

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION DE AMINOACIDOS RAROS Y

PROTEINA VERDADERA EN LEGUMINOSAS

TESIS MANCOMUNADA

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N**

**JOSE ANGEL GUERRERO BELTRAN
MARIA DE LOURDES SIGALES GONZALEZ**

MEXICO, D. F.

1982



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
PARTE EXPERIMENTAL	21
RESULTADOS	33
DISCUSION DE RESULTADOS	43
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45

INTRODUCCIÓN.

El problema del hambre y la malnutrición en el mundo y principalmente en los países en vías de desarrollo si se sintiese resolverse y avanzase con la rapidez mayor deseada por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos.

Las razones para estudiar a las leguminosas son las siguientes:

- 1.- Las estadísticas de la FAO con respecto al consumo de calorías revelan que en la actualidad se han alcanzado o sobrepasado en toda la extensión las necesidades aún en las regiones de bajo nivel económico. No ocurre lo mismo en el caso de las proteínas que en general es más bajo que hace 20 años.
- 2.- La producción tradicional de carne, leche, huevos y pescado aumenta muy lentamente, por razones económicas, geográficas ó técnicas. Éstos artículos continuaran siendo inaccesibles a un amplio sector de la población mundial desde hace varias décadas.
- 3.- Los granos de leguminosas llamados "carne del pobre" constituyen una solución parcial pero rápida al problema del abastecimiento de proteínas de un tercio del mundo ya que el grano seco contiene de 1, a 25% de ellas y además estos granos de leguminosas se adquieren a un costo mucho más bajo que las fuentes de proteína animal.

Por lo tanto es preciso que se preste una gran atención a las leguminosas graníferas no solamente como plantas de regeneración de los suelos, como forraje ó como plantas oleífe-

ras sino ante todo como plantas alimenticias que son fuente de proteína.(4)

Desafortunadamente las leguminosas contienen una serie de factores tóxicos y antinutricionales como son: hemaglutininas, inhibidores de tripsina, saponinas, alcaloides, glucósidos cianogénicos, factores antivitaminicos, factores que producen flatulencia, favismo y aminoácidos no proteínicos. Estos tóxicos son eliminados en gran parte por medio de tratamientos térmicos ó de remojo.(15)(29)

Tomando en cuenta esto último el presente trabajo tiene como objetivos:

- 1.- Determinar la cantidad de proteína verdadera en las semillas de leguminosas.
- 2.- Realizar la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos "raros" no proteínicos además de los comunes que se encuentran en forma libre en las semillas.

GENERALIDADES.

Historia de las leguminosas.

Las leguminosas pertenecen a la familia Leguminosae y que comprende unos 600 géneros y 15000 especies, ocupa el segundo lugar en orden de importancia entre las familias de plantas provistas de semillas. Las leguminosas han sido uno de los primeros cultivos comestibles practicados por el hombre. Investigaciones arqueológicas recientes han arrojado alguna luz sobre el proceso de cultivo agrícola y su cronología pudiendo decirse que las leguminosas han constituido un alimento de los seres humanos durante 8,000 años.

Importancia de las leguminosas.

Las leguminosas son cultivadas en todo el mundo tanto en el trópico como en las zonas templadas.

Como es bien sabido las raíces de las leguminosas contienen nódulos que constituyen el hábitat de bacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, de tal modo que enriquecen el suelo y son de gran importancia para la rotación de cultivos.

Los granos secos de leguminosas contienen un alto contenido de proteína el cual oscila entre 17 y 25% (existen excepciones como el frijol soya que tiene aproximadamente 40% de proteína), mientras que en los cereales la cantidad de proteína oscila entre 6 y 14%. Aunque las leguminosas se cultivan en menor cantidad que los cereales de primera necesidad su contribución al suministro mundial de proteína es considera--

de, probablemente del orden del 8% del total de proteína, -- constituyendo por lo tanto un alimento importante para el -- consumo humano que reviste en interés bastante destacado desde el punto de vista de la nutrición.(4)

Sin embargo, no solo tiene importancia la cantidad de -- proteína sino también la calidad la cual está dada por la composición de aminoácidos. Aunque la calidad de las proteínas -- provenientes de las leguminosas no se compara con la calidad -- de las proteínas de origen animal se ha observado un marcado -- incremento cuando se consumen en asociación con las proteínas -- provenientes de cereales y se observa una suplementación la -- cual se conoce como suplementación cereal-leguminosa.(1)

Las leguminosas están consideradas como alimentos ricos -- en vitamina B₁ (tiamina) por lo cual es aconsejable su consumo como fuente de ésta vitamina.

Las leguminosas son una fuente muy importante de hierro -- en la dieta, por lo tanto al consumir este tipo de alimentos -- no habrá deficiencia del metal y no se presentará la anemia -- ferropénica.(18)

Las leguminosas contienen factores antinutricionales y -- tóxicos por lo que es importante conocer dichos tóxicos con -- el fin de mejorar las especies comerciales presentes así como -- de buscar nuevas fuentes de proteína dentro de ésta familia -- tanto para la alimentación humana como para la animal.

AMINOACIDOS RAROS.

Además de los veinte aminoácidos comunes que las plantas, animales y microorganismos requieren para la síntesis de sus proteínas, se conoce que las plantas sintetizan un gran número de aminoácidos los cuales no son incorporados dentro de -- sus proteínas y no está bien estudiado el papel que desempeñan.

Hasta ahora han sido aislados 240 aminoácidos no proteínicos en especies de leguminosas: estos no solo están restringidos para ésta familia.

Estructuralmente los aminoácidos raros pueden ser divididos en dos categorías:

1) Los aminoácidos raros que son análogos químicos a los aminoácidos comunes, donde:

a) pueden ser formados por la modificación de aminoácidos comunes.

b) ó pueden surgir como un resultado de modificaciones de la ruta biosintética normal asociada con la síntesis de aminoácidos comunes.

2) Los aminoácidos que no son análogos ya que pueden ser sintetizados por nuevas rutas.(10)

Algunos de estos aminoácidos son tóxicos ó fisiológicamente activos en organismos en los cuales son extraños, tales organismos incluyen bacterias, hongos, insectos, animales y otras especies de plantas. La mayoría de ellos no son de interés en las vías metabólicas de las plantas que los sintetizan

y por lo tanto se consideran compuestos secundarios y al mismo tiempo sin interés económico; aunque ya se evidencian algunos de ellos por dar resistencia a las hojas y semillas contra predadores potenciales.(11)(32)(41)

Se ha demostrado que concentraciones de 0.1M de éstos aminoácidos inhibe el consumo en algunas especies de insectos y que para otros son menos eficaces debido a que ellos pueden consumir grandes cantidades de plantas sin ser afectados. Tal es el caso de la Acacia Senegal que se emplea en la producción de goma arábica y que es consumida por los insectos (*anaeridium melanoherdon arabofrums*) en épocas de sequía en África.(17)

En muchos insectos se han probado los efectos de algunos aminoácidos no proteínicos y se ha encontrado que no se puede generalizar sin un conocimiento a priori, como para que la concentración de un compuesto en particular sea tóxica, excepto si esta concentración es del 5% ó mas grande. Es probable que ciertos compuestos requieran siempre de dosis altas para ser letales, otros serán siempre tóxicos a dosis bajas y otros variarán fuertemente de especie a especie.

La toxicidad de los aminoácidos no proteínicos puede ser manifestada a través de su habilidad particular para competir con otros aminoácidos proteínicos ó en otras vías biosintéticas involucradas en los aminoácidos proteínicos y posiblemente a través de la cantidad que pueda ser tolerada al incorporarse a la proteína antes de que el mal funcionamiento llegue a ser

letal para el organismo. De esta manera los aminoácidos no --
proteínicos se pueden ver como intermedios entre compues--
tos, como alcaloides y compuestos que contienen cianuro que -
simplemente bloquean una reacción fisiológica interna.(27)

Su limitada distribución puede proporcionar un sistema -
con el cual se puede tener información concerniente a las re-
laciones que existen entre diferentes especies, ya que los a-
minoácidos no proteínicos existentes en las semillas de plan-
tas en ocasiones aparecen como aminoácidos constantes de una-
especie, estos aminoácidos se encuentran en mayor concentra--
ción que otros no proteínicos presentes en la semilla. El ami-
noácido característico varía dependiendo del género y especie
y hasta dentro del mismo género; como ejemplo podemos citar a
la homocisteína que es característico en algunas especies de
Lathyrus.(17)

La concentración de estos aminoácidos es muy variable ya
que depende de la edad, la especie, la variedad, las partes -
de la planta y un gran número de condiciones del medio ambien-
te.(32)

En algunas especies los aminoácidos raros pueden estar -
en grandes concentraciones en las semillas, esto sugiere que
pueden constituir un material de reserva para el desarrollo -
del embrión. Aunque los aminoácidos raros varían en las espe-
cies, el nitrógeno no proteínico juega un papel importante --
como producto de almacen en las semillas en varias formas, -
los aminoácidos raros pueden ser precursores de metabolitos -

esenciales.

