

32
2cy.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

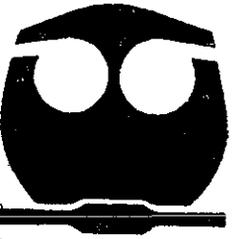


EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INACTIVACION DE LECTINAS EN *Canavalia ensiformis*
EMPLEANDO RADIACION NO-IONIZANTE A DIFERENTES
CONDICIONES DE ACIDEZ Y ALCALINIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
GABRIELA GUADALUPE MORANCHEL CID



MEXICO, D. F.

1998

CON
ORIGEN

259203



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 está 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 SEGÚN EL TEMA

PRESIDENTE: Profra. Pedro Valle Vega

VOCAL: Profra. Lucía Cornejo Barrera

SECRETARIO: Profra. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez.

1^{er} SUPLENTE: Profra. Bertha Julieta Sandoval Guillén

2^{do} SUPLENTE: Profra. Ma. del Carmen Durán Domínguez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Facultad de Química, UNAM. CIUDAD UNIVERSITARIA, 04510 México, D.F.
LABORATORIO B-201, LABORATORIOS C-2 Y A-4, EDIFICIO A.

ASESOR DEL TEMA:

M en C. Hilda E. Calderón Villagómez



SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Ing. Ma. del Carmen Durán Domínguez



SUSTENTANTE

Gabriela Guadalupe Moranchel Cid



DEDICATORIAS

A quien me dio el ser y me quiere sin esperar nada a cambio, a mi querida madre **TERESA**.

A quien aunque ya no este conmigo pero a quien siempre llevo en mi corazón, a mi padre **MARIO**.

A todas mis hermanas, **Rosario, Piedad, Laura, Valentina y Beatriz**, por su apoyo incondicional, por estar conmigo en los momentos más difíciles y en los mas alegres, por soportar mi mal humor y por ayudarme a alcanzar esta meta que es tan importante para mi, gracias.

A la memoria de un gran amigo y profesor, que siempre estuvo cuando lo necesité y quien me ayudó siempre con una sonrisa en su rostro, **HUGO SOUSA**.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Hilda Calderón Villagómez, por su asesoría, su apoyo y amistad durante la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Camen Durán de Bazúa por su asesoría, apoyo y tiempo dedicado en la estructuración y desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del Bioterio y especialmente al Doctor. Atonatiu Gómez, por toda la ayuda facilitada durante la realización del trabajo experimental de esta tesis.

Al laboratorista del laboratorio 4B Don Juanito, por toda la ayuda brindada y por su amistad durante parte de la carrera.

A Adriana compañera y amiga de carrera. por compartir conmigo momentos gratos y momentos difíciles. por todo lo bueno y todo lo malo y por todo lo vivido juntas. gracias.

A Rolando "Corazón de mi vida" por su amistad incondicional por estar conmigo en las buenas y en las malas. gracias.

A Gerardo. por toda la ayuda prestada y por brindarme su amistad.

A todos los compañeros del laboratorio 201, Ma. Elena, Marta, Orlando y Joel.

4.3. Determinación de lectinas	25
4.3.1. Extracción de lectinas	25
4.3.2. Obtención de eritrocitos	25
4.3.3 Pruebas de aglutinación	26
4.4. Equipamiento utilizado	28
4.4.1. Equipos	28
4.4.2. Material	28
4.4.3. Reactivos	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. Resultados preliminares	31
5.2. Resultados finales	34
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	46
APÉNDICE A-1	50
APÉNDICE A-2	58

RESUMEN

Canavalia ensiformis es una leguminosa que crece en las zonas semidesérticas y cuyo uso para consumo pecuario o humano está restringido por su contenido natural de compuestos antinutricios. Se planteó el uso de la radiación no ionizante en adición a medios ácido HCl y alcalino $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para inactivar algunos de estos compuestos químicos (principalmente aquéllos que son termolábiles) y hacer las harinas resultantes comestibles. Se usaron semillas provenientes del Campo Experimental Tizimín, Yucatán, México, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Los granos se molieron y tamizaron hasta malla 20. Se caracterizaron mediante análisis proximal (humedad, cenizas, fibra cruda, grasa cruda, proteína cruda e hidratos de carbono obtenidos por diferencia de los demás constituyentes, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el manual de AOAC). Para acondicionar las harinas (modificar su pH inicial) se agregaron soluciones de HCl 0.02%, 0.05% y 0.1% (p/v) y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02%, 0.05% y 0.1% (p/v), hasta formar una suspensión (atole), de cada muestra, usando como control suspensiones con agua destilada. Se homogeneizaron y sometieron a tratamiento térmico empleando un horno de microondas comercial (marca Goldstar, 2450 MHz), seleccionando la fuente de poder en su nivel más alto de energía (High: power-90), con tiempos de residencia que van de 0.5 min hasta 5 min. El parámetro de control fue la presencia de lectinas antes y después del tratamiento. El grado de inactivación de las lectinas se evaluó empleando glóbulos rojos de sangre de conejo mediante pruebas de aglutinación. Los resultados indican que la inactivación de las lectinas se lleva a cabo en forma más satisfactoria en muestras de harina de *C. ensiformis* preparadas en forma de atoles adicionando HCl al 0.1% (p/v), y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 0.02% (p/v), con un tiempo de exposición en radiación no ionizante de 5 min para ambos casos, obteniéndose con estas condiciones títulos de 0 (lo que significa que no hay aglutinación). Al realizar el análisis químico proximal de las muestras tratadas se determinó un contenido de proteína cruda de 27.14% b.s y de 28.57% b.s. para el caso de las muestras con HCl 0.1% y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02% y 5 min de exposición, respectivamente. El contenido de proteína inicial en la muestra de harina cruda de *C. ensiformis* fue de 33.04% y su título de 19. Esto significa que el tratamiento empleando radiación no ionizante adicionada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (un reactivo barato y de fácil acceso) para inactivar las lectinas da buenos resultados y no altera significativamente el contenido proteínico del grano de *C. ensiformis*

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la energía no ionizante sobre las lectinas presentes en la leguminosa *Canavalia ensiformis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar el tiempo óptimo de inactivación de las lectinas en un horno de microondas comercial a diferentes valores de pH.

Determinar las condiciones de pH óptimas para inactivar las lectinas

Determinar el efecto de la energía ionizante sobre los constituyentes (proteínas) de *Canavalia ensiformis*.

3. ANTECEDENTES

3.1. Composición, aplicación y uso de las leguminosas

Las leguminosas son especies de la familia Fabaceae, integran la tercera familia más numerosa de las fanerógamas. Existen cerca de 650 géneros y más de 1800 especies. El valor nutritivo de las leguminosas se atribuye a su alto contenido de proteínas (20-25%), elevado contenido de almidón (Elinbaum y Bonomo, 1990) y fibra, son fuente importante de hierro, fósforo, tiamina, lisina, riboflavina y niacina (Moguel-Ordóñez y col, 1996).

La composición de nutrimentos de estas leguminosas depende de diversos factores como son la especie, el suelo de cultivo, el clima, etc. por ello sus aplicaciones en nutrición humana y animal han sido diversas. Así, en función de su composición, han sido empleadas de forma directa como ingredientes de las dietas o de piensos compuestos (Fernández y Larralde, 1989), preparación de concentrados y aislados de proteínas (Duke, 1981) así como ingrediente de alimentos formulados a base de mezclas con cereales ya que éstos son pobres en lisina pero ricos en metionina, constituyendo un alimento especial con alto contenido de proteína de origen vegetal (Elinbaum y Bonomo, 1990).

Todas estas posibilidades de uso, en muchos casos, se ven restringidas o, en su defecto, excluidas para consumo pecuario o humano debido al alto contenido natural de compuestos antinutricios que presentan algunas especies de esta familia. Tal es el caso de *C. ensiformis*.

3.2. *C. ensiformis*: Producción y composición

C. ensiformis, es una leguminosa que crece en zonas semidesérticas (de ahí su importancia), que ha mostrado altos rendimientos en Venezuela, como lo indican los siguientes datos: Materia seca total (7000 kg/ha) y granos (3000 kg/ha) (Emaldi y Pérez, 1990). En el estado

de Yucatán, al sureste de la República Mexicana, se tuvo una producción de 1,800 kg/ha de semillas secas con 30% de proteína cruda. En 1980, la producción máxima de este grano fue de 2,570 kg/ha/año con un contenido de proteína cruda del 29% al 33% (Durán y col, 1991).

Estos datos obtenidos tanto en Venezuela como en Yucatán, muestran que la leguminosa *C. ensiformis*, puede ser producida con relativa facilidad, en condiciones de temporal, regiones de baja altitud con altas temperaturas y alta humedad relativa, en suelos de mala calidad, rocosos y alcalinos (pH 7.5-8.0), como sería el caso de la zona peninsular de Yucatán donde se pueden alcanzar rendimientos de 4,250 kg/ha de esta leguminosa (Duch, 1988) . Estos datos muestran que son rendimientos más altos que algunas fuentes convencionales de proteína y energía.

La siembra de *C. ensiformis* no implica problemas de tecnología, ya que las prácticas de campo para su cultivo son conocidas por los agricultores; se siembra como cultivo de cobertura y asociado con el maíz, la siembra es en hileras con una distancia de 100 cm y entre plantas de 50 cm. las hileras de *C. ensiformis* se intercalan con las del maíz. La producción de vaina es de 350 g/m² en los suelos someros, la producción de la planta completa es de 4,250 kg/ha. En los suelos profundos la producción se duplica (UADY, 1996).

