo, a este paquete se le agregó 24 mL de solución salina 0.9 %, por cada 1 mL de paquete de glóbulos rojos (suspensión 4 %). En caso de la presencia de coágulos, filtrar a través de una gasa.

### Sensibilización de glóbulos rojos.

- A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4 % de eritrocitos, se agrega 1 mL de solución de tripsina 0.1 %. Se incubaron 1 hora 37 °C.
- Posteriormente se distribuye en tubos graduados para centrífuga, se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con solución salina, para eliminar la enzima.
- Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se re suspende al 5 %. Por lo que, por cada mL de paquete se añade 19 mL de solución salina 0.9 %, filtrar a través de una gasa y colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.

### Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos.

- Se ajusta el espectrofotómetro al 100 % de Transmitancia (T) con solución salina 0.9 % a una longitud de onda de 620 nm.
- Para ajustar la suspensión de eritrocitos (procurando que este lo más homogénea posible), se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica, colocarlas en una celda y adicionar 2 mL de solución salina 0.9 %, homogeneizar e introducir al espectrofotómetro. Se diluye lo necesario, hasta obtener una lectura de 24 a 29 % T.

### Microtitulación.

- Se realiza en placas tipo "U", en cada pozo se colocan 50  $\mu$ L de solución salina 0.9 %.
- Con un microdilutor se toman 50  $\mu$ L de extracto realizando o del estándar de saponinas y se realizan diluciones (desde el primer pozo, siguiendo la hilera horizontal), eliminando el residuo de la última dilución o ultimo pozo de la hilera

- Una hilera control negativo (sin muestra) un control positivo (50 µL extracto de referencia) y las hileras restantes de la muestra. Realizadas las diluciones se agregan con el pipeteador de gota 50 µL de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados.
- Las placas se rotan en forma circular e incuban 1 hora a 37 °C. La lectura de las placas se lleva a cabo en el dispositivo de lectura. Se reporta la máxima dilución que presentó hemólisis.

Cálculos.

A continuación, se explica la definición de las unidades del método las cuales se definieron como unidades hemolíticas por mg de muestra (UH/mg muestra). La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroideal (1:1) tiene una concentración de 0.5 % en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.05 mL, entonces se tiene una concentración de 0.25 mg de saponina en dicho volumen. En una dilución seriada, se tiene la siguiente fórmula:

Concentración del extracto /2<sup>t</sup>

Dónde:

t = título de la hemólisis.

Por ejemplo, si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el título de hemólisis, entonces, en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$0.25 \text{ mg} / 2^8 = 0.001 \text{ mg} = 1 \text{ } \mu\text{g} \text{ de saponinas}$$

El cálculo para la muestra es el siguiente:

La concentración del extracto de la muestra es de 70 mg/mL (3.5 g de muestra en 50 mL de etanol), por lo tanto, en 0.05 mL tenemos 3.5 mg. A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para un título de hemólisis con valor de 1, se tiene la siguiente concentración:

$$3.5 \text{ mg} / 2^1 = 1.75 \text{ mg de muestra}$$

Por definición: 1  $\mu\text{g}$  del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (UH). El resultado se reporta como Unidades Hemolíticas por mg de muestra (UH/mg de muestra).

$$\frac{1 \mu\text{g de saponinas}}{1.75 \text{ mg de muestra}} \times \frac{10 \text{ UH}}{1 \mu\text{g de estándar saponinas}} = 5.71 \frac{\text{UH}}{\text{mg de muestra}}$$

#### 4.10.4.- Determinación de inhibidores de tripsina

Fundamento.

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01 N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40  $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ ), y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un substrato sintético (BAPNA), el cual producirá una coloración que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. [ 22 ]

## Material y reactivos.

- Baño de agua con control de temperatura y agitación
- Potenciómetro
- Parrilla con agitación magnética
- Espectrofotómetro
- Mezclador de tubos Vortex
- Hidróxido de sodio 0.01 N
- Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2, 0.05 M (a)
- Solución BAPNA (b)
- Ácido acético al 30 %
- Solución estándar de tripsina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (c)
- Ácido clorhídrico 0.001 N

(a) Pesar 6.05 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P.M. 121.14) y 2.94 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , disolver en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a un volumen de 1 L.

(b) Pesar 100 mg de  $\alpha$ -N Benzoil- DL-arginina -p-nitroanilida-HCl (BAPNA), disolver en 2.5 mL de dimetilsulfóxido y aforar a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C.

ESTA SOLUCION DEBE SER PREPARADA EL MISMO DIA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.

(c) Pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y disolver en 200 mL de ácido clorhídrico 0.001N.

Procedimiento.

Preparación del extracto.