Estos productos de almacén probablemente sufren de degradación y transformación durante la germinación de las semillas, como ejemplo en el caso de canavanina en *Canavalia ensiformis*, *Colutea arborescens* y *Medicago sativus* en las cuales se observa un descenso del aminoácido durante la germinación.(7)

Por lo mencionado anteriormente en ésta revisión se debe prestar atención a la importancia de los aminoácidos raros en plantas, no sólo en la bioquímica de plantas sino también en otras áreas de la química, biología, agricultura y medicina.(11)

AMINOACIDOS RAROS ESTUDIADOS.

β-AMINOPROPIONITRILLO



El β-aminopropionitrilo es un compuesto osteolatórgico que se aisló de *Lathyrus odoratus* (guisante dulce) en forma de β-(N-γ-L-glutamil aminopropionitrilo), también se encuentra en *L. hirsutus*, *L. recessus* y *L. pusillus*.

Se dice que el grupo γ-glutamil no es esencial para la toxicidad, sino que la parte activa radica en la molécula del β-aminopropionitrilo.

El β-aminopropionitrilo se caracteriza por estar presente comúnmente en las especies de *Lathyrus* que producen osteolatrismo y estar ausente en las que causan el neurolatrismo.

(7)(19)(35)

Se ha observado que los compuestos derivados de β -aminopropionitrilo que son almacenados in vivo evidenciados por la aparición del ácido cianocético y β -aminopropionitrilo en la orina son osteclatrogénicos. El β -aminopropionitrilo inhibe competitivamente y en forma reversible a la amino oxidasa, esta enzima actúa sobre el aminopropionitrilo obteniéndose cianocetaldehído, compuesto muy reactivo que se une a los grupos amino de la elastina y del colágeno haciendo imposible el enlace de las cadenas. (30)(33) Causa lesiones en el tejido mesenquimal y en el desarrollo del cartílago de los huesos, formándose un cartílago hiperplástico irregular con gran alargamiento de los discos epifisiales y hay deformación de los huesos largos, el tórax se deforma, la espina dorsal muestra deformaciones y los discos intervertebrales se aflojan.

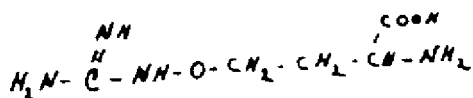
En el sistema vascular los efectos son llamados angiolarismo, hay inhibición de la formación de la fibra elástica en la pared vascular, se incrementan los fibroblastos y existe un arreglo irregular de las fibras de colágeno.

Al alimentar ratas jóvenes con dietas que contienen un 50% de *L. odoratus* aparecen deformaciones esqueléticas y ruptura de la aorta, los mismos resultados se conservan con β -aminopropionitrilo a una concentración de 0.1-0.2% en la dieta. (35)(36)

El método más recomendable para eliminar las sustancias tóxicas de las semillas de *Lathyrus* es hervirlas en agua ó togar

tales. Con estos aminoácidos en su parte el tóxico y a fines se ve disminuido el contenido por síncisis que las péptidos de la vitamina y casi en su totalidad (70-80%). (30)

CANAVANINA.



La canavanina (ác. α-amino-β-guanidoxilúrico) es un aminoácido básico análogo de arginina el cual fué aislado de las semillas de Jack bean (*Canavalia ensiformis*) por Nitta y Tomiyama; contiene de 2-3% de peso de la semilla. También se encuentra en menores cantidades en *Canavalia lineata*, en *Canavalia obtusifolia*. Este aminoácido está restringido a las leguminosas de la subfamilia Papilionoideae. (19)(37)(42)

El grupo guanidoxil de canavanina reacciona con pentacianonitro ferrato en solución acuosa a un pH de 7 dando un color magenta. Con éste reactivo se puede hacer una selección representativa de plantas detectando canavanina. (6)

Tschiersch mostró que las semillas de *Canavalia ensiformis* y la canavanina misma purificada (200 mg/Kg) son tóxicos cuando se alimentan a ratones.

Las semillas de varias especies de *Canavalia* y *Dioscorea* han sido reportadas por ser tóxicas al hombre cuando éstas se consumen crudas, debido a ésta razón los nativos de Costa Rica las consumen cocidas. (36)

La canavanina es un compuesto biológicamente activo que inhibe el crecimiento de insectos, se ha observado que el

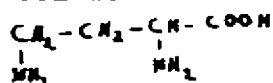
nistrar el aminoácido e ir aumentando su concentración el desarrollo de las larvas va disminuyendo de tal forma que al llegar a un 5% de la concentración su desarrollo ó crecimiento es cero.(27)

K. F. Wilson y E.A. Bell observaron que en plantúlas de leguminosas que sintetizan canavanina, al suministrar más canavanina la inhibición es mínima y en plantúlas que no la sintetizan existe alta inhibición del crecimiento.(41)

La síntesis de canavanina es compleja y requiere de varios precursores de tal forma que la síntesis no sería completa si alguna enzima decisiva estuviera ausente en la secuencia.

Aminoácidos no proteínicos como la canavanina pueden constituir una fuente altamente disponible de nitrógeno almacenado en las semillas de leguminosas. Como ejemplo podemos mencionar a las semillas de *Canavalia ensiformis* y *Colutea arborescens* - que durante la germinación la canavanina que se encuentra almacenada va disminuyendo.(7)

ACIDO 2,4 DIAMINOBUTIRICO



El ac. 2,4-diaminobutírico fué aislado como el principal tóxico por Messler y col. de *Lathyrus latifolius*, quienes también establecen que el ac. 2,4-diaminobutírico es el tóxico principal de las semillas de *L. sylvestris* las cuales contienen entre 1.4-2.7% de éste aminoácido. Ac. 2,4-diaminobutírico es un neurotóxico que se encuentra libre en especies de *L.*

thyrus, también se encuentra en pequeñas cantidades ó en trazas en semillas de otras especies principalmente de Leguminosas y Crucíferas.(33)(36)

Experimentos con isótopos demuestran que el ac. 2,4-diaminobutírico se forma a partir de homoserina y del ácido aspártico en plantúlas de *Lathyrus sylvestris*, observándose que homoserina funciona como un intermediario entre el ac. aspártico y el ac. 2,4-diaminobutírico.(33)

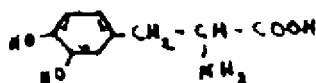
El aminoácido 2,4-diaminobutírico causa neurolatirismo, - que es un desarreglo nervioso en los animales y en el hombre. En el hombre los trastornos neurológicos se manifiestan con parálisis del recto y vejiga, los músculos son temblorosos, - se incrementan los reflejos, existe inhabilidad para caminar de tal forma que se pueda llegar hasta una rigidez en los músculos de las piernas, se siente hormigeo, dolores alrededor de la cintura, disminución de la sensación táctil, pérdida -- completa de la sensación al dolor y calor. Los más afectados por ésta enfermedad son los varones adultos jóvenes.(30)(33)

(35)

Ressler demostró que administrando ac. 2,4-diaminobutírico en ratas, niveles de 68 mg/100g de peso durante dos días - causó deilidad en las piernas traseras, temblores, convulsiones y muerte.(36) O'Neal y col. encontraron que a dosis de -- 84 mg/100g de peso en ratas adultas causa toxicidad crónica de amonio; también mostraron que ac. 2,4-diaminobutírico inhibe a la ornitincarcamiltransferasa del hígado, la cual cataliza

za la síntesis de citrulina con lo que disminuye la síntesis de urea aumentando el amoniaco en la sangre y cerebro.(30)

DOPA, (3,4-DIhidroxifenilalanina)



Fue aislado por Suggenell de las plantúlas, vainas y trijoles de vicia faba en 1913. Se encuentra también en especies de cucurbitaceas en concentraciones del 60%, en frijol terciopelo, trigo y avena.(28)

Este aminoácido se encuentra en los mamíferos en el Sistema Nervioso Central (SNC) como intermediario en la síntesis de importantes aminas fisiológicas. DOPA por acción de las enzimas del organismo puede pasar a dopamina y ésta a su vez a noradrenalina y adrenalina, ésta última es una sustancia transmisora de la excitación simpática y a su vez produce una fuerte subida de la presión arterial.(7)

El aminoácido DOPA puede ser empleado terapéuticamente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (en ésta enfermedad se encuentra disminuida la dopamina la cual actúa como una sustancia transmisora en determinados núcleos); sin embargo puede producir efectos colaterales indeseables tales como vómito, náuseas y movimientos involuntarios cuando es tomado oralmente en dosis alta.