En otro estudio se indica que el grano de *C. ensiformis*, ha mostrado alto rendimiento en promedio de 3000 kg/ha cantidad que supera los valores normales señalados para otras leguminosas en parcelas experimentales de granos y en biomasa aérea, en cultivos con dosis bajas de fertilizantes o sin aplicación, aunque lógicamente los niveles de rendimiento en grano varían con las condiciones ambientales, manejo y variedades empleadas (Douglas y Viera, 1990).

Esta leguminosa es menos sensible que el frijol o cereales como el maíz a plagas debido al alto porcentaje de agentes tóxicos que están presentes en la leguminosa. Por el tamaño de sus semillas se presta para la siembra, cosecha y desgrane manual.

Localmente recibe nombres como alverjón, haba de burro, alubia criolla, diente de caballo, entre otros. El rendimiento de este grano rebasa con creces al del frijol (540 kg/ha, en el

ciclo primavera-verano; Sagar, 1995), la leguminosa más ampliamente consumida en México en condiciones similares de cultivo. El grano de *Canavalia ensiformis* es también una fuente importante de minerales y cuenta con un alto contenido de fósforo (Carbajal, 1988). Presenta aproximadamente 30% de proteína cruda y cerca del 60% de carbohidratos totales. Existen datos que indican que estos carbohidratos pueden ser empleados como fuente de energía y el almidón de este grano es un nutrimento similar al de otras leguminosas, tubérculos y cereales como son: maíz, arroz, papa, sorgo y trigo, los cuales presentan un porcentaje de amilosa de 28, 17, 21, 28, 28 respectivamente en comparación con 37.5% en *C. ensiformis* (Moguel-Ordóñez y col, 1996). El contenido de proteína cruda (29.91% en base seca), además de un cociente leucina/isoleucina (2.4), mayor que el presentado por la FAO como cociente patrón de referencia (1.1), constituyen las principales ventajas nutrimentales del cultivo (Emaldi y Pérez, 1990).

A pesar de las grandes ventajas expuestas, el grano de *C. ensiformis* y las leguminosas en general como ya se mencionó, contienen factores tóxicos y antinutrimientales como son: glucósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina, factores antivitaminicos, aminoácidos no proteicos y lectinas. Justamente la presencia de estas sustancias son las que le permiten tener tan altos rendimientos en el campo, ya que pocas plagas pueden atacar a la planta y especialmente a sus semillas (Gómez-Rodríguez, 1986). Se han realizado varios estudios sobre inactivación de lectinas en leguminosas. utilizando calor húmedo a presión atmosférica, autoclave o tratamiento térmico alcalino. Las investigaciones realizadas en este último tratamiento indican un aumento en la digestibilidad de la proteína. el contenido de aminoácidos permanece casi invariable y la relación metionina-cisteína y la cantidad de lisina disponible disminuyen cuando la concentración de cal utilizada es alta. Crail-Chávez y Dávila-Ortiz (1989) demostraron que, al aplicar conjuntamente un tratamiento térmico alcalino. se obtienen mejores resultados que utilizando solo uno de ellos, debido a que hay una reducción del tiempo de cocción y se facilita la desnaturalización de las proteínas de reserva sin alterar la composición de aminoácidos en general, aumentando la digestibilidad de la proteína. En otros estudios ha sido utilizada la radiación no ionizante como fuente de inactivación de lectinas del grano "red kidney" obteniéndose resultados aceptables de inactivación, pero la acción se llevó a cabo sobre las hemaglutininas purificadas en solución

(Mancini y Vizav, 1974) y no sobre la harina del grano no pudiendo concluir sobre el efecto de este tratamiento en sus demás constituyentes.

En otro estudio se aplicó la radiación no ionizante sobre “*porotos alubia*”, obteniéndose magníficos resultados en cuanto a su contenido de lisina disponible, índice de dispersibilidad de proteína, absorción de agua, pseudoplasticidad y propiedades de pasta de las harinas obtenidas después de aplicar el tratamiento (Elinbaum y Bonomo, 1990). La parte innovadora de este proyecto consiste en usar la radiación no ionizante como fuente de inactivación utilizando condiciones ácidas y alcalinas a fin de reducir el tiempo de exposición en el horno de microondas y minimizar el daño a la proteína protegiendo sus propiedades nutrimentales y funcionales. También se debiera aumentar la digestibilidad de la proteína como resultado de la destrucción de la estructura terciaria de ciertas proteínas que ofrecen resistencia a la hidrólisis enzimática. Otra ventaja más es la disminución de costos debido a la reducción del gasto de energía, atribuida al tiempo en que se logra la inactivación.

3.3. Lectinas

3.3.1. Historia

La primera descripción de lo que hoy se conoce como lectina fue hecho por Stillmark en 1888. que encontró que las semillas de la higuera (*Ricinus communis*), contenía una proteína altamente tóxica que era capaz de aglutinar glóbulos rojos. En 1908, Landsteiner y Raubitscheck observaron que los extractos crudos obtenidos de muchas semillas comestibles mostraban diferentes actividades hemaglutinantes sobre eritrocitos de varias especies animales. Compararon estas actividades con las de los anticuerpos presentes en sueros animales llegando a la conclusión de que las lectinas eran específicas para diferentes especies; esto es, que las lectinas eran capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ciertas especies de animales más que los de otras, lo que sugería una especificidad de las lectinas (Landsteiner y Raubitscheck, 1908; en Nathan y Halina, 1972).

La primera lectina que se logró purificar fue la concanavalina A procedente de la judía, que fue cristalizada en 1919 por James B. Summer. En 1936, Summer y Howell comprobaron

que la adición de concanavalina A a una solución de glucógeno, carbohidrato que actúa como forma de reserva de los azúcares en los organismos, provocaba la precipitación del glucógeno de la solución y que el azúcar de caña inhibía la aglutinación de los glóbulos rojos mediante la concanavalina A. En ese mismo año, Summer y Howell establecieron la hipótesis de que la hemaglutinación provocada por la concanavalina A podría ser la consecuencia de una reacción de la proteína con los carbohidratos situados sobre la superficie de los glóbulos rojos (Summer y Howell, 1936; en: Jaffé, 1980 y Nathan y Halina, 1972).

Las diversas actividades biológicas de las lectinas provienen todas de una sola propiedad: su capacidad de unión con azúcares (Güémez-Sandoval, 1986; Agraz-Balcázar, 1989).

En 1954, Boyd le da el nombre de lectina a estos compuestos, debido a la característica que poseen de selectividad ya que esta palabra se deriva del latín “legere” que significa escoger (Román-Gaspar, 1985).

3.3.2. Generalidades

Las lectinas están ampliamente distribuidas en más de 800 especies de plantas principalmente en las correspondientes a la familia *Leguminosae*, en las cuales el contenido de lectinas varía del 1.5% al 3% del total de proteína (Güémez-Sandoval, 1986).

En la mayoría de las plantas superiores, las lectinas se localizan en sus semillas aunque también se han detectado en la savia, las hojas, los tallos y la corteza. Mediante el uso de técnicas inmunológicas se han encontrado en el citoplasma del cotiledón y del embrión, en los cuales aparecen durante la maduración y desaparecen en la germinación, lo que indica una posible participación de la lectina en la germinación de la semilla (Jaffé, 1980).

Las lectinas o hemaglutininas son proteínas con afinidades específicas hacia determinadas moléculas de azúcares (o residuos de ellas) localizadas en la superficie de la mayoría de las células. Las lectinas poseen múltiples sitios de unión mediante los cuales pueden combinarse con residuos de azúcares que sobresalen de la membrana celular (de los glucolípidos y glucoproteínas que la constituyen) e interconectar varias células adyacentes

entre sí ocasionando la formación de redes intercelulares y la aglutinación de éstas. La reacción de hemaglutinación (la formación de redes celulares empleando eritrocitos como modelo celular) es el efecto más fácilmente observable de esta unión y solo ocurre si la molécula de lectina posee al menos dos grupos reactivos. La aglutinación celular puede ser inhibida por la adición de azúcares sencillos, por los cuales la lectina es afin bloqueando así sus receptores (Nathan y Halina, 1972).

Se reporta que la lectina facilita la agregación celular, formando puentes entre las células e incrementando la cantidad de eventos de adhesión celular. Al modificarse la distribución del receptor, se facilita el contacto célula-célula.

Se afirma que después de haber hecho experimentos con lectinas marcadas radiactivamente, el incremento en la aglutinación es consecuencia de cambios en la distribución topográfica de los receptores y también debido a la fluidez de la membrana que permite la agrupación de los receptores en uno de los polos.

Hay lectinas que por ser moléculas muy pequeñas no alcanzan a enlazar los receptores y es necesario agregar polímeros para incrementar la aglutinación.