- Pesar 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (<5 % de grasa) en un vaso de precipitado y adicionar 45 mL de hidróxido de sodio 0.01N, a esta suspensión ajustar el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y aforar con agua a 50 mL.
- Transvasar a un vaso que contenga un agitador magnético, para agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de este tiempo se retira el agitador magnético y deja ½ hora en reposo, por simple decantación se separa el sobrenadante eliminando el residuo insoluble.
- El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60%; este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Determinación de la actividad.

- Pipetear porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL de extracto directo o diluido en tubos de ensaye por duplicado y ajustado el volumen a 2.0 mL con agua destilada, Introducir en el baño de agua a 37° C. Adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina a 37° C e incubar por de 10 minutos.
- A continuación se adicionar 5 mL de solución de BAPNA a 37° C a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos con cronometro. Detener la reacción enzimática por la adición de 1 mL de ácido acético al 30 %; el cual debe homogeneizarse inmediatamente.
- Cuando por la adición del ácido acético al tubo de reacción se enturbie o forme un precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman # 1); para ello es conveniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos para después filtrar primeramente el sobrenadante y por último se filtra la porción del precipitado gelatinoso. Es necesario cerciorarse que el filtrado este transparente, si no se deberá centrifugar el filtrado.

A continuación se presenta la tabla 7 que muestra en forma esquemática, la serie de tubos que se deben preparar para determinar la actividad inhibitoria de la muestra.

Tabla 7. Relación de los tubos y volúmenes para determinar la actividad inhibitoria

CLAVE	Vol. de extracto (mL)	Vol. de H <sub>2</sub> O (mL)	Vol. de Std. Tripsina (mL)	Vol. de Ac. acético al 30% (mL)	10 min	Vol. de BAPNA a 37° C (mL)	10 min	Vol. de Ac. acético al 30% (mL)
<b>Bco.1</b>	1.8	0.2	2	1		5		-
<b>1</b>	1.8	0.2	2	-		5		1
<b>Bco.2</b>	1.4	0.6	2	1		5		-
<b>2</b>	1.4	0.6	2	-		5		1
<b>Bco.3</b>	1.0	1.0	2	1		5		-
<b>3</b>	1.0	1.0	2	-		5		1
<b>Bco.4</b>	0.6	1.4	2	1		5		-
<b>4</b>	0.6	1.4	2	-		5		1
<b>Bco. R</b>	0	2	2	1		5		-
<b>R</b>	0	2	2	-		5		1

Nota: Cuando se trabaja con el extracto directo, es común que se arrastren coloraciones indeseables que pueden interferir en la determinación; por lo que se considera conveniente tomar una alícuota más de cada una de las porciones, las cuales servirán como sus respectivos blancos. A estos tubos, una vez adicionados los 2 mL de solución de tripsina, inmediatamente después se les adiciona 1.0 mL de ácido acético al 30% y por último los 5.0 mL de solución de BAPNA, en estos tubos no es necesario llevar un control de tiempo.

- Realizar la lectura en el espectrofotómetro a 410 nm para cada una de las alícuotas del extracto, primero ajustar el equipo a 0.000 de absorbancia (100%T) con su respectivo blanco. Hay que recordar que el tubo con 0.0 mL de extracto es la referencia (40 µg de tripsina / 10 mL), sobre el cual se basarán los cálculos.

Cálculos.

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia (A) a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción. Así la lectura de absorbancia (A) se puede pasar directamente a U.T.

(U.T. = A x 100).

Debido a que se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tendrían entonces una serie de valores de U.T., estos valores deben ser restados al valor de referencia (0.0 mL de extracto, 40 µg tripsina/100 mL) para así obtener el valor de unidades de tripsina inhibida (U.T.I). Después calcular el valor de U.T.I./mL a partir del volumen de extracto utilizado para la serie (0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL), calcular el promedio de U.T.I./mL. Finalmente la actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I./g de muestra, tomando en cuenta el volumen inicial de extracto, las diluciones realizadas y el peso de la muestra.

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

Dónde:

B = valor promedio de U.T.I./mL

F = factor de dilución, cuando se trabaja con el extracto directo F= 1

50 mL = del primer aforo realizado con NaOH 0.01N

1000 mg = 1 g de muestra que se peso para preparar el extracto.

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez contando con la harina homogénea de las 4 muestras, se realizó su análisis tal y como se muestra en el diagrama general de trabajo. Cabe mencionar que las muestras no fueron sometidas a ningún tratamiento térmico antes de realizar cualquier metodología empleada.

A continuación se muestra en la tabla 8, los promedios de la humedad original, de las partes comestibles del guaje rojo.