El DOPA está asociado con el favismo, enfermedad en los humanos que generalmente son deficientes en la enzima glucosa-

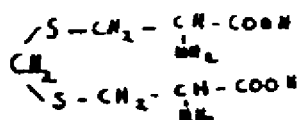
-6- fosfato deshidrogenasa en eritrocitos, los rasgos clínicos de la enfermedad se manifiestan con una anemia de tipo hemolítico. La hemólisis de los eritrocitos es debida a la disminución del glutati6n.(28)(36)

Se ha reportado tambi6n que al igual que otros amino6cidos no prote6nicos el DOPA inhibe el crecimiento de la radícula e hipoc6tileo de semillas durante su germinaci6n y 6sto depende de la concentraci6n del amino6cido.(41)

En animales e insectos que consumen plantas con este amino6cido puede causar una repulsi6n dependiendo de la concentraci6n del amino6cido 6 la cantidad de la planta consumida; como ejemplo podemos mencionar el gorgojo que puede morir dependiendo de la cantidad ingerida de 6ste amino6cido.(21)

AC. DJENCOLICO.

S,S METILENBIISCISTEINA



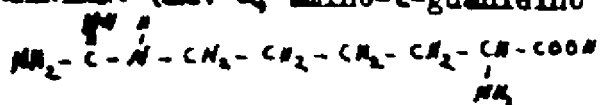
El frijol djencol es consumido en altas cantidades en Java y en ciertas partes de Sumatra. Este frijol proviene de un 6rcool perteneciente a la familia de las leguminosas Pithecolobium-Lobatum. De dicho frijol se aisl6 un amino6cido azufrado que se encuentra en estado libre en una cantidad del 1.0%-4.0%, -- fu6 llamado ac. djenc6lico, tiene una estructura semejante a la cistina pero no puede reemplazarla en el organismo; aunque se ha observado que en dietas para ratas aparentemente puede --

ser metabolizado por ellas.

El ac. djencólico es muy poco soluble en agua; debido a su poca solubilidad no es metabolizado y cristaliza en los túbulos renales y en la orina. La ingestión de grandes cantidades de ac. djencólico puede producir insuficiencia renal con aparición de hematuria y cristales en forma de aguja en la orina. (28) (30)

Van Veen y Hyman sugieren que la síntesis natural del ac. djencólico en las plantas superiores ocurre por condensación de formaldehído y cisteína. (2)

HOMOARGININA. (AC. α amino- ϵ -guanídino caprónico)



Homoarginina es un aminoácido básico homólogo de arginina; fué aislado por Ball de semillas de Lathyrus cicera; homoarginina se encuentra en altas concentraciones en especies de Lathyrus tales como sativus y clymenum y menos frecuente en otras especies de Lathyrus, también se encuentra en hojas de acacia como principal aminoácido no proteínico.

L. cicera, L. sativus y L. clymenum crecen vigorosamente igual en condiciones adversas para el desarrollo de las plantas y sus semillas son consumidas principalmente por la gente de la India y Argelia en altas cantidades; en cantidades menores en Francia, España y otros países. (33) (35)

Al consumir semillas de Lathyrus que contienen homoargini

na se presenta el neurolatirismo.

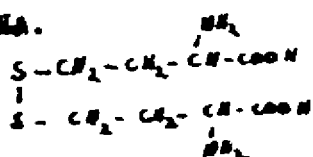
Homoarginina es un precursor natural de el aminoácido lathyryna el cual se forma por una ciclización y deshidrogenación de homoarginina; la existencia de uno u otro en las plantas se debe a la presencia ó ausencia del sistema enzimático capaz de llevar a cabo la transformación.(33)

Realizando la hidrólisis alcalina de homoarginina se obtienen como productos finales lisina y homocitrulina.(9)

Homoarginina actua como un fuerte inhibidor del crecimiento de la radícula de lechuga y del hipocotileo en algunas especies de leguminosas de los géneros Lathyrus y Vicia.(41)

Experimentos con homoarginina en insectos se observaron efectos no inhibitorios en el consumo a una concentración de 0.5%, ligera inhibición a una concentración de 1.0% y completa inhibición al 5.0%; como ejemplo el gorgojo meridional al consumir homoarginina y otros aminoácidos no proteínicos a concentraciones bajas no se observan efectos de letalidad, pero a una concentración de 5% o más resulta letal.(17)(27)

HOMOCISTINA.



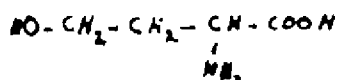
Homocistina es un aminoácido que se preparó sintéticamente desde 1932 por Batz y Vignaud.(23)

No se ha comprobado pero se cree que homocistina tiene un comportamiento fisiológico; que está relacionada con el metabolismo

lismo de metionina y cistina.(38)

No se han hecho estudios biológicos sobre homocistina, únicamente sobre su síntesis.

HOMOSERINA



La homoserina fué descubierta por Miettinen y col. quienes la aislaron de los retoños de guisantes en forma de clorhidrato de su lactona. Es uno de los aminoácidos más abundantes que se encuentra libre en las partes vegetativas de las plantas de los guisantes y su concentración es la misma que la de asparagina.

Rabson y Tolbert reportan que las plantas de guisantes pueden convertir el ácido aspártico a homoserina.

Tanto la homoserina como la asparagina aparecen como productos finales alternativos del metabolismo en guisantes; el medio ambiente interviene en la determinación de éste metabolismo.(14)(24)

La homoserina no se encuentra en estado libre en las semillas de guisantes ni en sus hidrolizados. Durante la germinación aparece la homoserina incrementándose a medida de que ésta se lleva a cabo; se observa también que el ac. glutámico va disminuyendo gradualmente aunque la homoserina ya no se incrementa, en ésta etapa la asparagina se encuentra en una concentración un poco menor que la homoserina.(21)(39)

Se ha estudiado que en plantúlas de *Lathyrus silvestris* - el ácido aspártico y la homoserina son precursores del ac. 2,4-diaminobutírico, actuando como la homoserina como un intermediario entre el ac. aspártico y el ac. 2,4-diaminobutírico.

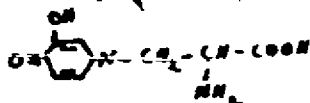
(22)(33)

Homoserina también se le considera como intermediario de treonina en bacterias, hongos y plantas superiores. La conversión de homoserina a treonina ocurre con la presencia de homoserina cinasa, obteniéndose homoserina fosfato, posteriormente hay un rearrreglo interno y pérdida del grupo fosfato, obteniéndose treonina; en muchas especies se ha implicado también a homoserina en la formación de metionina con o-acetil-homoserina, cistationina y homocisteina como intermediarios.

(14)(22)

La homoserina es uno de los aminoácidos que han sido probados para la inhibición de la germinación. É que impide en gran parte el crecimiento de radícula e hipocotileo en lechuga. (41)

MIMOSINA, (q-(N-(3-hidroxipiridona-4))-α-aminopropiónico.



La mimosina es un aminoácido análogo al aminoácido aromático-*tyrosina*. Su distribución se restringe a dos géneros de leguminosas que son la *Mimosa* y la *Leucaena*, acumulándose en grandes cantidades en las semillas y el follaje. (17)(30)

Mimosina se encuentra en pequeñas concentraciones en Mimososa púdica de la cual se aisló por primera vez, en altas concentraciones en hojas, tallos y semillas de *Leucaena glauca*. En las semillas de *L. leucocephala* se encuentra en una concentración de 8%.(13)

L. glauca y *L. leucocephala* se consumen en Indonesia como alimento debido a su alto contenido proteínico y a su sabor agradable; *L. glauca* también se usa como forraje en Australia, contribuyendo a los requerimientos proteínicos del ganado.(25)

Crouse, Maxmel y Blank mostraron que mimosina actúa como análogo de tirosina, capaz de inhibir la tirosina descarboxilasa, la inhibición competitiva de tirosinasa y competir en la incorporación de tirosina dentro de las proteínas biológicas vitales.(13)

La toxicidad de mimosina en ratas se observa cuando se le adiciona a la dieta un 5% de mimosina, causando inhibición del crecimiento, el cual vuelve a su normalidad cuando en la dieta la mimosina es reemplazada por tirosina.(19)(30) También se observa pérdida de pelo, decremento del peso, cataratas y decremento de la fertilidad ya que se observa una suspensión del ciclo "estro".(26)

En rumiantes cuando son alimentados con una dieta que contiene más del 50% de *Leucaena glauca* se detecta en la orina un metabolito: 3,4-dihidroxipiridina que es formado a partir de mimosina por la microflora del rumen, el cual actúa como agente goitrogénico; sin embargo en animales no rumiantes no se

presenta lo anterior, sólo existe caída de pelo.(11)

En ratones los extractos de *Leucaena* destruyen la matriz de las células de los folículos capilares. Se reporta que mimosina es un inhibidor de la conversión de metionina a cisteína la cual es uno de los mayores componentes de la proteína del pelo.(28)

El contenido de mimosina en hojas y semillas de *Leucaena* puede disminuirse cuando se almacenan a una temperatura mayor de 70°C en aire húmedo ó combinando la harina de *Leucaena* con sulfato ferroso ó carbonato ferroso ya que de ésta manera se forma un complejo de mimosina con el ion ferroso, reduciendo la toxicidad.(28)(30)

PARTE EXPERIMENTAL.