Otros factores importantes que influyen en la asociación carbohidrato-lectina son el valor de pH y la temperatura. La mayoría de las aglutininas reaccionan entre valores de pH de 4.5 a 11. A valores de pH bajos la carga de la superficie celular es reducida y a pH alcalino hay una gran interacción celular. La temperatura está relacionada con la fluidez de la membrana y ésta necesita fluidez para que los receptores se muevan. Las aglutininas pueden presentar reacción en valores de 4 a 40°C. A 0°C la movilidad de los receptores es reducida. Los agentes que reducen la polaridad como el etilenglicol incrementan la especificidad de la lectina. Algunos iones metálicos también ejercen un efecto no específico en la interacción carbohidrato-lectina facilitando la acomplejación. Las lectinas que requieren iones metálicos son muy sensibles a las variaciones de pH. A valores de pH bajos, los iones metálicos son liberados y la lectina pierde su actividad (Güémez-Sandoval, 1986).

Es importante mencionar la influencia de la pureza de la lectina en esta actividad aglutinante.

Las lectinas poseen afinidad con glucoproteínas, células y virus, ya que se identifican por interactuar, reconocer o ligar carbohidratos u oligosacáridos en la misma forma en que lo hacen los anticuerpos.

Las lectinas no alteran la composición de los carbohidratos, porque no tienen propiedades enzimáticas, pero guardan semejanza a las enzimas en el mecanismo que explica su especificidad empleando el modelo de la “llave” y la “cerradura”, ya que reconocen su estructura particular (Agraz-Balcázar, 1989); además, la unión de la lectina con el azúcar es bastante débil, no provoca la formación de enlaces covalentes, sino que es reversible. Se dice también que la unión entre lectinas-carbohidratos es análoga en casi todos sus aspectos a un sistema antígeno-anticuerpo; en ella, la lectina desempeña el papel del anticuerpo y el polisacárido o glucoproteína el papel del antígeno.

Se ha postulado que las lectinas son anticuerpos vegetales, sin embargo, existen diferencias muy marcadas entre ambos tipos de proteínas. La más importante es que los anticuerpos son productos del sistema inmune de los animales superiores, cuyo organismo responde al estímulo de la penetración de una sustancia extraña con la elaboración de dichos anticuerpos; las lectinas en cambio, se hallan presentes como proteínas constituyentes de sus organismos y, sobre todo, de los organismos que como las plantas, son incapaces de presentar respuesta inmune y de formar anticuerpos. Otra diferencia consiste en el margen de especificidad de los anticuerpos; es amplio y abarca no sólo a los azúcares sino también a muchos otros tipos de compuestos, como son aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (aunque, por supuesto, cada anticuerpo es específico para el antígeno que provocó su elaboración). No se conoce ninguna lectina que sea específica para compuestos que no sean carbohidratos (García-Ramírez, 1989).

Una tercera diferencia reside en la estructura química; todos los anticuerpos tienen una estructura similar, mientras que las lectinas difieren mucho entre sí por su estructura. El examen de la composición de aminoácidos, del peso molecular y de otras propiedades moleculares de un gran número de lectinas demuestra que poseen pocas características comunes exceptuando el hecho de que todas son proteínas (Gómez-Rodríguez, 1986).

3.3.3. Efectos biológicos

Dentro de los efectos biológicos que poseen se encuentran:

Inhibición de la fagocitosis.

Inhibición de la formación de vacuolas en macrófagos.

Efecto inmunosupresor.

Toxicidad.

Inhibición del crecimiento y migración de células tumorales.

Inhibición de la liberación de insulina en islotes pancreáticos.

Efecto tipo insulina en células grasas.

Inhibición del crecimiento de hongos (Gómez-Rodríguez, 1986).

Las lectinas no sólo aglutinan a los glóbulos rojos sino también a otros tipos de células como son los linfocitos, fibroblastos (células precursoras del tejido conjuntivo), espermatozoides, bacterias y hongos.

La hemaglutinación ocurre en los glóbulos rojos de varias especies de animales, como son: ratas, ratones, pollos, etc. Cuando se les proporcionan leguminosas crudas en grandes cantidades se produce la muerte en estos animales. Su acción posiblemente esté relacionada con la absorción intestinal pues, al parecer, las hemaglutininas se combinan con las células externas de la pared intestinal impidiendo de esta forma la absorción (Agraz-Balcázar, 1989).

3.4. Concanavalina A

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular y es la lectina que se extrae de la semilla de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, llegando a constituir del 2% al 3% en peso de la semilla, dependiendo del origen de las mismas. La Con A aglutina eritrocitos de diversas especies como caballo, perro, gato, conejo, cobayo y rata, algunas bacterias, células

embrionicas, espermatozoides, algunos virus, linfocitos, timocitos, hemocitos, blastocitos y ciertos tipos de células transformadas y malignas mientras que no aglutina a sus contrapartes normales y precipita ciertos tipos de glucanos, como glucogénos, amilopectinas, dextranas y mananas, lipopolisacáridos, vesículas de glucolípidos-fosfolípidos y glucoproteínas (Güémez-Sandoval, 1986).

Ha sido usada entre otras cosas para la identificación de glucoproteínas, para el estudio de fenómenos membranales como permeabilidad iónica, potencial de membrana y actividad enzimática, para estudiar la movilidad de los receptores superficiales en distintos tipos de células, la actividad enzimática en células transformadas, para el estudio del proceso de activación de las plaquetas y para el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos.

La interacción Concanavalina A-carbohidrato es muy específica, debiendo tener estos últimos residuos α -D-glucopiranosil, α -D-manopiranosil, β -D-fructofuranosil o α -D-arabinofuranosil en la terminal no reductora de la cadena polisacárida. El sitio de unión de carbohidrato de la Concanavalina A es complementario a los grupos hidroxilo C-3, C-4 y C-6 de los anillos α -D-glucopiranosil y α -D-manopiranosil. Los anillos de 5 miembros, aún cuando también reaccionan con la Con A, interaccionan mucho más débilmente que los anillos piranosidos. Con estudios de inhibición de la interacción polisacárido-Concanavalina A se ha demostrado que los mejores inhibidores son el metil- α -D-manopiranosido y el metil- α -D-glucopiranosido, siendo también inhibidores aunque en menor escala la manosa, glucosa, fructosa, arabinosa y algunos disacáridos como maltosa e isomaltosa (Nathan y Halina, 1972).

La Concanavalina A es una proteína constituida por protómeros de PM de 26000 daltones, de una sola cadena polipeptídica compuesta de 237 aminoácidos que tiene un sitio de unión para carbohidrato, uno para Mn^{2+} y uno para calcio y ambos iones son necesarios para la interacción de la concanavalina A con carbohidratos.

La molécula requiere que el ion manganeso o bien algún otro metal de transición como cobalto, níquel, zinc o cadmio, que también dan una molécula activa, se una a ésta antes que el ión calcio, ya que la unión del manganeso induce un cambio conformacional en la proteína que crea el sitio de unión para el calcio y ambos iones le dan una estabilidad

conformacional a toda la molécula que posibilita la interacción con carbohidratos (Kalb y Levitzki, 1968).

Los protómeros de la Concanavalina A forman dímeros y tetrámeros, dependiendo esto de las condiciones de pH y temperatura en que se encuentre: a valores de pH fisiológico, la Con A es un tetrámero; a un valor de pH menor a 5.6 es predominantemente un dímero y a un valor mayor de 7 se ha observado la formación de agregados poliméricos mayores. La temperatura también influye en la transición dímero-tetrámero de la Con A; a valores de pH de 6.3 y 4°C solo hay dímero; al aumentar la temperatura a 36°C la molécula es casi totalmente tetramérica. A valores de pH de 7.2 la transición se completa a 25°C. Las propiedades de unión a carbohidratos no son afectadas por la transición dímero-tetrámero. Algunos cambios químicos como la acetilación o succinilación de la proteína tampoco afectan la unión a carbohidratos, habiéndose obtenido derivados acetilados y succinilados de la Con A tan activos como la lectina sin modificar.

Se puede invertir el fenómeno de agregación adicionando una solución de carbohidratos. Esta prueba es semejante a la acción de inhibidores competitivos de las enzimas (Becker y Reeke, 1975; Cunningham y col, 1975; So y Goldstein, 1967; Inbar y Sachs, 1969).

3.5. Canavanina

La canavanina es otro factor tóxico que se encuentra en la leguminosa *C. ensiformis*. Este factor es un aminoácido básico, análogo estructural de la arginina. La semilla contiene del 2-5% en peso (Yáñez-Ibarra, 1985).

La canavanina es un compuesto básico, soluble en agua, se encuentra libre en la fracción no proteica de la semilla. Da una reacción de coloración con pentacianoaminoferrato, donde el grupo guanidoxi de la canavanina reacciona con el reactivo en solución acuosa a un valor de pH de 7 dando un color magenta (Ramírez-Schuetz, 1985).

La canavanina por ser un aminoácido análogo de la arginina, puede sustituirla en la biosíntesis de proteínas de muchos sistemas procariotes y eucariotes.

Estudios relacionados con crecimiento de células “in vitro”, indican que la canavanina causa una marcada inhibición de la síntesis de DNA y de la viabilidad.

La canavanina puede intervenir en el sistema de balance de agua. Esto fue estudiado en *Locusta migratoria*, observándose que inhibe la secreción de fluidos del volumen hemolinfático. Después del tratamiento con canavanina el volumen hemolinfático se reduce drásticamente comparado con el nivel retenido en *Locusta* no tratada con canavanina (Ramírez-Schuetz, 1985).