Tabla 8. Humedad original de las partes comestibles del guaje rojo (g/100g de muestra)

Determinación	Renuevos foliares	Inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>Humedad original</b>	89.78 ± 0.31	72.19 ± 0.82	54.49 ± 0.60	76.83 ± 2.08

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

Como se observa en la tabla 8 existe una importante variación en el contenido de humedad entre las muestras, el cual va de 54.49 en semillas hasta casi el 90 % en los renuevos foliares que es el más alto, por otra parte las inflorescencias y los polochocos presentan alrededor de 75%, siendo las semillas las que menos agua presentan con un 55%. Este contenido de humedad representa la cantidad de agua que tiene cada muestra en fresco o como se consume habitualmente. El objetivo de realizar la determinación de humedad original es conservar y estabilizar la muestra y llevando un control de pesos de material secado se obtiene la humedad original, que se podrá usar para reportar los resultados de esta forma.

A continuación, en la tabla 9, se presentan los resultados obtenidos de las harinas de las cuatro partes analizadas del guaje rojo, en estos resultados se obtuvo un coeficiente de variación menor al 5% que es lo recomendable.

Tabla 9. Composición bromatológica de las harinas de partes comestibles del guaje rojo (g/100g de muestra)

Determinación	Renuevos foliares	Inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>Humedad</b>	6.51 ± 0.07	9.18 ± 0.17	6.59 ± 0.09	9.18 ± 0.17
<b>Cenizas</b>	6.67 ± 0.06	5.44 ± 0.06	4.77 ± 0.07	6.99 ± 0.06
<b>Proteína cruda</b>	19.76 ± 0.30	28.07 ± 0.25	32.39 ± 0.61	23.48 ± 1.26
<b>Grasa cruda</b>	1.73 ± 0.06	1.11 ± 0.02	1.51 ± 0.04	0.68 ± 0.02
<b>Fibra cruda</b>	18.8 ± 1.16	13.34 ± 0.69	14.5 ± 0.92	19.26 ± 0.60
<b>Hidratos de carbono<sup>a</sup></b>	46.53	42.86	40.24	40.41

<sup>a</sup> = Los carbohidratos se calcularon por diferencia

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

En cuanto a los parámetros que se determinan en el análisis bromatológico es importante mencionar que no existe información bibliográfica que hable de la composición bromatológica de esta variedad de las partes comestibles de guaje rojo (*L. esculenta subsp. esculenta*) por lo tanto no hay referencia de comparación.

El componente mayoritario determinado por diferencia en el análisis proximal fueron los hidratos de carbono seguido de las proteína cruda, posteriormente la fibra y en cantidades similares la humedad y las cenizas, el componente minoritario es la grasa todo esto aplica para las muestras analizadas.

La tabla 10 presenta los resultados en base seca obtenidos del análisis proximal, ya que esta es la forma más adecuada de hacer una comparación y un análisis estadístico. Por ello se realizó la prueba de varianza ANOVA de una sola vía al 95% de confianza, acoplado a la prueba de rangos múltiples de medias de acuerdo a Duncan, con el programa estadístico STATGRAPHICS ver 14.0, los cuales se muestran a continuación

Tabla 10. Composición bromatológica del guaje rojo en base seca. (g /100g de muestra)

Determinación	Renuevos foliares	Inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>Cenizas</b>	7.13 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.07 <sup>c</sup>	5.10 ± 0.07 <sup>d</sup>	7.70 ± 0.07 <sup>a</sup>
<b>Proteína cruda</b>	21.13 ± 0.32 <sup>d</sup>	30.09 ± 0.26 <sup>b</sup>	34.63 ± 0.66 <sup>a</sup>	25.85 ± 1.39 <sup>c</sup>
<b>Grasa cruda</b>	1.85 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.61 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>d</sup>
<b>Fibra cruda</b>	20.10 ± 1.24 <sup>b</sup>	13.60 ± 0.74 <sup>c</sup>	15.51 ± 0.98 <sup>c</sup>	23.41 ± 2.10 <sup>a</sup>
<b>Hidratos de carbono</b>	49.79	47.20	43.09	44.50

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3). Letra diferente dentro de la hilera indica diferencia significativa ( $\alpha= 0.05$ )

Con base a los resultados del análisis estadístico, se puede observar en la tabla 10 que existe una diferencia estadísticamente significativa en las determinaciones de proteína cruda para las cuatro muestras, siendo este nutriente el de mayor relevancia en este estudio ya que se ha reportado que es una excelente fuente de proteína (> 25%), de las muestras analizadas las semillas presentan el valor más alto (34%), seguido de las inflorescencias, los polochocos y por último los renuevos foliares; en la determinación de grasa cruda, también se presenta diferencia significativa, siendo el mayor las renuevos foliares; en cuanto a fibra cruda las muestras de flores y semillas no presentan diferencia significativa entre ellas, siendo estos los valores más bajos, pero si hay diferencia entre polochocos y hojas. El contenido de cenizas en las muestras analizadas presenta para todos los casos diferencia significativa teniendo un porcentaje entre 5 y 7%, además se han reportando una excelente fuente de minerales a excepción del Na y el I que son escasos en todas las partes de la planta. [ 5 ]

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutricia de la proteína en un alimento que se define como: "la disponibilidad de los aminoácidos contribuyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de prueba". Por lo tanto fue indispensable su determinación para poder predecir la calidad de la proteína. Los resultados se encuentran en la tabla 11

Tabla 11. Digestibilidad proteínica “*in vitro*” de las partes comestibles del guaje rojo.