1.- DETERMINACION DE PROTEINA VERDADERA.

FUNDAMENTO:

El método de Kjeldahl es comúnmente usado para determinar el nitrógeno total que contiene una muestra. En estudios de -- nutrición se acostumbra convertir la información sobre el ni-- trógeno en datos que indiquen el contenido de proteína. En la -- determinación de proteína verdadera sólo se incluye el nitóge-- no que se encuentra en la proteína ya que en una muestra pue-- den existir una serie de compuestos nitrogenados que no forman parte de la proteína; entre éstos se encuentran aminoácidos li-- bres que pueden ser comunes ó raros.

El método está basado en la solubilización del nitrógeno-- no proteínico así como de la proteína soluble (de ahí que la -- muestra deba estar finamente molida) y la posterior precipita-- ción de dicha proteína con tungstato de sodio, con el fin de -- eliminar el nitrógeno no proteínico que pueda interferir en la -- determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl.

Con éste método la proteína no soluble también es tomada-- en cuenta ya que en la etapa de filtración está incluida junto -- con la proteína soluble precipitada.

De ésta manera sólo existe nitrógeno proteínico y se pro-- sigue a realizar el método de Kjeldahl que consiste en: Dige-- stión; se le agrega a la muestra una mezcla digestiva (H_2SO_4 , - H_3PO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) con la cual la materia orgánica se oxida a--

dióxido carbónico y agua; el ácido sulfúrico se convierte en dióxido sulfúrico y el nitrógeno se fija en forma de sulfato de amonio. Destilación; se libera el amoniaco de su sal con una solución concentrado de hidróxido de sodio, recibiéndose en ácido bórico, con lo que forma borato de amonio. Este se titula con una solución valorada de ac. clorhídrico.

De ésta forma se obtiene el porciento de nitrógeno de la muestra. (3)(5)

MATERIAL Y REACTIVOS.

Balanza analítica.

Microdigestor marca TECATOR Mod. 8b

Microdestilador marca LABCONCO

Agitador magnético marca CORNING, con agitadores pequeños

Papel Whatman #4 de 7 cm. de diámetro

Tubos de digestión especiales marca TECATOR

Mezcla digestiva (a)

Solución de H_2O_2 30%

Solución de ácido bórico (b)

Solución de HCl 0.01N (valorado)

Solución de NaOH 60%

Solución precipitante (c)

Sulfato de potasio (Reactivo analítico)

(a) Mezcla digestiva: Se mezclan durante aproximadamente 30 minutos los siguientes reactivos en la siguiente proporción:

3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30 ml de H_2SO_4 (conc.) y 100 ml de H_3PO_4 .

(b) Solución de ácido bórico con indicadores: pesar 10 g de ácido bórico y colocarlos en un matraz de 2000 ml, se adiciona agua destilada hasta disolverlo, a continuación se agregan 70 ml de indicador A (100 mg de fenoftaleína aforados a 100 ml de alcohol etílico) y 20 ml de indicador B (33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 ml - con alcohol etílico).

Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido ó base según se requiera, se afora a 2000 ml.

(c) Solución precipitante: disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua, añadir 22 ml de HCl 2N y mezclar, aforar a 50 ml con agua destilada.

TECNICA.

a) Proceso de precipitación: pesar de 50-100 mg de muestra finamente molida (que pase por una malla de 1 mm) y colocarla en un vaso de precipitado de 50 ml. Agregar 5 ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 min., se agregan 2 ml de solución precipitante y se deja reposar 10 min., transferir - cuantitativamente para su filtración en papel Whatman # 4 utilizando 10 ml de agua destilada caliente y ligera succión.

b) Proceso de digestión: colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, al cual se le agregan 0.5g de K_2SO_4 , 5 ml de mezcla digestiva; se coloca en el digestor y se calienta aproximadamente 15 min., se retira del diges--

tor y se espera a que se enfríe para añadirle 3 ml de H_2O_2 al 30%, se introduce nuevamente al digester y se calienta hasta que la digestión sea completa (temperatura de digestión: 300-grados centígrados).

c) Destilación y Titulación: una vez efectuada la digestión se deja enfriar el tubo digester y se procede a la destilación -- para la cual se le agrega agua destilada (aproximadamente 10 - ml) para pasar cuantitativamente la mezcla digerida a la copa de adición del microdestilador enjuagando ésta con 1-2 ml de agua destilada dos ó tres veces. Después se añade al aparato de destilación por medio de la copa de adición, lenta pero en forma continua 10 ml de NaOH al 60%. El destilado se recibe en un matríz erlenmeyer que contenga 50 ml de solución de ácido bórico. Se lava la copa de adición con 15 ml de agua destilada y se procede a la destilación que se continua hasta completar un volumen de 150 ml aproximadamente. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre el ácido bórico, el indicador que ésta contiene vira del café rojizo al verde esmeralda. Finalmente el complejo nitrogenado formado se titula con el HCl 0,01N, hasta el vire del indicador, del verde esmeralda a rosa claro.

Nota.- Es conveniente correr un blanco dónde se incluya el papel filtro, cada vez que se prepara algún reactivo nuevamente.

CALCULOS.

$$\%N = \frac{(P-B) \times N \times N_{20} \times 100}{M}$$

B = ml de titulación del blanco

F = ml de la titulación de la muestra

N = normalidad del ácido clorhídrico

Meq = miliequivalente del nitrógeno (0.014)

L = gramos de muestra

% Proteína verdadera $\%N \times F \times 6.25$ g de proteína/100g de muestra

F: factor de conversión; cuando se considera que la proteína contiene un 16% de nitrógeno F=6.25

EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS LIBRES Y RAROS.

FUNDAMENTO:

a) Extracción.

La muestra finamente molida se le hace una extracción de aminoácidos libres con solución salina 0.9%. Se precipitan las proteínas con ac. pícrico y posteriormente se elimina éste por medio de una columna con resina de intercambio aniónico. (12) - (40)

b) Análisis cuantitativo y cualitativo de aminoácidos.

La determinación cuantitativa de aminoácidos libres y raros se lleva a cabo en un autoanalizador; separándolos en una columna con resina de intercambio iónico, usando buffers como eluyentes. La formación de un complejo colorido que es desarrollado al reaccionar el grupo α -amino con ninhidrina es directamente proporcional a la concentración del aminoácido, el cual es registrado en una carta. (34)

MATERIAL:

Aparato de extracción Goldfish "Lab-Conco"

Autoanalizador marca "TECHNICON" modelo NC-2P

Centrifuga "Lynac"

Columna de vidrio 37.7X1.0 cm.

Molino "Cyclone sample-Mill" CYCLO-TEC

Parrilla eléctrica "multi stir plate "4" marca "THERMOLYNE"

Rotavapor marca BRINKLANN modelo Rchi

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Acido clorhídrico 0.02N

Acido picrico 1.0% en agua

Resina de intercambio aniónico Dowex Ag 2-X8 malla 200-400

Eter etílico

Buffer pH=1.5

Buffer # 1 pH=3.5

Buffer # 2 pH=3.9

Buffer # 3 pH=4.15

Buffer # 4 pH=5.50

Ninhidrina 1.0%

Metil Celosolve 50%

Sulfato de hidrazina 2 mM

NaOH 0.2N

Manera de preparar los reactivos.

En la tabla 1 se muestra en forma resumida la preparación de las soluciones amortiguadoras de diferente pH.

TABLE 1

reactivos y Soluciones	Buffer # 1 pH=3.50 Regenerador de la columna.	Buffer # 2 pH=3.90 Para separar a.a. ácidos.	Buffer # 3 pH=4.15 Para separar a.a. neutros.	Buffer # 4 pH=5.50 Para separar a.a. básicos.
1.-Acetato de sodio anhidro (CH ₃ COONa)	4.0 g	4.1 g	5.0 g	85.0 g
2.-Ácido acético glacial.	40.0 ml	11.8 ml	11.0 ml	15.0 ml
3.-Solución de acetato de zinc 0.5M.	(-)	0.3 ml	0.6 ml	2.0 ml
4.-Etanol absoluto.	78.0 ml	78.0 ml	78.0 ml	(-)
5.-Alcohol benzílico.	(-)	(-)	(-)	11.0 ml
6.-Hidroquinona (antioxidante).	0.11 g	0.11 g	0.11 g	(-)
7.-Solución de trij-35 al 20%.	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml
8.-K ₂ CO ₃ sal disódica.	0.1 g	(-)	(-)	(-)
9.-Ácido caprílico.	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Agua destilada y desionizada.	c.s.p.l.	c.s.p.l.	c.s.p.l.	c.s.p.l.
Ajustar el pH	3.50±0.02	3.90±0.02	4.15±0.02	5.50±0.02

Disolver el acetato de sodio anhidro en 500 ml de agua desionizada, agregar los reactivos en el orden en que aparecen en la tabla 1 hasta el número 8, agregar agua desionizada hasta aproximadamente 900 ml. Ajustar el pH con un margen de seguridad de ± 0.02 unidades, inmediatamente después agregar el reactivo número 9 y aforar con agua desionizada.