Se han estudiado mecanismos bioquímicos y la intervención de la canavanina en éstos; por ejemplo, en la síntesis de proteínas, en la síntesis de RNA y DNA, en la síntesis de macromoléculas, en la síntesis de glucoproteínas, etc (Ramírez-Schuetz, 1985).

Como se observa, la canavanina posee una importante acción bioquímica, que en cierta medida afecta el metabolismo en el organismo.

3.6. Radiación no ionizante

La luz o más propiamente la radiación electromagnética, puede describirse en función de la frecuencia η o de la longitud de onda λ . Ambos parámetros se relacionan entre sí a través de la luz según la ec. $C=\lambda\nu$. La relación frecuencia-longitud de onda conduce al espectro electromagnético.

El espectro se divide en regiones según sus aplicaciones en espectroscopía. De la expresión $E=h\nu=hc/\lambda$ se puede ver que la energía de una radiación aumenta al incrementar la frecuencia y disminuye al aumentar la longitud de onda (Pine y col., 1986).

En una de las regiones del espectro electromagnético se encuentran las microondas que son las ondas electromagnéticas de energía radiante que difieren de otras radiaciones electromagnéticas, como las ondas de luz y las radioondas, sobre todo por su longitud y frecuencia.

Así, se encuentra que las microondas tienen una longitud de onda alrededor de 10^5 - 10^7 nm, que son muy grandes. Por lo tanto, tienen una pequeña energía ya que su frecuencia es pequeña. Esto conduce a decir que las microondas son ondas electromagnéticas no

ionizantes, ya que cuando las ondas electromagnéticas poseen energía suficiente para romper enlaces químicos se dice que son ondas electromagnéticas ionizantes, entre las que se encuentran los rayos gamma y los rayos X.

La luz, al igual que las microondas, viajan en línea recta y pueden sufrir efectos de reflexión, refracción y polarización. Un material que es buen conductor es un reflejante de las microondas. Estas atraviesan el aire y muchos (aunque no todos) tipos de vidrio, papel y materiales plásticos. Los materiales no conductores, es decir, dieléctricos (como pueden ser algunos componentes de los alimentos entre ellos el agua pura), son los que absorberán las microondas.

Cuando son reflejadas no transmiten calor a la superficie reflectora, pero calientan el material que las absorbe en un grado proporcional al de la absorción (Potter, 1978).

El incremento de temperatura en los alimentos se logra mediante una de tres formas, aunque bien puede ocurrir simultáneamente:

- a) Convección: Transferencia de calor desde una fuente a través del aire o de líquidos hacia el alimento.
- b) Conducción: Transferencia de calor en el nivel molecular dentro del alimento o el recipiente que lo contiene, desde el área de mayor temperatura hacia la de menor temperatura.
- c) Radiación: Absorción de cuantos de energía de una onda electromagnética por el alimento.

En general, el primer paso en la conversión de microondas en energía térmica, es la absorción de las microondas por un sistema absorbente y, después, la degradación de esta energía en vibraciones térmicas de las moléculas del material absorbente (Potter, 1978).

Para que una molécula absorba un cuanto de energía, la energía de éste debe igualar la diferencia de energía entre el estado presente de la molécula (generalmente el estado basal) y la energía del otro estado permitido (excitado). La energía contenida en un cuanto de microondas es pequeña. Por eso las microondas pueden ser transmitidas a través de muchos materiales sin ser absorbidas (Chávez-López, 1990).

Cuando una onda electromagnética incide sobre una molécula, el campo eléctrico y el magnético actúan sobre ella. El efecto del campo magnético es mucho menor respecto al eléctrico y tratándose de alimentos (sistemas no ferromagnéticos) se puede despreciar.

Al viajar la onda electromagnética por una molécula polar, es decir, una molécula que tiene una carga positiva y otra negativa en los lados opuestos de la misma, los alimentos y otros materiales contienen moléculas que actúan como dipolos, entre ellos las moléculas de agua (Potter, 1978). La molécula experimentará un campo eléctrico que oscila hacia arriba y hacia abajo. Si la onda oscila a lo largo del enlace entre los átomos, estos comenzarán a vibrar al ser atraídos y repelidos, si la onda ejerce fuerzas perpendiculares al enlace, habrá un torque ejercido sobre la molécula y tendrá como resultado el movimiento de rotación de la misma y la energía será transferida a la molécula.

Las moléculas vibran a la misma frecuencia de la onda absorbida. Una frecuencia de 2450 MHz hace vibrar a las moléculas 2450 millones de veces por segundo.

Para que la energía aparezca como calor, debe transferirse de la molécula que vibra hacia sus alrededores en vez de permanecer como vibración interna. Esta redistribución de la energía se conoce como "efecto de fricción molecular". Este es el efecto de las microondas sobre todas las moléculas polares.

En materiales no polares es diferente. En estas moléculas, las cargas eléctricas están simétricamente distribuidas. Si un campo eléctrico se aplica a este material, las cargas positivas experimentarán una fuerza en la misma dirección que la del campo y las negativas una fuerza opuesta. Este desarreglo de la simetría original hace que la molécula se polarice; tal polarización inducida permite la interacción de la molécula con el campo eléctrico. De este modo se logra la transferencia de energía de un campo electromagnético a moléculas de aceites y tejido graso en un horno de microondas. Algunas moléculas orgánicas tienen regiones polares y otras no polares y pueden interactuar con el campo de la radiación tanto por la polarización permanente como por la inducida. También existe el fenómeno de conducción dentro del alimento.

El calentamiento a través del microondas es el resultado de la interacción de los componentes químicos del alimento con un campo electromagnético. En un proceso de

microondas, no solo influyen las propiedades térmicas del alimento sino también algunas propiedades eléctricas interrelacionadas que varían con la frecuencia y con el perfil de tiempo y temperatura durante el proceso del producto. Las propiedades dieléctricas más importantes a frecuencia de microondas son expresadas como “permitividad” dieléctrica con dos componentes: la constante dieléctrica (E') y el factor de pérdida (E'').

La constante dieléctrica es una medida de la capacidad del material para almacenar energía eléctrica y el factor de pérdida es una medida de la capacidad para disipar energía en forma de calor. La relación entre estos dos factores determina las capacidades del material, tanto para ser penetrado por un campo eléctrico, como para disipar energía eléctrica como calor. La relación del factor de pérdida entre la constante dieléctrica es el factor de disipación o tangente de pérdida. Al aumentar el valor del factor de pérdida y la tangente de pérdida, la cantidad de energía que absorba este material aumentará también.

La constante dieléctrica depende de la temperatura y el factor de pérdida depende, tanto de la temperatura como de la frecuencia. Estas propiedades afectan la distribución de energía dentro del material, la profundidad a la que penetra la energía en el alimento y la eficiencia con que esto se lleva a cabo.

Las microondas tocan la superficie del material con un nivel inicial de potencia; cuando comienzan a penetrar el material, se absorbe un poco de energía, cambian la longitud de onda y la velocidad, mientras que la frecuencia permanece constante. Esto continúa hasta que se absorbe toda la energía o las ondas atraviesan todo el material. La profundidad de penetración de la energía es una medida de este fenómeno. La profundidad de penetración se define como la profundidad en donde la energía restante es del 37% de la inicial.

Las propiedades eléctricas están ampliamente determinadas por los contenidos de humedad y sal del producto. Las propiedades dieléctricas del agua son funciones de la longitud de onda y de la temperatura.

A una temperatura determinada, la constante dieléctrica del agua será función de la frecuencia. El agua de unión, que es el agua unida a la superficie de los sólidos en el alimento en una o varias capas estructuradas, se relaja a frecuencias menores a las microondas, por ello sus efectos no son considerados en procesos con microondas. En

general, cuanto mayor sea el contenido de humedad, tanto mayor será el factor de pérdida y, en consecuencia se obtendrá mejor calentamiento. Sin embargo alimentos de baja humedad también se calientan adecuadamente porque su calor específico es menor. El calor específico se refiere a la cantidad de calor que necesita un alimento para elevar su temperatura. Es el factor que hace que sustancias con un factor de pérdida relativamente bajo, como los aceites, puedan calentarse bien con microondas. El aceite se calienta más rápido que el agua debido a su calor específico menor (2.0 kJ/kg°C frente a 4.2 kJ/kg°C).

Mientras se seca un alimento, las microondas son absorbidas por las áreas más húmedas y se observa un efecto de nivelación de humedad. A un nivel muy bajo de humedad, el agua se encuentra unida y no libre para ser afectada por el campo electromagnético. Cuando el nivel de humedad supera el contenido crítico de humedad, el factor de pérdida aumenta y el producto absorbe más las microondas (Chávez-López, 1990).

Las sales disueltas es decir, iones en solución acuosa, atraen moléculas de agua con más fuerza por efectos de la carga nuclear (dependientes del tamaño y la carga de los iones) y disminuyen los valores de la constante dieléctrica a niveles menores que los del agua pura. El factor de pérdida aumenta superando estos niveles. El efecto sobre la constante dieléctrica depende de la concentración de sal y su número promedio de hidratación. El efecto sobre el factor de pérdida depende de la conductividad equivalente de la sal, que depende a su vez de la temperatura y de la concentración. Los efectos de los iones en solución se relacionan generalmente con las cenizas y con componentes proteicos solubles. Los efectos de los componentes insolubles e inmiscibles son el de disminuir tanto la constante dieléctrica como el factor de pérdida, como se observa en emulsiones aceite-agua, y se relacionan a los lípidos, proteínas y carbohidratos en suspensiones coloidales en agua. El efecto de los componentes interactivos tales como alcoholes y azúcares, se debe a la estabilización de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de estos compuestos y el agua, cambiando la longitud de onda crítica de absorción (Mudgett, 1986).