Determinación	Renuevos foliares	Inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>Digestibilidad Proteínica “<i>in vitro</i>”</b>	59.17 ± 0.47	60.61 ± 1.01	61.50 ± 0.13	59.47 ± 0.01

Se muestran los valores promedio ± desviación estándar (n=3)

A partir de un 80 % se puede considerar que un alimento tiene una buena digestibilidad proteínica como es el caso de los alimentos de origen animal; sin embargo los alimentos de origen vegetal tienen un porcentaje de digestibilidad menor, en la literatura se reporta un mínimo de 59.1% para el caso de la proteína de guaje. Las cuatros partes comestibles de guaje rojo tienen en general una digestibilidad que está cercana al 60 %, lo cual habla de una digestibilidad dentro del rango reportado; en comparación a la digestibilidad de los alimentos de origen animal es baja lo que indica que la proteína no está disponible totalmente, lo anterior puede deberse a que la fuente es de origen vegetal, y en parte a la presencia de inhibidores de tripsina, los cuales inhiben la actividad de las proteasas digestivas.

En este estudio se evaluó la calidad proteínica de las diferentes partes comestibles de guaje rojo por métodos químicos, los cuales consistieron en la determinación del contenido de aminoácidos presentes, con la posterior asignación de la calificación química de acuerdo a un patrón de aminoácidos definidos por la FAO/OMS. Los resultados de estos análisis se discuten a continuación.

La determinación de los aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución permitió mostrar la cantidad de cada aminoácido para posteriormente identificar los aminoácidos deficientes, estos resultados se muestran en la tabla 12. Cabe señalar que este es un método químico que puede sobrestimar la calidad de la proteína puesto que no evalúa la disponibilidad de la misma.

Tabla 12. Contenido de aminoácidos en las partes comestibles de guaje rojo.  
(g aminoácido/ 100 g de proteína)

Aminoácido	Renuevos foliares	inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>No Esenciales o dispensables</b>				
<b>Serina</b>	5.34 <sup>b</sup>	4.99 <sup>b</sup>	5.75 <sup>a</sup>	3.91 <sup>a</sup>
<b>Glutámico</b>	12.35 <sup>a</sup>	7.87 <sup>a</sup>	17.57 <sup>a</sup>	8.06 <sup>b</sup>
<b>Glicina</b>	7.21 <sup>b</sup>	4.49 <sup>a</sup>	5.45 <sup>a</sup>	3.77 <sup>a</sup>
<b>Arginina</b>	8.87 <sup>a</sup>	6.59 <sup>a</sup>	7.89 <sup>a</sup>	5.34 <sup>a</sup>
<b>Alanina</b>	4.33 <sup>b</sup>	3.22 <sup>a</sup>	4.51 <sup>a</sup>	3.45 <sup>a</sup>
<b>Prolina</b>	6.63 <sup>a</sup>	3.86 <sup>a</sup>	4.50 <sup>a</sup>	6.18 <sup>b</sup>
<b>Cistina</b>	1.07 <sup>a</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	1.20 <sup>a</sup>
<b>Tirosina</b>	6.23 <sup>a</sup>	3.82 <sup>a</sup>	3.02 <sup>a</sup>	2.27 <sup>a</sup>
<b>Aspártico</b>	20.51 <sup>a</sup>	22.79 <sup>b</sup>	20.67 <sup>a</sup>	31.81 <sup>b</sup>
<b>Esenciales o indispensables</b>				
<b>Histidina</b>	3.66 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>	3.03 <sup>a</sup>	2.53 <sup>a</sup>
<b>Treonina</b>	4.39 <sup>a</sup>	3.27 <sup>b</sup>	5.87 <sup>a</sup>	3.69 <sup>a</sup>
<b>Valina</b>	8.91 <sup>a</sup>	7.08 <sup>a</sup>	4.10 <sup>a</sup>	4.58 <sup>a</sup>
<b>Metionina</b>	1.60 <sup>a</sup>	1.41 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	0.68 <sup>a</sup>
<b>Isoleucina</b>	6.52 <sup>a</sup>	4.87 <sup>a</sup>	2.91 <sup>a</sup>	3.15 <sup>a</sup>
<b>Leucina</b>	11.63 <sup>a</sup>	6.71 <sup>a</sup>	7.21 <sup>a</sup>	5.03 <sup>a</sup>
<b>Fenilalanina</b>	10.65 <sup>a</sup>	3.04 <sup>a</sup>	4.52 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>
<b>Lisina</b>	7.70 <sup>b</sup>	6.07 <sup>a</sup>	5.89 <sup>a</sup>	4.78 <sup>b</sup>
<b>Triptófano</b>	0.21 <sup>b</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> = Cada valor es el promedio de un duplicado; C.V < 5%