Preparación de ninhidrina al 1%.

10 g de ninhidrina se disuelven en 500 ml de metil celosolve, en un vaso de 1 litro. Adicionar lentamente 250 ml de buffer de acetato de sodio 4N. Llevar a 1 litro con agua desionizada en un matraz volumétrico. Transferir el reactivo a un frasco y burbujearle nitrógeno durante 10 min. El reactivo debe reposar 24 horas antes de su uso.

Preparación de sulfato de hidrazina 2 mM.

0.2623 g de sulfato de hidrazina se disuelven en 900 ml de agua desionizada y agitar; adicionar 7.5 ml de solución Brij-35 al 20%, agregar 0.1 ml de ácido sulfúrico concentrado con el fin de acidular la solución. Se afora a 1 litro con ayuda de 0.2 ml de ácido caprílico.

TECNICA PARA LA EXTRACCION DE AMINOACIDOS LIBRES.

- 1.- Se pesan 5 g de muestra finamente molida (que pase por una malla de 1 mm).
- 2.- La muestra es desengrasada por un período de 8 horas con éter etílico.

3.- Se transfiere cuantitativamente a un vaso deprecipitado de 50 ml, se agrega un volumen de 5-7 ml de solución salina 0.9% y se agita mecánicamente durante 30 min; posteriormente se procede a centrifugar la solución durante 15 min a 4000 r.p.m., - el sobrenadante obtenido se transfiere a un matraz aforado de 25 ml. De ésta manera se hacen de 2-3 extracciones hasta completar 25 ml aproximadamente. El matraz es aforado y homogenizado.

4.- Tomar una alícuota de 10 ml a la cual se le agrega ácido - pícrico al 1.0% hasta que ya no haya precipitación de protei-- nas; para separar éstas proteínas se hace una centrifugación - por 30 min a 4000 r.p.m., se separa el sobrenadante.

5.- El sobrenadante se pasa a través de una columna de vidrio de 35.7x1.0 cm que contiene 2.0 cm. de altura de resina de intercambio aniónica Dowex Ag 2-X8 malla 200-400, con el objeto de eliminar el ácido pícrico. El eluado se recibe en un matraz de bola de 50 ml y debe ser un líquido transparente y cristalino.

6.- Para lograr que haya un mejor arrastre de los aminoácidos - libres, la resina es lavada con 5.0 ml de HCl 0.02N; esto se - repite tres veces.

7.- El eluado se concentra evaporándolo hasta sequedad en un - rotavapor marca Brinkmann modelo Röchi con una velocidad de gi - ro de 4-5.

8.- El residuo seco se resuspende en 10 ml de buffer pH=1.5. - De ésta solución se toma la cantidad deseada para inyectar.

CALCULOS.

a) μ Moles de aminoácido (B)

$$\frac{\text{Área del aminoácido} \times \mu\text{Moles del estándar}}{\text{Área del estándar}} = B$$

b) Gramos del aminoácido (C)

$$\frac{(B) \times (P.M.)}{10^6} = C$$

P.M. = Peso Molecular del aminoácido.

c) Miligramos de aminoácido/gramo de muestra.

$$\frac{(C) \times (d) \times (A) \times 10^3}{(a) \times (m)} = \text{mg de a.a./g de muestra}$$

A = Afore (ml)

a. alícuota (ml)

d. dilución

m = gramos de muestra

Estandar 1

Condiciones Físicas:

Temperatura de la columna: 60 °C

Dimensiones de la columna: 470 X 5 mm

Resina de intercambio catiónico C-3 TECHMICON

Altura de la resina 400±5 mm

Presión de la bomba: 600-800 psi, equivalente al flujo 0.6 ml/min

Temperatura de baño de reacción: 89 °C

Flujo de Ninhidrina (reactivo de coloración): 0.8 ml/min

Condiciones Químicas:

TIEMPO	BUFFER
5 min	buffer 1
60 min	Buffer 2
20 min	Buffer 2 con Buffer 3
50 min	Buffer 3
130 min	Buffer 4
20 min	NaOH 0.2N
30 min	Buffer 1

Estandar 2

Condiciones Físicas:

Temperatura de la columna: 50°C

Dimensiones de la columna: 470 X 5 mm

Resina de intercambio catiónico C-3 TECHNICON

Altura de la resina: 400±5 mm

Presión de la bomba: 600-800 psi, equivalente al flujo 0.6 ml/min

Temperatura de baño de reacción: 89°C

Flujo de Ninhidrina (reactivo de coloración): 0.8 ml/min

Condiciones Químicas:

TIEMPO	BUFFER
5 min	Buffer 1
120 min	Buffer 3
30 min	NaOH 0.2N
30 min	Buffer 1

RESULTADOS

MUESTRAS ESTUDIADAS.

MUESTRAS	NOMBRE CIENTIFICO
1.- Alverjón	<i>Canavalia ensiformis</i>
2.- Cacahuanano	<i>Gliricidia sepium</i>
3.- Chupacaya	<i>Mucuna argyrophylla</i>
4.- Colorín	<i>Erythrina americana</i>
5.- Frijol Bayo Blanco	<i>Phaseolus vulgaris</i>
6.- Frijol Flor de Mayo	<i>Phaseolus vulgaris</i>
7.- Frijol Negro Querétaro	<i>Phaseolus vulgaris</i>
8.- Guaje Morado	<i>Leucaena pulverulenta</i>
9.- Maguacata	<i>Phytocellobium flexicaule</i>
10.- Mescafé	<i>Stizolobium cinerium</i>
11.- Palo fierro	<i>Phytocellobium ondulatum</i>
12.- Pereta	<i>Entarlobium cyclocarpum</i>
13.- Pata de vaca	<i>Bauhinia purpurasc</i>
14.- Soya	<i>Glycine max</i>

RESULTADOS DE PROTEINA VERDADERA

Tabla 2

MUESTRA	% PROTEINA CRUDA	% PROTEINA VERDADERA	% NITROGENO NO-PROTEINICO
1.- Alverjón	25.55	19.05	25.52
2.- Cacahuanano	44.15	34.78	21.22
3.- Chupacays	19.32	14.47	25.06
4.- Colorín	30.67	28.42	7.33
5.- Frijol Bayo Blanco	18.33	17.49	4.58
6.- Frijol Flor de Mayo	16.27	16.08	1.17
7.- Frijol Negro Querétaro	21.95	19.30	12.07
8.- Guaje Morado	27.64	21.85	20.94
9.- Maguacata	19.31	13.89	28.07
10.- Mescafé	26.00	22.39	13.90
11.- Palo Pterro	27.52	18.29	33.51
12.- Parota	19.87	14.15	28.78
13.- Pata de Vaca	29.55	26.13	11.57
14.- Soya	36.73	34.79	5.29