Por otro parte, la retención de vitaminas en alimentos calentados o procesados con microondas es mayor a los tratados convencionalmente porque el tiempo de tratamiento es menor, pero este grado de retención varía con el tiempo de tratamiento, temperatura interna, tipo del producto, tamaño y potencia del horno (Chávez López, 1990).

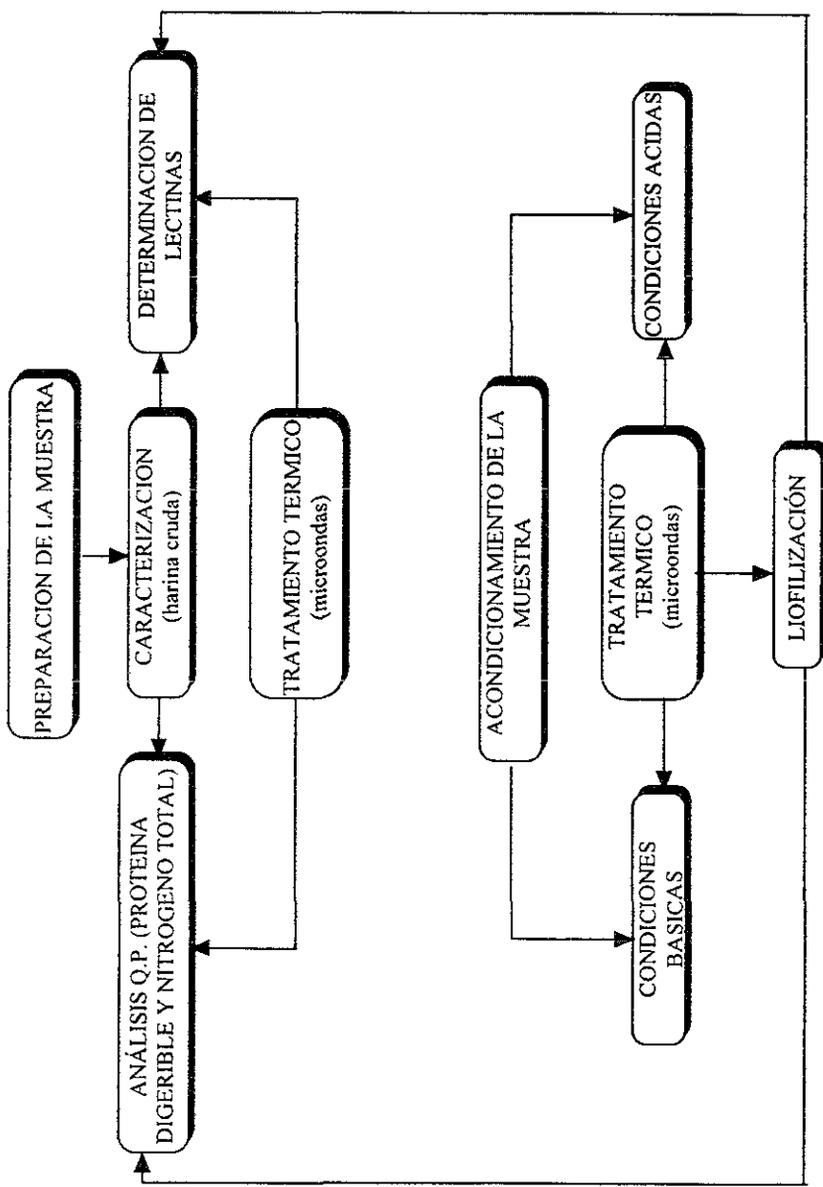
Existen estudios, donde se muestra que la retención de nutrimentos en alimentos procesados con microondas no difiere mucho de los retenidos por procesos convencionales.

Las ventajas de emplear la energía no ionizante como fuente de calor, entre otras, se encuentra la de la inactivación de compuestos antinutricios, lo cual ha sido corroborado por varios autores (Elinbaum y Bonomo, 1990); además, existen beneficios como lo es la minimización del daño a la proteína protegiendo así sus propiedades nutrimentales y funcionales. Asimismo, se aumenta la digestibilidad de la proteína como resultado de la destrucción de ciertas proteínas que ofrecen resistencia a la hidrólisis enzimática. También hay prevención del desarrollo de dureza, pues se acortan los tiempos de cocción y se mejoran las condiciones de almacenamiento. El calentamiento con microondas es más eficiente que el convencional (40% frente a 7-4% de los convencionales), según la National Bureau of Standards de EEUUA, porque el calor se genera en el alimento y no en el aire dentro del horno o en el contenedor. Las microondas usan 75% menos energía que los métodos convencionales (Chávez-López, 1990).

De acuerdo con estos fundamentos, en este trabajo se usará la energía no ionizante como fuente de inactivación de los compuestos termolábiles (lectinas), presentes en la harina de *C. ensiformis*.

En los siguientes capítulos se muestra el desarrollo de la parte experimental, resultados y análisis de los mismos y, por último, las conclusiones.

Fig. 4-1. Diagrama esquemático de la metodología empleada en este trabajo



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.a. Metodología

El seguimiento de la metodología se lleva a cabo como lo muestra el esquema presentado en la Fig. 4-1.

4.b. Preparación de la muestra

El grano de *C. ensiformis* proviene del Campo Experimental Tizimín, Yucatán México, perteneciente al Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Los granos se molieron y tamizaron hasta malla 20. La harina se guardó en frascos y en refrigeración para uso posterior.

4.c. Caracterización

Se caracterizó mediante un análisis proximal que comprende la determinación de: humedad, cenizas, fibra cruda, grasa cruda, proteína cruda e hidratos de carbono obtenidos por diferencia de los demás constituyentes, de acuerdo a los procedimientos establecidos por la AOAC (1980), además se realizó digestibilidad in vitro en la harina cruda. El equipo y material utilizado se presenta en el APÉNDICE A-1.

4.1. Acondicionamiento de la muestra

4.1.1 Condiciones preliminares

Para conocer la cantidad de lectinas presentes en la harina cruda de *C. ensiformis* [representadas por su título (máxima dilución en donde todavía existe aglutinación)], y en la misma harina pero con un pequeño incremento en su humedad y así poder

comparar los títulos obtenidos con los de un valor conocido, se utilizó un patrón positivo que en este caso fue la harina cruda de frijol negro (Jamapa).

Inicialmente se trabajó en las condiciones que se muestran en las tablas 4-1 a 3. Se tuvieron cuatro lotes, uno de harina cruda, uno con agua destilada en donde el contenido de humedad se ajustó a 20%, uno con HCl y uno con Ca(OH)₂

Tabla 4-2. Harina cruda y con incremento de humedad

MUESTRA	CONDICION
HARINA CRUDA	13.69 % Humedad
HARINA CRUDA+AGUA DESTILADA	20.00% Humedad*
HARINA DE FRIJOL NEGRO (JAMAPA)	9.25% Humedad intrínseca ¹

*Valor intrínseco de la muestra

(1) Craik-chávez y Davila-Ortiz (1989)

Después de conocer el título que presenta la harina cruda de *C. ensiformis*, se establecieron en base a un diseño experimental previo las condiciones iniciales de humedad y concentración, tanto de ácido como de álcali y tiempo de exposición en el microondas, que son las que se muestran en las tablas 4-2 y 3.

Tabla 4-2. Condiciones ácidas

	CONCENTRACIÓN (%p/v)	% HUMEDAD	Exposición en microondas (min)
HCl	0.02	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆
	0.05	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆
	0.1	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆

En donde T₁=0, T₂=0.5 min, T₃=0.75 min, T₄=1 min, T₅=2 min, T₆=3 min

Tabla 4-3. Condiciones alcalinas

	CONCENTRACIÓN (%p/v)	% HUMEDAD	Exposición en microondas (min)
Ca(OH)₂	0.02	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆
	0.05	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆
	0.1	20, 40, 50	T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ , T ₅ , T ₆

En donde: T₁=0, T₂=0.5 min, T₃=0.75 min, T₄=1 min, T₅=2 min, T₆=3 min

Se mantuvieron constantes: la energía aplicada, la cantidad de muestra utilizada, que para tal efecto fue de 1 g, y como variable fueron los tiempos de exposición de la harina en el horno de microondas.

Con base en los resultados obtenidos de estas determinaciones, que se encuentran en el capítulo 5, se procedió a trabajar con otras condiciones de humedad, las cuales fueron establecidas por experimentaciones de prueba y error, a fin de encontrar el porcentaje de humedad adecuado. Se procedió a trabajar en las condiciones que se muestran en la tabla 4-4.