<sup>b</sup> = Cada valor es el promedio de un triplicado; C.V < 5%

En la tabla 12 se puede ver como algunos aminoácidos esenciales y no esenciales, se encuentran en menor proporción en las cuatro partes comestibles de guaje rojo, estos son cistina, metionina y triptófano; además, estos se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos en general. Sin embargo

para evaluar mejor las cantidades de los aminoácidos se llevo a cabo la Calificación Química en base a la ingesta diaria recomendada para cada uno de los aminoácidos esenciales o indispensables. Cabe resaltar que en los aminoácidos no esenciales o dispensables el que se encuentra en mayor proporción es el ácido aspártico y ácido glutámico por otra parte leucina y fenilalanina para los esenciales o indispensables

A continuación se presenta en la tabla 13. Los valores de referencia para las necesidades de aminoácidos indispensables para niños de 2 a 5 años y la relación entre los valores que presentan las muestras analizadas.

Tabla 13. Requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU [ 38 ]

Calificación química de los aminoácidos indispensables en las muestras					
A.a	Requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU*	Renuevos foliares*	Inflorescencias*	Semillas*	Polochocos*
His	19	104.52	152.01	139.30	142.26
Ile	28	126.34	146.45	90.78	120.19
Leu	66	95.61	85.61	94.23	81.42
Lys	58	72.03	88.12	88.70	88.05
Met + Cys	25	57.95	65.68	67.78	80.34
Phe + Tyr	63	144.60	91.69	104.54	102.09
Thr	34	70.06	80.98	150.80	115.95
Trp	11	10.36	1.53	32.56	6.80
Val	35	138.12	170.33	102.32	139.81

\* Valores expresados en mg de aminoácido/g de proteína

A partir de la relación de los requerimientos de aminoácidos sugeridos por FAO/OMS/ONU y la relación entre los valores obtenidos de manera experimental para cada muestra se obtiene La calificación química, presentada a continuación en la tabla 14.

Tabla 14. Calificación química de partes comestibles de guaje rojo.

	Calificación química	2 <sup>do</sup> A. a limitante
<b>Renuevos foliares</b>	10.36 - Triptófano	57.95 – Met + Cys
<b>Inflorescencias</b>	1.53 - Triptófano	65.68 – Met + Cys
<b>Semillas</b>	32.56 - Triptófano	67.78 – Met + Cys
<b>Polochocos</b>	6.80 - Triptófano	80.34 – Met + Cys

El aminoácido limitante de la proteína para las muestras analizadas es el triptófano, sin embargo en las inflorescencias y polochocos los valores son muy bajos de 1.53 y 6.80 respectivamente se consideran como trazas de triptófano, esto se pudo deber a una mala técnica en la metodología. Este aminoácido es considerado esencial o indispensable ya que solo puede ser obtenido por medio de la dieta, tiene diversas propiedades fundamentales como ayudar al organismo a elaborar sus propias proteínas, es primordial para que la glándula pineal segregue la serotonina, que es un neurotransmisor cerebral; también tiene un efecto tranquilizante ya que actúa como ansiolítico, entre otros y abunda en huevo, amaranto, leche, cereales integrales, chocolate, plátano, calabaza y entre otros alimentos. Sin embargo el triptófano a pesar de ser el aminoácido limitante en la proteína de las cuatro muestras analizadas tiene otros dos aminoácidos que se presentan en muy bajas concentraciones que son la metionina y la cistina.

A continuación se presentan los resultados de los siguientes factores tóxicos: mimosina, lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina, de los cuales se realizó un análisis estadístico de varianza ANOVA de una sola vía al 95% de confianza, acoplado a la prueba de rangos múltiples de medias Duncan, con el programa estadístico STATGRAPHICS versión 14.0, para mimosina e inhibidores de tripsina. Las saponinas debido a la naturaleza no paramétrica de los valores fue tratado con un análisis estadístico diferente el cual fue una prueba de Freedman de estadística no paramétrica.