Resultados de Aminoácidos Libres

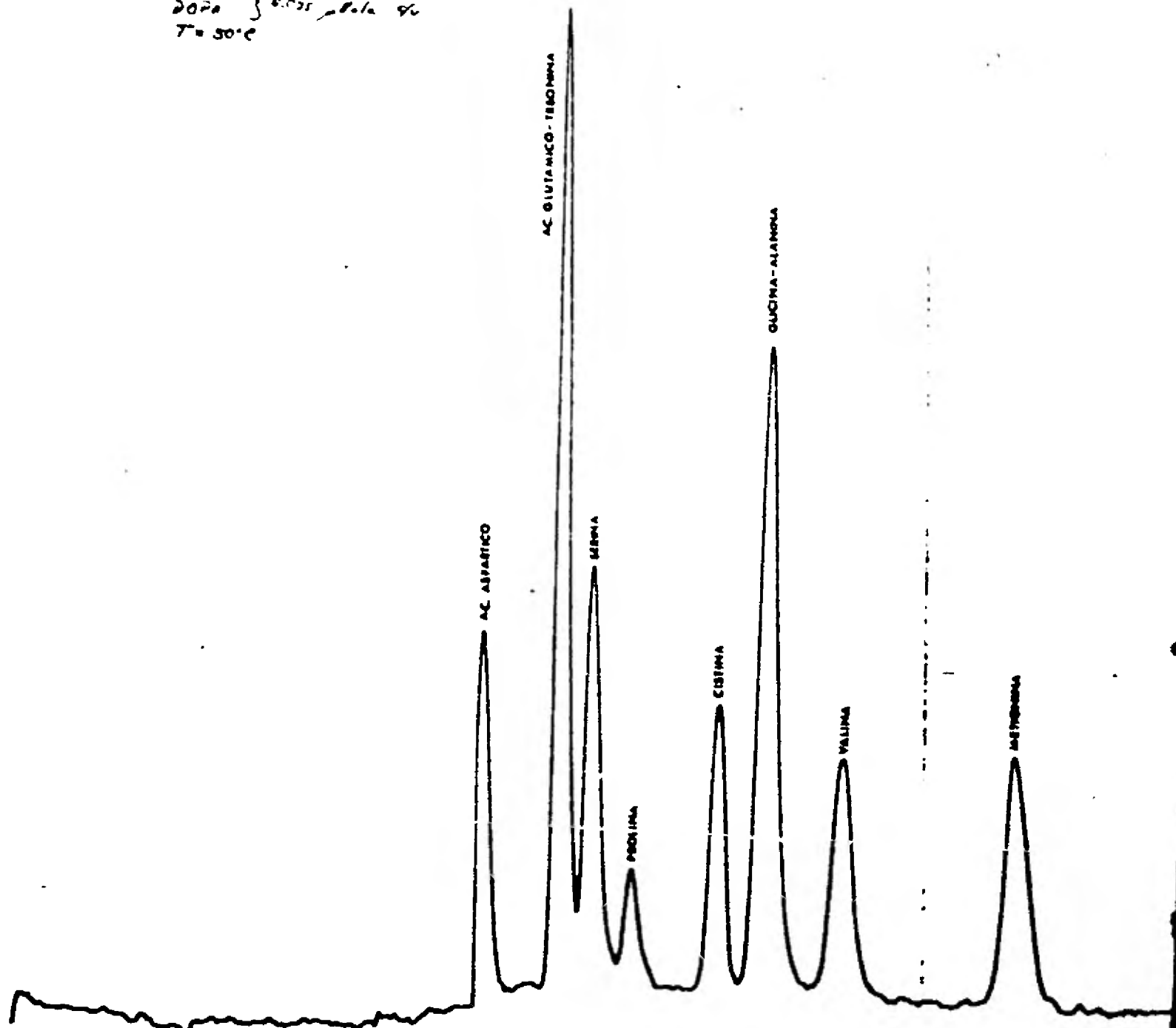
AMINOACIDOS RAROS ESTUDIADOS

- 1.- 3-aminopropionitrilo
- 2.- Canavanina
- 3.- Acido 2,4-diaminobutírico
- 4.- 3,4-dihidroxifenilalanina
- 5.- Acido Djencólico
- 6.- Homoarginina
- 7.- Homocistina
- 8.- Homoserina
- 9.- Mimosina

En las gráficas 1 y 2 se muestran los estándares de los aminoácidos libres estudiados, dentro de éstos se encuentran los aminoácidos raros antes mencionados.

GRAFICA 2

16/xi/21
SVL 2 o.e (17 o.e) 0.05 μ g/ml %
M... } 0.05 μ g/ml %
2020 }
T = 50°C



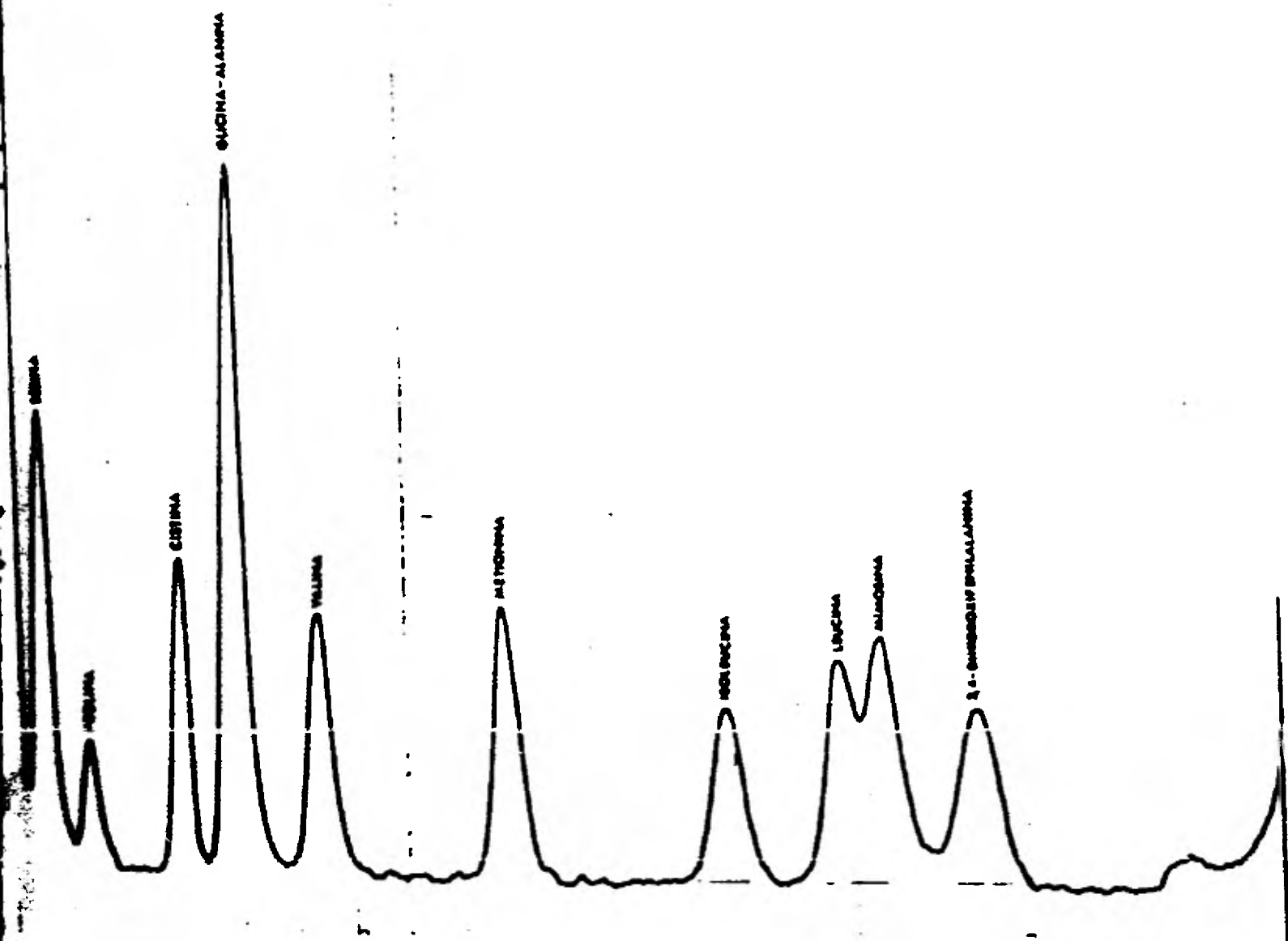


TABLA 3

	Alverjón	Cacahuatino	Guapeaya	Colorín
Aminoácido				
Acido aspártico		0.6452	0.2100	0.2246
Acido glutámico				
Glutamina	2.3850	10.1139	0.3622	1.8075
Tranorina				
Asparagina		0.2835		0.2215
Serina			0.0204	0.0887
Homoserina	1.1236	0.2142		0.1499
Prolina		0.1279	0.1519	0.0989
Glicina				
Alanina	0.7797	1.5396	0.3934	1.0560
Cistina				
Valina	0.0645	0.1158	0.0258	0.1450
Acido Diencólico	0.0709	0.0518		
Metionina		0.0377		0.0415
Isoleucina	0.0626	0.0673		0.0717
Leucina	0.0860	0.0150		0.1158
Himosina				
DOPA			11.8753	
Tirosina	0.0200	0.1083	0.1634	0.0925
Vanilalamina	0.0383	0.2048	0.0834	0.1687
Homocistina				
Lisina	0.0797	0.1504	0.0223	0.0127
Histidina	0.0350	0.0644	0.0113	0.1374
Ac. 2,4-diaminoutrico				
Amoniaco	0.0216	1.8463	0.0677	0.0513
Canavarina	14.6466	33.4045		0.0456
3-aminopropionitrilo				
Arginina	0.1605	0.6249	0.3601	0.2574
Homocarginina				