Tabla 4-4. Porcentajes de humedad trabajados y tiempos de exposición de la harina en el horno de microondas

% Humedad	Exposición en microondas (min)		
75.00	1	3	5
83.00	1	3	5
87.00	1	3	5
89.36	1	3	5

Se adicionaron volúmenes determinados de solución a las harinas con los porcentajes de humedad mostrados en la tabla 4-4; se aplicó tratamiento térmico en diferentes tiempos de exposición en microondas. Las harinas en algunos casos se quemaban y en otros sufrían un ligero dorado en la superficie por lo que se supuso que el volumen de solución utilizada debía aumentarse; posteriormente, se trabajó con el siguiente

porcentaje de humedad y así sucesivamente, llegando al volumen adecuado en el que las muestras ya no se quemaban al aplicar la energía no-ionizante.

Se encontró que, para 6 g de harina debían adicionarse 50 mL de solución. La suspensión final quedó con un volumen adecuado, el cual no se consumió en su totalidad al aplicar el tratamiento en microondas y así se obtuvo una harina que no presentó dorado ni quemado en su superficie, por lo que se eligió este volumen de solución para trabajar en todas las determinaciones; pero, como para obtener los extractos de lectinas se requiere de, al menos, 1 g de harina, se hizo la relación correspondiente:

$6 \text{ g}/50 \text{ mL} = 0.12 \text{ g/mL}$, o sea, $1 \text{ g}(1 \text{ mL})/0.12 \text{ g} = 8.33 \text{ mL}$ de solución, sea ácido o álcali.

Para facilitar el manejo $\cong 8.4 \text{ mL}$.

Entonces; para cada gramo de harina se adicionan 8.4 mL de solución ya sea ácido o álcali, se homogeneiza y se deja en refrigeración durante 24 horas.

El porcentaje de humedad óptimo fue de 89.36%, la cual se aplicó a las condiciones finales que se muestran en las tablas 4-5 y 6.

4.1.2 Condiciones finales

Las condiciones de operación para los experimentos fueron los que se presentan en las tablas 4-5 y 6.

Tabla 4-5. Condiciones ácidas, 89.36% de humedad

CONCENTRACIÓN HCl % p/v	Exposición en microondas (min)			
	0	1.0	3.0	5.0
0(Control B)	X	X	X	X
0.02	X	X	X	X
0.05	X	X	X	X
0.1	X	X	X	X

B, harina cruda (sin tratamiento ÁCIDO)

Tabla 4-6. Condiciones básicas, 89.36% de humedad

CONCENTRACIÓN Ca(OH) ₂ % p/v	Exposición en microondas (min)			
	0	1.0	3.0	5.0
0(Control B)	X	X	X	X
0.02	X	X	X	X
0.05	X	X	X	X
0.1	X	X	X	X

B, harina cruda (sin tratamiento ALCALINO)

4.2. Tratamiento térmico (microondas)

Se llevó a cabo en un horno comercial (Goldstar MA-1554M, 1400W, 2450 MHz), a su máxima potencia, en los tiempos registrados en las tablas 4-5 y 6.

4.3. Determinación de lectinas

4.3.1. Extracción de lectinas

Después de aplicar los tratamientos a las muestras de harina de *C. ensiformis*, se procedió a obtener los extractos que contienen las lectinas para emplearlos en las pruebas de aglutinación de eritrocitos como se describe a continuación García-Ramírez, (1989). Se suspende la muestra en una solución de NaCl al 1% y se agita mecánicamente durante dos horas a 3000 rpm a temperatura ambiente. Se centrifuga el extracto a 1400 rpm durante 15 min, se filtra el sobrenadante y se afora a 10 mL con la solución de NaCl al 1%.

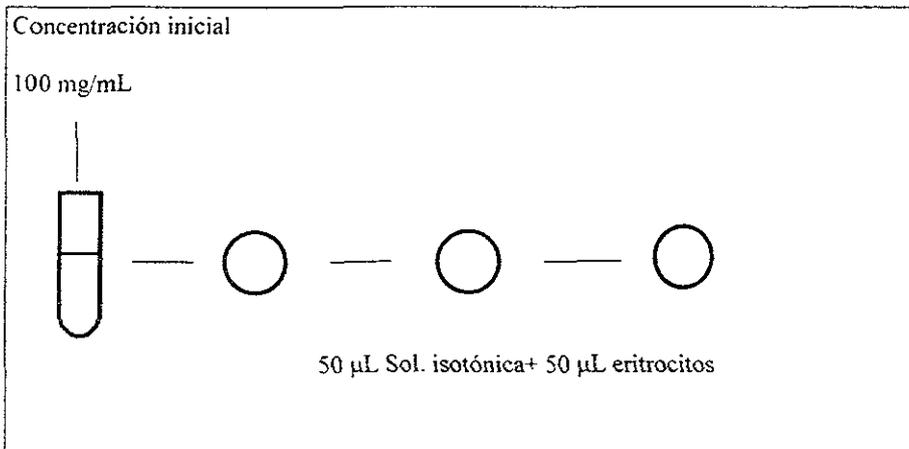
4.3.2. Obtención de eritrocitos

Para realizar las pruebas de aglutinación se requiere de eritrocitos, que se obtienen de muestras de sangre de conejo de acuerdo a la metodología propuesta por (García-

Ramírez, 1989). Se desangra a conejos de laboratorio vivos, recibiendo la sangre en solución anticoagulante y centrifugándola de 10 a 15 min. a 1500 rpm para obtener solamente los eritrocitos, los cuales se lavan tres veces con solución isotónica. Después de la tercera lavada, diluir el paquete de glóbulos rojos hasta 4% empleando 24 mL de solución isotónica por cada mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%. Posteriormente, se agrega 1 mL de tripsina al 0.1% por cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4% y se incuba durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo se centrifuga a 1500 rpm para eliminar el sobrenadante (que contiene la enzima) y nuevamente se centrifuga a la misma velocidad y se lava tres veces con solución isotónica. Después del último lavado se resuspende el paquete de eritrocitos y se ajusta la concentración a un 5% empleando un espectrofotómetro λ de 620 nm. Para ajustar la concentración se necesita diluir la suspensión anterior con solución isotónica tomando 0.5 mL de la suspensión de glóbulos rojos y diluirla con 2 mL de solución salina y se lee en el espectrofotómetro a la longitud de onda mencionada anteriormente.

4.3.3. Pruebas de aglutinación

Fig. 4-2. Esquema del proceso de dilución empleado para determinar el "título" producido por la aglutinación de eritrocitos con lectinas de *Canavalia ensiformis*



La técnica utilizada en este trabajo, se basa en la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos por efecto de la cantidad de hemaglutininas presentes. Así, al incrementarse la cantidad de lectinas en la suspensión de prueba, se produce una disminución en el porcentaje de glóbulos rojos suspendidos y por consiguiente se puede apreciar la sedimentación de los eritrocitos aglutinados (Jaffé y col., 1974).

Se realiza la microtitulación en placas de leucita rígida tipo V, colocando con una micropipeta una gota de solución isotónica en cada pozo procurando no tocar las paredes del mismo. Enseguida, con el “microdiluidor” se toman 5 μ L del extracto problema y se colocan en el primer pozo de una hilera elegida diluyendo sucesivamente e introduciendo el “microdiluidor” en los siguientes pozos rotándolos sin excesiva presión. Dejar una hilera sin extracto para emplearla como control. Finalmente, se colocan con la micropipeta en cada pozo una gota de suspensión de eritrocitos sensibilizados y ajustados. Se rota suavemente la placa en forma circular y se incuba a 37°C durante 1 hora. Se lee el título en el dispositivo mirando a través del espejo el fondo de los pozos utilizando la hilera de control como prueba negativa y se compara con la hilera de las muestras. Se observa a partir de qué pozo ya no se produce aglutinación, conociéndose así el “título”. Este valor representa la máxima dilución en la que se presenta aglutinación. Se calculan a partir de este valor los microgramos de extracto que producen aglutinación. Con estos resultados se puede observar la influencia de los tratamientos aplicados.

Más explícitamente: Se pesó 1 g de harina de *C. ensiformis*, se adicionaron 10 mL de solución salina al 1%, a fin de realizar la extracción de las lectinas. Por lo tanto, se tuvo una concentración inicial de 100 mg/mL. Del extracto de lectinas se realizaron diluciones, para obtener equivalentes de microgramos por mililitro de muestra que produce aglutinación que representa un título “n”, como se esquematiza en la Fig. 4-2.

De esta determinación se conoce el título que presentan las harinas, tanto tratadas como cruda.

4.4 Equipamiento utilizado

4.4.1. Equipo

En la tabla 4-7 se presenta el listado de equipo empleado

Tabla 4-7. Lista de equipo empleado en este trabajo

EQUIPO	MARCA/MODELO
Espectrofotómetro	SPECTRONIC 21, Mod. UVD de haz simple
Balanza analítica	SARTORIUS, tipo 2842
Balanza analítica	A6245 METTLER TOLEDO TDNR26115110
Termobalanza	OHAUS, Mod. MB200 Series 4973
Centrifuga clínica	DYNAC, 500-5000 r.p.m.
Incubadora	KINET
Estufa	FELISA
Mufla	Lindberg
Horno de microondas comercial	Goldstar Modelo MA-1554AM, 120 V. 12.5 A, monofásico, 60 H, 14 kW
Molino	Brabender No. 175QE

4.4.2. Material

Equipo microtitulador

Micropipeta Eppendorf, 10-100 μ L

Multipipeta Transferpette-12 canales

4.4.3. Reactivos

HCl, grado reactivo

Ca(OH)₂ grado reactivo

NaCl, grado reactivo

Tripsina porcina pancreática, ICN, grado analítico

Heparina 5000, Sector Salud

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 5-1 a 5-3 se pueden observar los resultados obtenidos, tanto de la composición química de la harina de *C. ensiformis*, como la secuencia de inactivación de las lectinas. En la tabla 5-1 se observa la comparación de los resultados obtenidos experimentalmente en cuanto a composición química de la harina de *C. ensiformis*, con respecto a la reportada en la literatura.