Tabla 14. Factores tóxicos y antinutricionales de las partes comestibles del guaje rojo. <sup>+</sup>

Determinación	Renuevos foliares	Inflorescencias	Semillas	Polochocos
<b>Mimosina</b> <sup>●</sup>	1.10 ± 0.21 <sup>a</sup>	Negativo	2.94 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>Lectinas</b> <sup>¥</sup>	13.48 ± 0.00	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Saponinas</b> <sup>∞</sup>	10.42 ± 5.03 <sup>a</sup>	15.63 ± 8.16 <sup>a</sup>	5.21 ± 2.60 <sup>b</sup>	15.63 ± 7.80 <sup>a</sup>
<b>Inhibidores de tripsina</b> <sup>▲</sup>	11.68 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.54 ± 0.16 <sup>c</sup>	7.49 ± 0.29 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.10 <sup>d</sup>

<sup>+</sup> Se presentan los valores promedio ± desviación estándar (n=3); C.V.< 5 %. Letra diferente dentro de la hilera indica diferencia significativa ( $\alpha= 0.05$ )

<sup>●</sup> Valor expresado en porcentaje g/100 g de muestra

<sup>¥</sup> Dato expresado en unidades de hemaglutinación/ g de muestra (UHG/g muestra)

<sup>∞</sup> Dato expresado en unidades de hemolisis/mg de muestra (U.H. /mg de muestra)

<sup>▲</sup> Dato expresado en unidades de tripsina inhibida/ mg de muestra (UTI/mg de muestra)

El factor tóxico más importante y representativo de la muestra es la mimosina, ya se mencionaron las características tóxicas de este aminoácido no proteínico, la toxicidad que presentan las muestras es baja para los polochocos y los renuevos foliares con 0.89 y 1.10 respectivamente y no detectable en inflorescencias, sin embargo la concentración es cercana al 3 % en semillas, esta concentración al igual que las anteriores no presentan un riesgo para la salud ya que el contenido cuando el crecimiento de *Leucaena* es lento es de 4 a 5 % y muy cerca del 10 % cuando es rápido; sin embargo el ganado tolera dietas del 30 % de *Leucaena* seca por periodos prolongados.

Las lectinas tienen la capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos sanguíneos, se determinaron y solo se obtuvo un resultado en los renuevos foliares que es alto de 13.4 UHG/g de muestra, como referencia en un trabajo previo realizado por Gonzales en el año 2001 en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se determinó que el valor en el cual las lectinas no presentan daños clínicos ni subclínicos debe ser menor a 1 UHG /g de muestra; por lo que el consumo de los renuevos

foliares representa un riesgo alto, sin embargo sabiendo que las lectinas presentan un carácter termolábil, el nivel de estos tóxicos puede disminuir utilizando procesos térmicos donde se controle adecuadamente el tiempo y la temperatura, incluso podrían desaparecer con vapor a presión durante 30 minutos. Por otro lado en el trabajo de González se pudo comprobar que si el tratamiento térmico es inadecuado el contenido de este toxico aumenta.

Las saponinas presentan valores que no pueden ser tratados con estadística paramétrica con el fin de saber si existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras, se realizo una prueba de Freedman de estadística no paramétrica con el sistema de análisis estadístico Infostat, versión estudiante el cual nos arroja el resultado que solo hay diferencia significativa solo en las semillas respecto a las otras 3 muestras analizadas, de acuerdo a los resultados obtenidos puede concluirse que no presentan un riesgo para la salud pues los niveles son bajos y la ingesta tendría que ser excesiva para poder causar algún daño.

Los inhibidores de tripsina son sustancias con la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de la tripsina y de acuerdo a la técnica de Kakade, se considera que el valor admisible con respecto a los inhibidores de tripsinas es de 10 UTI/mg, por lo tanto solo los renuevos foliares sobrepasan este valor, (11.6 UTI/mg) esto podría representar un riesgo desde el punto de vista antinutricional al organismo; sin embargo en la bibliografía se reporta que estos inhibidores son termolábiles [ 23 ] y con un tratamiento térmico se puede reducir considerablemente el riesgo que se puede tener de consumir los renuevos foliares. Las inflorescencias, semillas y polochocos no representan un riesgo por este factor antinutritivo al tener valores debajo de 10 UTI/mg muestra.