mg de aminoácido/g de muestra

TABLA 4

Aminoácido	Frijol Negro Querétaro	Guaje Morado	Magueceta	Nescafe
Acido aspártico	0.3464		0.5792	0.3205
Acido glutámico				
Glutamina	0.9226	12.1309	31.4618	0.6132
Treonina				
Asparagina	0.2251	4.0131		
Serina	0.0851			0.0489
Homoserina	0.1306			0.0907
Prolina	0.1998			0.5001
Glicina				
Alanina	0.7110	8.4729	0.6831	0.9348
Cistina				
Valina	0.1321	0.8640	0.0262	0.0774
Acido Diacéptico		1.6510	0.2907	
Metionina		0.2639		
Isoleucina	0.0454	0.5390		
Leucina	0.0527			
Micosina		16.2893		
DOPA				5.4962
Tirosina	0.0404	0.3868		0.0820
Fenilalanina	0.0460	0.6370		0.3443
Homocistina				
Lisina	0.0206	0.5803	0.0384	0.1176
Histidina	0.0032	0.4975	0.1459	0.0738
Ac. 2,4-diaminobutírico				
Amónico	0.0203	0.4376	0.0340	0.2183
Canavanina				
β-aminopropionitrilo				
Arginina	0.3981	4.0201	0.5412	0.1198
Homoarginina				

mg de aminoácido/g de muestra

TA 4A 5

Aminoácido	Palo Fierro	Parota	Fata de Vaca	Soya
Acido aspártico	0.1905	0.2910	0.2052	0.2914
Acido glutámico	9.0260		4.6445	0.8295
Glutamina				
Treonina				
Asparagina	5.2003	11.2455	1.5075	2.2711
Serina			0.4286	0.1545
Homoserina	0.5189	0.0815	0.1097	0.1483
Prolina	0.5359	0.1579	0.0372	0.0759
Glicina	6.3275	0.678	0.9338	0.8367
Alanina				
Cistina				
Valina	0.8675		0.0959	0.0813
Acido Diacético	2.1162			0.0606
Metionina	0.1726		0.0556	
Isoleucina	0.4140		0.0465	0.0570
Leucina			0.0703	0.0617
Mimosina	8.5740			
DOPA				
Tirosina	0.4523		0.0703	0.0754
Fenilalanina	0.5156		0.0718	0.0420
Homocistina				
Lisina	0.3557	0.0405	0.1020	0.1147
Histidina	0.2159	0.0912	0.0382	0.0583
Ac. 2,4-diaminobutírico				
Amónico	0.3317	0.405	0.0782	0.0351
Cenoverina			0.1222	
3-aminopropionitrilo				
Arginina	3.6867	0.2359	0.1659	0.8128
Homocarginina				

mg de aminoácido/g de muestra

TAHA 6
MUESTRAS

MUESTRAS	% AMINOACIDOS LIBRES	SUMA DE %PROTEINA VERDADERA+%AMINOACIDOS LIBRES.	%COMPUESTOS NI-TRÓGENADOS *
1.- Alverjón	1.964	21.014	4.576
2.- Cacahutano	4.995	39.775	4.375
3.- Chupabaya	0.211	14.681	4.039
4.- Colorín	0.483	28.903	1.707
5.- Frijol Negro	0.338	19.638	2.312
6.- Guaje Morado	5.078	26.928	0.712
7.- Maguacata	3.366	17.256	2.054
8.- Macafe	0.906	23.293	2.707
9.- Palo Fierro	3.730	22.020	5.500
10.-Parota	1.255	15.405	4.465
11.-Pata de Vaca	0.918	27.048	2.502
12.-Soya	0.406	35.196	1.534

*%Compuestos Nitrogenados que no forman parte de la proteína ni de aminoácidos libres.
= (%Proteína Cruda) - (%Proteína Verdadera + %A.A.Libres)

En la tabla 2 se observan los resultados de la proteína verdadera de las 14 semillas en estudio.

En las gráficas 1 y 2 se pueden observar los estándares de los aminoácidos usados para detectar los aminoácidos raros estudiados.

Se usaron dos aminogramas los cuales se diferencian por la temperatura de la columna y los diferentes tiempos de elución de los buffers. Un aminograma se corrió a 60°C, con el cual se separan todos los aminoácidos raros con excepción de la Mimosina y DOPA, el otro aminograma se corrió a 50°C y a esta temperatura se observa una clara separación de Mimosina y DOPA.

De los 9 aminoácidos estudiados en este trabajo únicamente 5 de ellos fueron detectados en las 12 especies de leguminosas analizadas, éstos fueron:

Homoserina, Ac. Djencólico, Mimosina, DOPA y Canavanina.

Homoserina.

Este aminoácido se identificó en 9 semillas y no apareció en Chupabaya, Guaje morado y Maguacata. Homoserina aparece como un aminoácido ácido por encontrarse entre serina y prolina.

En el Alverjón es en la semilla que se encuentra en mayor cantidad, esto se puede ver en la tabla 3.

ácido Djencólico.

Este aminoácido se detecta en el aminograma entre valina y metionina, aparece en Alverjón, Cocahuasano, Guaje morado,-

Maguacata, Palo fierro y soya, encontrándose en mayor cantidad en Guaje morado, Palo fierro y Maguacata, ésto se confirma en las tablas 4 y 5.

Mimosina.

El aminoácido mimosina se registra entre leucina y DOPA en la carta del aminograma y se encontró en Palo fierro y Guaje morado en una cantidad de 0.857 y 1.629 por 100 g de muestra respectivamente, observándose que es el aminoácido libre en mayor cantidad en éstas dos semillas.

DOPA.

Aminoácido neutro que aparece en el aminograma entre mimosina y tirosina, fué detectado en las semillas de Chupabaya. y Nescafé únicamente observándose que en Chupabaya es el aminoácido libre en mayor cantidad, se encuentra en una proporción de 1.187 g de aminoácido por 100 g de muestra.

Canavanina.

La canavanina es un aminoácido básico detectado después del amoniaco en la carta del aminograma, se identificó en Cacahuanano, Alverjón (ya reportado), Pate de vaca y Colorín encontrándose en grandes cantidades en Cacahuanano (3.34g/100g de semilla) y en Alverjón (1.464g/100g de semilla), en el resto de las muestras sus cantidades son pequeñas.

Se observa también que canavanina es el aminoácido libre que se encuentra en la mayor cantidad tanto en Cacahuanano como en Alverjón.

Otros aminoácidos raros no identificados.

Aparece un pico de un aminoácido desconocido muy cerca del lugar en donde se detecta la homocistina en varias semillas que son las siguientes:

Cacahuanano, Chipobaya, Colorín, Guaje morado, Pata de vaca y - Soya.

Otro aminoácido desconocido aparece en varias semillas, antes de que se registre el amoníaco, tales semillas son:

Cacahuanano, Colorín, Guaje morado y Pata de vaca.

Varios aminoácidos desconocidos aparecen antes del ácido aspártico en cantidades muy considerables tanto en Cacahuanano, Palo fierro y Guaje morado, en cantidades mas bajas en Maguaceta.

Existen otros aminoácidos detectados antes del ácido glutámico en grandes cantidades en Cacahuanano, Maguaceta y Colorín.

Solamente en Cacahuanano aparece un pico de tamaño pequeño entre arginina y homocarginina.

En Guaje morado se detectan dos aminoácidos desconocidos, un pico pequeño después de metionina y el otro de tamaño grande que se encuentra después de fenilalanina.

En las tablas 3,4 y 5 se pueden observar los resultados -- tanto de los aminoácidos libres tanto comunes como raros y se puede ver que las concentraciones de éstos varían ya que se encuentran desde cantidades muy pequeñas hasta bastante considerables.

DISCUSION DE RESULTADOS.

En la tabla 2 se puede ver tanto en Colorín como en Soya el % de nitrógeno no proteínico es bajo ya que éste es de 7.33 y 5.29% respectivamente, no así en el Frijol Negro, Nescafe y Pata de vaca en los cuales el % de nitrógeno no proteínico es de 12.07, 13.90 y 11.57 respectivamente, esto nos indica que las semillas ya contienen un valor más alto de nitrógeno que no forma parte de las proteínas. El resto de las semillas contienen un porcentaje de nitrógeno no proteínico que varía entre 20% y 34% lo que nos dice que éstas semillas contienen un alto contenido de nitrógeno no proteínico, lo que no sucede con la Soya y Colorín, que casi el total de nitrógeno es proteínico.

Observando las tablas 4 y 5 se puede ver que en varios casos gran parte del nitrógeno no proteínico es debido a aminoácidos libres el cual está entre 1% y 5% como en Alverjón, Caca huanano, Guaje morado, Maguscata, Palo fierro y Parota, observando que el Guaje morado es el que contiene mayor cantidad de aminoácidos libres (5.07%).

El resto de las semillas contienen menos del 1.0% de aminoácidos libres, esto no implica que su contenido de proteínas sea casi el total del nitrógeno determinado, ya que como podemos ver en la tabla 6 la Soya y el Colorín tienen una cantidad baja de aminoácidos libres y su proteína verdadera es alta, no así en Chupsoya que contiene un 0.211% de aminoácidos libres, pero también su proteína verdadera es baja y aún tiene una alta cantidad de compuestos nitrogenados que no son ni aminoáci-

dos ni proteínas.