Tabla 5-1. Composición química de la harina cruda y valores encontrados en la literatura (Promedio de tres determinaciones) (g/100g)

COMPONENTE	Harina cruda <i>C. ensiformis</i>	Literatura ¹	Literatura ²
CENIZAS	2.67	3.34	2.86
PROTEÍNA CRUDA	33.04	23.35	31.54
FIBRA	13.67	11.89	9.12
GRASA	2.77	1.51	9.84
CARBOHIDRATOS*	47.85	59.90	53.36

*Obtenido por diferencia

1 Moguel- Ordoñez y col (1996)

2 Emaldi y Perez (1990)

Se presentan ligeras diferencias en la cantidad presente de cada componente. Esto se debe posiblemente al origen de los granos, influyendo por tanto, el suelo, clima, ciclo de cultivo etc, además, aquí se observa que la harina de canavalia es una buena fuente de proteína pues el contenido es más elevado que en la mayoría de las leguminosas.

En la tabla 5-2 se hace la comparación del título que presenta la harina de canavalia y el título que presenta el frijol negro Jamapa.

Tabla 5-2. Título que presenta la harina cruda y el patrón positivo que, en este caso, fue frijol negro Jamapa

MUESTRA	TÍTULO
Harina cruda (<i>C. ensiformis</i>)	19
Patrón positivo (frijol negro Jamapa)	7-8

Hasta el pozo 19 se produjo reacción positiva de aglutinación. Se observó que el título que presentó la harina cruda de *C. ensiformis* es un valor alto como lo es 19 en comparación del título que presenta la harina de *Phaseolus lunatus*, que está en el intervalo de 7-8. Se puede deducir que la cantidad de lectinas en la harina cruda de *C. ensiformis* se encuentra en mayor proporción que en la otra leguminosa y que se requerirá, por tanto, una mínima cantidad de harina para producir aglutinación.

La tabla 5-3 muestra el título que presentó la harina de canavalia aumentando su porcentaje de humedad utilizando agua destilada y diferentes tiempos de exposición en el horno de microondas:

Tabla 5-3. Harina con adición de agua destilada y tratamiento térmico, 20% de humedad

Tiempo de exposición en microondas	Título
T1=0	19
T2=0.5	19
T3=0.75	18
T4=1	18
T5=2	*
T6=3	

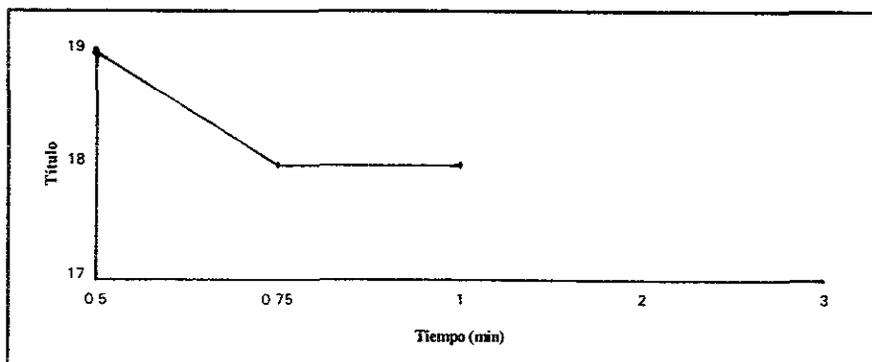
• Pérdida casi total de líquido

Es importante mencionar que el título que presentó la harina en los diferentes tiempos de exposición en el horno de microondas no cambió significativamente en comparación con la harina cruda aún cuando ya se está aplicando el tratamiento térmico. Se observa que, a tiempos de aplicación de 2 minutos de energía no ionizante la harina sufrió un quemado en la superficie, pérdida casi total de líquido por lo que ya no se realizó determinación de título, ya que los resultados empleando estas harinas darían resultados erróneos de nitrógeno o digestibilidad in vitro.

En la Fig. 5-1 se presenta un pequeño diagrama de estos datos para visualizar el problema.

Gráfica que muestra los resultados de la tabla 5-3, efecto del tratamiento térmico y ligero aumento de humedad (20%) sobre los títulos obtenidos de la harina de *C. ensiformis*

Fig. 5-1. Efecto de tiempo de exposición vs título con 20% de humedad



En la Fig. 5-1, se observa que, a partir de los 2 minutos, ya no se registra el título, esto se debió a que fue difícil tener la harina expuesta en energía no-ionizante durante este tiempo pues como se mencionó las muestras sufrieron un ligero tostado en la superficie por lo que ya no se llevó a cabo la determinación de lectinas a partir de este tiempo.

Por otro lado, también se observa que en los demás tiempos trabajados no hubo gran disminución del título en las harinas tratadas, en comparación con el de la harina cruda.

5.1 Resultados preliminares

Los resultados de los experimentos preliminares se muestran en las tablas 5-4 a 9. Todos estos resultados son el promedio de tres determinaciones

Tabla 5-4. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de HCl en diferentes concentraciones, a un 20% de humedad y tratamiento térmico

Tiempo de exposición en microondas (min)	Condición HCl (%p/v)		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0.00	19	19	19
0.5	19	18	18
0.75	18-19	18	18
1	18	18	18-17
2	*	*	*
3	*	*	*

*Pérdida casi total de líquido

Tabla 5-5. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de HCl en diferentes concentraciones, a 40% de humedad y tratamiento térmico

Tiempo de exposición en microondas (min)	Condición HCl (%p/v)		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0.00	19	19	19
0.5	19	18	18
0.75	18	18	18
1	18	18	18-17
2	*	*	*
3	*	*	*

*Pérdida casi total de líquido

Como se observa, los títulos que se obtuvieron en las muestras ácidas y básicas tratadas en el horno de microondas no presentaron grandes cambios, si se compara con las muestras de harina cruda y, al igual que en la determinación de harina cruda con 20% de humedad (Tabla 5-3), en un T=2 min ya no se obtiene valor de título ya que las harinas se desecaban y empezaban a quemarse. Haciendo la comparación de los resultados de las Tablas 5-3, 5-4 y 5-7 (condiciones ácidas, alcalinas y agua destilada, con un 20% de humedad), la adición de estas soluciones no modificaron en gran medida el título obtenido.

Lo que se observó es que a concentraciones de HCl 0.1% (Tabla 5-6) y Ca(OH)₂ 0.02% (Tabla 5-9), disminuyó ligeramente el título de las harinas tratadas con tiempos de exposición en el horno de microondas de 2 minutos. También se observan estos resultados con las

muestras tratadas con un 50% de humedad, lo que implica que fue posible tener las muestras en tiempos de exposición de 2 min. Esto no se observa en los resultados de la tabla 5-3 que tienen un 20% de humedad, donde la harina sufre daños severos. Sin embargo, para tiempos de 3 min no fue posible mantener la harina expuesta a la energía no ionizante. En los otros tiempos no hubo gran variación en los títulos obtenidos, por lo que puede concluirse que la variable que está afectando es el contenido de humedad utilizado. Con base en estos resultados y el conocimiento del principio de operación de la radiación no ionizante sobre moléculas polares como el agua, se realizaron pruebas preparando muestras en suspensión hechas con harinas de *C. ensiformis* y aumentando el volumen de ácido o álcali adicionado.

Tabla 5-6. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de HCl en diferentes concentraciones, a un 50% de humedad y tratamiento térmico

Tiempo de exposición en microondas (min)	Condición HCl (%p/v)		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0	19	19	19
0.5	19	18	18
0.75	18	18	18-17
1	18	18	18-17
2	18	18-17	17
3	*	*	*

Tabla 5-7. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de Ca(OH)₂ en diferentes concentraciones, a un 20% de humedad y tratamiento térmico.

Tiempo de exposición en microondas (min)	Condición Ca(OH) ₂ % p/v		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0	19	19	19
0.5	19	19	19
0.75	18	19-18	18
1	18	18	18
2	*	*	*
3	*	*	*

Tabla 5-8. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en diferentes concentraciones, a un 40% de humedad y tratamiento térmico.

Tiempo de exposición en microondas (min)	Condición $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (% p/v)		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0.00	19	19	19
0.5	19	19	19
0.75	18	18	19
1	18-17	18	18
2	*	*	*
3	*	*	*

Tabla 5-9. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* con adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en diferentes concentraciones, a un 50% de humedad y tratamiento térmico.