## 6.- Conclusiones

- ✓ Se aporó información de la composición química bromatológica de las partes comestibles de guaje rojo (**Leucaena esculenta subsp. Esculenta**), ya que hasta el momento no existe información al respecto y el componente mayoritario del análisis proximal fueron los hidratos de carbono, seguida de la proteína.
- ✓ El % de digestibilidad para las muestras está en los niveles que se reportan en la literatura para alimentos de origen vegetal, alrededor de 60 %.
- ✓ Respecto a los factores tóxicos y antinutrientales presentes en las muestras analizadas se concluye que el porcentaje de mimosina no representa ningún riesgo para la alimentación animal y humana.
- ✓ La presencia de lectinas solo está en los renuevos foliares en muy alta concentración (13.48 UHG/ g muestra), presenta un riesgo significativo para la alimentación animal y humana.
- ✓ En todas las partes comestibles del guaje se presentan saponinas; sin embargo, el nivel encontrado es relativamente bajo y sus ingestas no representan un riesgo por este factor tóxico
- ✓ Los inhibidores de tripsina presentan valores abajo del límite máximo permitido (10 UTI/mg) excepto en los renuevos foliares que tiene 11.69 UTI/ mg esta es la única muestra que podría presentar un riesgo su consumo en crudo, viéndose disminuido el riesgo por este factor antinutricional si se somete a un tratamiento térmico.
- ✓ Finalmente, se concluye que el consumo de las partes comestibles de guaje rojo analizadas en este trabajo, con excepción de los renuevos foliares, no presentan un riesgo a la salud, a pesar de ser consumidas en fresco y cocinadas en guisos, se recomienda que los renuevos foliares tengan un tratamiento térmico.
- ✓ El aminoácido limitante de la proteína para las cuatro partes del guaje rojo es el triptófano

## 7.- Bibliografía

1. Astiasarán, A.I y Martínez, H. J. 2000. Alimentos. Composición y propiedades. Mc Graw Hill Interamericana, 2ª Edición. Madrid, pág.57, 157 – 159
2. AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of Association Official Analytical Chemists. Published, 15<sup>th</sup> edition, vol. II, Arlington pág. 778 - 779, 1058 – 1059.
3. Badui, S., 1993. Química de los alimentos, 3era edición. Editorial Alhambra Mexicana, S.A de C.V. México, D.F. pág., 15.
4. Barrera, M. 2010. Evaluación de la calidad proteínica de algunos alimentos de mayor consumo en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México D,F. pág. 21 - 24
5. Barrientos A. 1987. **Leucaena** una opción para la alimentación bovina en el trópico y subtropical. Ed Edica, Cd de la Habana, pág. 1-29, 111 -120
6. Casas, A, Caballero. J. 1996. Traditional management and morphological variation in **Leucaena esculenta (Fabaceae: Mimosoideae)** in the Mixtec region of Guerrero, Mexico. Economic Botany. 50(2).176 – 181
7. Casas, F.A. 1992. Etnobotánica y procesos de domesticación en **Leucaena esculenta** (MOc.et Seseé) ex A.D.C.) Benth. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México D,F. pág. 24, 31-33
8. Castillo. M. 2011. Evaluación bromatológica de la fracción proteínica de la almendra destoxificada de higuierilla (**Ricinus communis**). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F, pág. 10, 13
9. Cheftel, J.C. 1989. Proteínas alimentarias. Editorial Acriba. S. A. Zaragoza pág. 49 – 58, 116 – 123.
10. Cienfuegos I, F. 1986. Producción de alimentos en condiciones naturales adversas. SARH-INIFAP. Publicación especial No. 118. México, D.F. pág. 12, 34 – 37, 54
11. Derache, R., 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, Barcelona. pág. 24
12. Fennema O., 2006. Química de los alimentos. 2ª edición, editorial Acriba, S.A. Zaragoza, pág. 321 – 323, 1121-1136.

13. González P. 2001. Efecto del procesamiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México D, F. pág. 3 - 4
14. Grether R. 2006. Flora del valle de Tehuacán- Cuicatlán. **Mimosaceae** tribu **Mimoseae**. UNAM 44: pág 1 – 118
15. Gutiérrez M. 2013. Caracterización comparativa del aspecto bromatológico y toxicológico en papita de monte (**Solanum cardiophyllum**). Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México D, F. pág. 8 - 10
16. Helrich, K. 1990. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 15<sup>th</sup> edition, vol. II, Arlington pág. 778 - 779, 1058 – 1059.
17. Hernández, L. 2013. Caracterización bromatológica, determinación de factores tóxicos de la almendra, y parámetros fisicoquímicos de la grasa de calabaza hedionda (**Apodanthera undulata**) Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México D, F. pág. 10 - 15
18. Herrera, Z. R 2012. Composición bromatológica, potencial nutritivo y contenido de factores tóxicos, entre las hojas de diferentes cepas de moringa (**Moringa oleífera**) que se cultivan en el país. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México D, F. pág. 11, 17, 24
19. Hill A.F 1965. Botánica económica: plantas útiles y productos vegetales. Ediciones Omega, S.A, Barcelona, pág. 20, 65 – 69, 113
20. Horwitz, W. and Latimer, G. 2005. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 17<sup>th</sup> edition, Chapter 4, Gaithersburg, pág 1 – 8, 33 – 36, 42 – 47.
21. Joaquin C. V. 2001. Botánica económica de cuatro especies de San Juan Ixcaquixtla, Mixteca Poblana. Tesis de Licenciatura Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco. pág. 92 - 102
22. Kakade, M, L. Rackis, L.J. Mcghee, J.E and Puski, G. 1974 Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry. 51, 376-382
23. León, A. 2009. Caracterización del sistema de aprovechamiento del guaje rojo **Leucaena esculenta subsp. esculenta (Mociño & Sessé ex DC.) Benth.**, en Colonia San Martin, Zapotitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM, Iztacala. pág 5 - 15