También se puede ver que en las semillas que contienen -- alto contenido de aminoácidos libres como el Alverjón, Cacahuano, Palo fierro y Parota aún tienen un alto contenido de compuestos nitrogenados que no son proteína; en el caso del Guaje morado la suma de la proteína verdadera y los aminoácidos libres casi es el total de la proteína cruda, lo que nos indica que la cantidad de compuestos nitrogenados que no forman parte ni de la proteína ni de los aminoácidos libres es mínima (0.7%) y que el aminoácido libre en mayor proporción es la mimosina.

CONCLUSIONES.

- 1.- De las leguminosas estudiadas la mayoría tienen alto contenido de proteína verdadera la cual hace que ellas puedan -- ser empleadas para la alimentación animal ó humano,
- 2.- Algunos de los aminoácidos detectados son tóxicos como la canavanina, mimosina y ac. djencólico que fueron encontrados en algunas muestras; dentro de éstos sabemos que la mimosina se destruye con el calor, con lo que se elimina; pero sobre la eliminación de canavanina y ácido djencólico de las semillas no se han hecho estudios.
- 3.- El DOPA que está presente en Chupabaya en alta cantidad - puede ser utilizado para fines terapéuticos debido a que se - puede emplear en la enfermedad del Parkinson.
- 4.- Los aminoácidos ac. 2,4-diaminocoumárico, 3-aminopropionitrilo y homocisteína que comúnmente se encuentran en especies de Lathyrus no fueron detectados en las muestras en estudio.
- 5.- La homocistina, aminoácido del cual no encontramos ningún estudio no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

El presente estudio ha servido para conocer más sobre la composición de compuestos nitrogenados que no forman parte de las proteínas. La importancia que pudiera tener desde el punto de vista nutricional y toxicológico la presencia de aminoácidos raros y finalmente haber logrado establecer una metodología que permite medir nueve aminoácidos raros no proteínicos por un procedimiento rápido y exacto.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Altschul, A.M. "New Protein Food"
Vol. 1, pag 282, Academic Press, N.Y. (1974).
- 2.- Armstrong, du Vigneaud. "A New Synthesis of Djencolic Acid"
J.Biol.Chem. 168, 373 (1947).
- 3.- Association of Official Agricultural Chemists.
"Official Methods of Analysis"
Washington D. C., 1975 20a Edición pag. 238.
- 4.- Aykroyd, W. R. y Doughty, J. "Las leguminosas en la Alimentación Humana".
FAO: Estudios sobre nutrición, No. 19, Roma (1964)
- 5.- Bateman John. Nutrición Animal. Manual de Métodos Analíticos.
Ed. Herrero Hermanos, Sucesores S.A., 1969, .pag. 170.
- 6.- Ball, E.A. Canavanine and Related Compounds in Leguminosae.
Biochem. J., Vol. 70, 617 (1958).
- 7.- Ball, E.A. Associations of Ninhidrin-Reacting Compounds in the seeds of 49 species of Lathyrus.
Biochem. J. Vol.83, 225 (1962).
- 8.- Ball, E.A. α - γ -diaminocutyric Acid in Seeds of Twelve Species of Lathyrus and Identifications of New Natural Amino-Acids L-Homoarginine, in Seeds of Other Species Toxic to Man and Domestic Animals.
Nature. Vol. 193, 1078 (1962).
- 9.- Ball, E.A. The isolation of L-Homoarginine from seeds of -

Lathyrus Cicera.

Biochem. J. Vol. 85, 91 (1962).

10.- Bell, E.A. Uncommon Amino Acids in Plants.

FEBS Letters. Vol. 64. 29 (1976).

11.- Bell, E.A. The non protein aminoacids in higher plants.

Endeavour. Vol. 4(3), 102 (1980).

12.- Cornejo Barrera Lucia. Evaluación Nutricional de Niños --

Lactantes y Preescolares. Tesis. Fac. de Química UNAM, --

México 1976.

13.- Creansa R.C., et al. Inhibition of growth of hair by amino-

sins. Nature (Lond). Vol. 194, 694 (1962).

14.- Davies Giovanelli Rees. Bioquímica Vegetal.

Ed. Omega, S.A. Barcelona 1969 pag. 428.

15.- Díaz de Sando Barrera Jaime. Evaluación Nutritiva de Le--

guminosas Silvestres. Tesis Fac. de Química UNAM, México-

1976.

16.- Ehrhart, L.A., et. al. Preparation, Metabolism and Toxicity

of Certain Acyl Derivatives of β - aminopropionitrile.

Biochemistry. Vol. 2, 300 (1968)

17.- Evans, C.S. and Bell, E.A. Non Protein Amino Acids of Aca-

cia Species and Their effect on the Feeding of the Acri--

did *Sacridium Malabarharson* and *Locusta Migratoria*.

Phytochemistry. Vol. 18, 1807(1979)

18.- Fisher, B. and Bander, A.E. Valor Nutritivo de los Alimen-

tos. Ed. Limusa. 1ª Edición 1978.

19.- Fowden, L. , et. al. Toxic Amino Acids: Their Action as -

- Antimetabolites. *Enzymol.* Vol. 29, 89 (1967).
- 20.- Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press. pag. 225-227 (1974)
- 21.- Grant, D.R. and Voelkert, E. The Effect of Temperature -- and Light on the Accumulation of Homoserine in Pea Seedlings. *Phytochemistry.* Vol. 9, 985 (1970).
- 22.- Grant, D.R. and Voelkert, E. The Fate of Homoserine-¹⁴C in Germinating Peas. *Phytochemistry.* Vol. 11, 911 (1972).
- 23.- Greentain and Winitz. *Chemistry of the Amino Acids.* Vol. 3, pag. 2622-2625, 1961. Wiley, New York.
- 24.- Grobbelaar, N. and Steward, F.C. The Isolation of Amino Acids from *Pisum Sativum*. *Phytochemistry.* Vol. 8, 553 -- (1969)
- 25.- Hegarty, M. P., et al. The Determination of Limosine and 3,4-dihidripiridina. *Aust.J. Agric. Res.* Vol.15, 153(1964)
- 26.- Hylin, J.W. Production of Reversible Infertility in Rats - by Feeding Limosine. *Biochemical Pharmacology.* Vol. 14, - 1167 (1965)
- 27.- Janzen, D.H. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating Larvae of the Bruchid Beetle *Callosobruchus Maculatus*. *Phytochemistry.* Vol. 16, 223 (1977).
- 28.- Liener Irvin E. *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.* Academic. Press. Second Edited. pag 436-441(1980)
- 29.- Liener Irvin E. Toxic Factors in Edible Legumes and their Elimination. *World Mark International Documentation.* Vol. D, pag. D184 (1961)

- 30.- Linder Ernest. Toxicología de los Alimentos.
Ed. Acriba. Zaragoza España. 1978
- 31.- Natelson, B.H. Beans.- A source of L-DOPA.
The Lancet. Vol. 20, 640 (1969).
- 32.- Navon, A. and Bernays, E.A. Inhibition of Feeding in Acri-
dis by Non-protein Amino-Acids. Comp.Biochem. Physiol. -
Vol. 59A, 161 (1978)
- 33.- Rao, S.L.N. and et al. The Isolation and Characterization-
of L-Homoarginine from Seeds of Lathyrus Sativus.
Biochemistry. Vol. 2, 298 (1963)
- 34.- Stein, W. and Moore, S. Chromatographic Determination of-
Amino Acid by the use of Automatic Recording Equipment.
Method in Enzimology. Vol. VI, 819-848. Academic Press.
New York and London, 1963.
- 35.- Strong, F.M. Lathyrismo and Odorarism.
Nutrition Reviews. Vol.14, 65 (1956)
- 36.- Toxicants Occurring Naturally in Foods. National Academy of
Sciences. Washintong D.C. 1973 2nd Edition.
- 37.- Turner, B.L. and Harborne, J.B. Distribution of Canavani-
ne in the Plant Kingdom. Phytochemistry. Vol. 6, 863(1967)
- 38.- Vincent. du Vigneaud. The isolation of Homocysteine and -
its conversion to the lactone.
Riegal J. Biol. Chem. Vol. 112, 149 (1935)
- 39.- Virtanen, A.I., and et. al. Formation of Homoserine in --
Germinating Pea Seeds.
Acta Chemica Scandinavica. Vol-7, 1423 (1953)

- 40.- Walter, R. Akesson and Mark, A. Stahmann. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation.
The Journal of Nutrition. Vol 83, 257 (1964)
- 41.- Wilson, M.F. and Bell, E.A. Amino Acids and β -aminopropio nitrilo as inhibitors of seed Germinating and Growth.
Phytochemistry. Vol. 17, 403 (1978)
- 42.- Yasuhiro Yamada, et. al. An Improved Synthesis of D-L-canavanins.
Agr. Biol. Chem. Vol. 37(9), 2201 (1973)