24. Lindner, E., 1995. Toxicología de los alimentos. 2ª edición, Ed Acriba, S.A., Zaragoza, pág. 1-17
25. López M., 2000. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 22 - 23.
26. López, G. 2003. Estudio de la composición y valor nutricional de los residuos de uva (*Vitis vinifera*) y su posible uso en la alimentación animal. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pág 7, 15
27. Makkar, H. Becker, K., Spores F. and Wink M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*, Journal Agricultural and Food Chemistry., 45, 67 - 70
28. Matsumoto H. y G.D Sherman. 1951. A rapid colorimetric method for the determination of mimosina. Archives of Biochemistry and Biophysics., 33, 195 - 200
29. Mitchell S., Helen R. 1978. Nutrición y dieta. Editorial Interamericana, 16ª edición. México D.F. Pág. 35 – 36
30. Miranda, R. La fibra dietaria en la alimentación. Determinación del contenido de fibra soluble e insoluble en 60 alimentos. Proyecto de investigación. 235/88. U.A.E.M. Toluca Pág. 60- 68
31. Molto. J.C., 2006. Proteínas en nutrición básica humana, Ed., Publicaciones Universidad de Valencia, Valencia pág. 99-116
32. Mora, J.F. 1992. Soporte nutricional especial. Editorial Médica Panamericana. Bogotá pág. 35 – 40, 56 – 58.
33. Poucell. C. 2010. Análisis proximal y factores tóxicos naturales del frijol comba (*Phaseolus lunatus*) y peruano (*Ph. Vulgaris*) crudos y cocidos; así como evaluación nutritiva de los frijoles cocidos, consumidos en San Miguel Totolapan, Gro. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pág. 13 – 15, 20
34. Pound, B & Martinez, C. L.1983. *Leucaena* its cultivation and uses. Edit. Corripio. Santo Domingo, pág. 59, 78 - 82
35. Rama R, 1974. Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. Journal Food Science and Technology, 11, 213 - 216

36. Ramos. L., 2009. Evaluación nutricional y toxicológica del ejote destoxificado de ***Erythrina americana*** (colorín) para la alimentación animal. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 9-10
37. Repetto, M., 1995. Toxicología avanzada. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid, pág. 205 – 206
38. Robinson, D.S, 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza pág.107 – 113, 141
39. Robles, A.C 1990. ***Leucaena***: árbol de uso múltiple (estudio de caso en el oriente del estado de Morelos). Tesis de licenciatura. División de ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco. pág. 20 - 22
40. Rodríguez. B., 2010. Evaluación bromatológica y determinación de los factores tóxicos naturales en el grano de frijol gordo (***Phaseolus polyanthus***) verde y seco, consumidos en el municipio de Cuetzalan, Puebla. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México D.F., pág. 20-21
41. Romero, C. 2003. Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, pág. 20-23, 29-31
42. Scheider L. 1985. Nutrición. Conceptos básicos y aplicaciones. Editorial Mc Graw-Hill. México. D,F. pág. 36- 69
43. Skoog, D. 2001. Principios de análisis instrumental, Mc Graw Hill interamericana, 5ª edición, México D.F., pág 467 – 469
44. Sotheeswaran, S., 1988. Screening for saponins using the blood hemolysis test. Journal of Chemical Education 65. 161 - 162
45. Vaclavik, C., 2002. Fundamentos de ciencia de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, pág. 64, 133, 255,284
46. Valle, P., Lucas, B., 2000. Toxicología de alimentos. México. ISBN 927537004 4. Disponible en:

<http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>

47. Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A, 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44: 385 – 403.
48. Vergara S.M. 1994. El sistema de producción forestal no maderable en el estado de Colima (México): el caso de la palmilla *Cryosophila nana* (H.B.K). Universidad de Colima, Colima. pág. 11, 20 - 22
49. Zarate, P .S. 1994. Revisión del genero *Leucaena* en México. *Anales Instituto de Biología UNAM, México, Ser. Bot* 65(2): 83 – 162