Tiempo de exposición	Condición $\text{Ca}(\text{OH})_2$ % p/v		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0.00	19	19	19
0.5	19	19	19
0.75	18	18	18
1	18-17	18	18
2	17	18-17	18
3	*	*	*

5.2 RESULTADOS FINALES

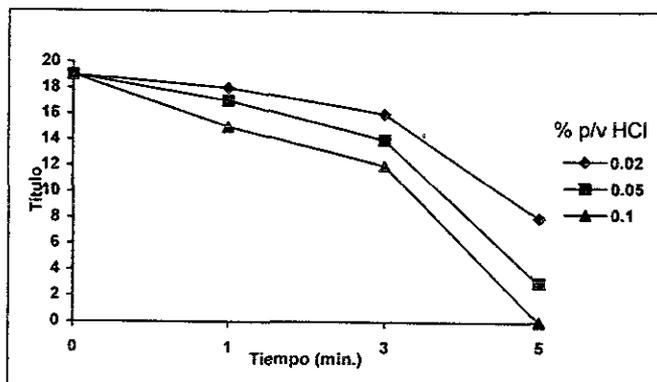
En las tablas 5-10 a 12 se observa la secuencia de inactivación de lectinas utilizando un porcentaje de humedad de 89.36%. Todos estos resultados son el promedio de tres determinaciones.

Tabla 5-10. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* en suspensión en condiciones ácidas (HCl) y tratamiento térmico, con 89.36% de humedad

T exposición en microondas(min)	Condición HCl %p/v		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0	19	19	19
1	18	17	15
3	16	14	12
5	8	3	0

Para visualizar estos resultados se presenta la Fig. 5-2

Fig. 5-2. Inactivación de lectinas en condiciones ácidas (89% humedad)



Al utilizar HCL con una concentración de 0.02% se consiguió reducir el título producido por las lectinas, llegando hasta 8, pero no se inactivaron totalmente, al aumentar la concentración hasta 0.05%, el título ya disminuyó más llegando a 3, lo que implica que al aumentar la concentración de ácido utilizado se disminuyeron los tiempos de exposición en microondas necesarios para inactivar a las lectinas.

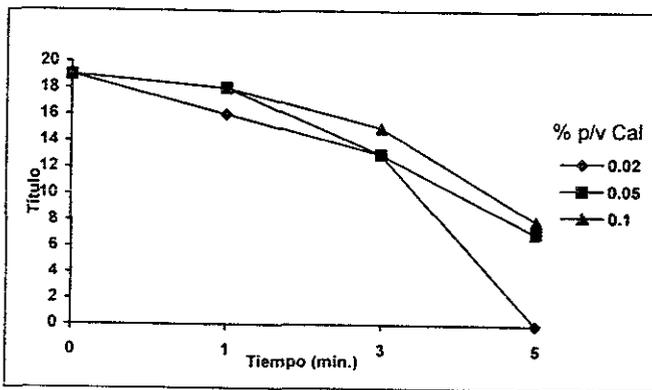
La inactivación total de las lectinas fue obtenida utilizando HCl 0.1% que es la mayor concentración estudiada. Así, conforme aumenta el tiempo de exposición en el horno de microondas, la cantidad de muestra que produce aglutinación es mayor. Además es notable la influencia de la humedad, ya que al aumentarla hasta un porcentaje de 89.36% fue posible mantener las harinas hasta 5 minutos de exposición en el horno de microondas sin que sufran deterioro, y reduciendo su título.

En la tabla 5-11 y la fig. 5-3 se presentan los datos de los experimentos usando hidróxido de calcio

Tabla 5-11. Título que presenta la harina de *C. ensiformis* en suspensión, en condiciones básicas $[Ca(OH)_2]$ y tratamiento térmico, con 89.36% de humedad.

T exposición en microondas (min)	Condición $Ca(OH)_2$ p/v		
	0.02	0.05	0.1
	TÍTULO		
0	19	19	19
1	16	18	18
3	13	13	15
5	0	7	8

Fig. 5-3. Inactivación de lectinas en condiciones básicas (89% humedad)



En condiciones alcalinas también se obtuvo la inactivación total de las lectinas, solo que en este caso la concentración utilizada de álcali fue de 0.02%, que es la más baja, ya que en las concentraciones más elevadas, como 0.05%, aunque también hay inactivación, es menor y para una concentración de 0.1% es aún menor. Esto indica que deben usarse cantidades menores a 0.02%. Los títulos producidos por las lectinas disminuyen al aumentar los tiempos de exposición en el microondas, por lo que es importante mencionar que la modificación en los valores de pH de las harinas permiten reducir los tiempos de exposición en el horno de microondas para lograr su inactivación o la disminución de los títulos obtenidos. En la tabla 5-13, se observan los resultados de la determinación de título de la harina a la que se le adicionó agua destilada y aplicó tratamiento térmico durante 5 min. Todavía se observaron títulos de 4-5, aún cuando en la tabla 5-12 se muestra que las

harinas a las que se adicionó agua destilada y a la harina que se adicionó álcali presentan el mismo pH final, sus resultados difieren, obteniéndose la total inactivación en esta última por la presencia de la cal, por lo que se sugirió que la fuerza iónica del álcali está facilitando la desnaturalización de las lectinas, además de que se supone que la presencia del ión metálico Ca^{2+} adicionado como $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tiende a desestabilizar a la lectina debido a la densidad electrónica del calcio ya que en sus orbitales presenta electrones libres que tienden a unirse por varios tipos de enlaces con algunas cargas de la proteína haciéndola más susceptible a sufrir cambios por algunos medios físicos como lo es la energía no ionizante.

Tabla 5-12. Comparación del pH inicial de las soluciones y pH obtenido después de adicionar la harina de *C.ensiformis*

Condición	pH inicial	Adición de harina	pH final
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02% (p/v)	11	1 g	6
HCL 0.1% (p/v)	0-1	1 g	4
H_2O dest.	6	1 g	6

Punto Isoeléctrico de la lectina Concanavalina A	5.5 ¹
--	------------------

¹ Olson y Liener (1967)

En las condiciones en que se trabajó, el pH en que se encuentra la lectina, está por encima y por debajo de su PI, punto en el que se tiene el mismo número de cargas negativas y positivas y, por tanto, su carga neta es cero (Baduí-Dergal, 1986) y es difícil, por tanto, que pueda interactuar con algún otro componente.

Los resultados de la tabla 5-13 son para un lote mayor de harina (20 g versus 1 g) y puede observarse que el hidróxido de calcio tal vez requiere estar en una concentración ligeramente menor.

Estos experimentos se realizaron por triplicado, en donde T1, T2, y T3, son los títulos obtenidos en las tres determinaciones. Tomando como título final el que presenta el valor más alto, para mayor confiabilidad.

Tabla 5-13. Resultados del experimento a mayor escala: A 20 g de harina de *C. ensiformis*, se le adicionaron 168 mL de ácido o base (% humedad 89.36) y posteriormente tuvieron un tratamiento térmico. Se tomaron como referencia las condiciones que habían presentado los títulos más bajos

CONDICIÓN(%p/v)	Tiempo de exposición en microondas(min)	Título		
		T1	T2	T3
HCl 0.1%	3	11	12	11
HCl 0.1%	5	0	0	0
Ca(OH) ₂ 0.02%	3	10	10	11
Ca(OH) ₂ 0.02%	5	2	1	1
H ₂ O destilada	5	5	4	4

La inactivación completa de las lectinas fue alcanzada con tratamiento ácido y un tiempo de exposición en microondas de 5 min, aunque con el tratamiento alcalino también se está alcanzando una alta inactivación, no total, pero observando la concentración utilizada de Ca(OH)₂ que es de 0.02%, puede decirse que los resultados son buenos aun cuando en su momento se esperó que la adición de Ca(OH)₂ aumentaría la resistencia de las lectinas a ser inactivadas, ya que éstas requieren de dos iones metálicos el Mn²⁺ y Ca²⁺ para que se lleve a cabo la interacción de la lectina con los carbohidratos constituyentes de la membrana de los eritrocitos, además de que la presencia de estos iones le dan una estabilidad conformacional a la lectina. Sin embargo, se está logrando inactivar la lectina con una mínima adición de Ca(OH)₂, que sube el valor del pH. Se llegó a la hipótesis de que con la pequeña concentración utilizada no se están ocupando los sitios de unión de la lectina con el ión Ca²⁺ y, por ende, no se pueden estabilizar las conformaciones de la lectina, logrando así inactivarla, parece corroborarse.

También se observa la influencia de la adición de ácido y álcali a las muestras, al hacer la comparación de éstos con la muestra a la cual solo se le adicionó agua destilada. La inactivación se lleva a cabo con la presencia de agua pero no en su totalidad, requiriendo entonces un aumento en el tiempo de exposición en el horno de microondas, trayendo como consecuencia una mayor desnaturalización de las proteínas y, por ende, una disminución en la calidad de los nutrimentos de la harina, así como un incremento en la energía necesaria para el proceso.

Una vez confirmados los procedimientos de extracción e inactivación de lectinas de las

suspensiones de *C. ensiformis*, se realizó una última corrida y una vez concluido el tratamiento térmico, se liofilizaron las muestras con el objeto de conservarlas y realizar análisis posteriores (pruebas de aglutinación, análisis químico proximal, digestibilidad *in vitro* y determinación de aminoácidos).

La tabla 5-14 presenta los títulos obtenidos de las harinas tratadas con HCl, Ca(OH)₂, agua destilada, y tratamiento térmico (estas harinas después de aplicado el tratamiento fueron liofilizadas y sobre éstas se realizó la determinación de título), así como los de la harina cruda. Para mayor confiabilidad de los resultados, las pruebas de aglutinación para cada condición se realizaron 12 veces. Tomándose como título final aquel cuyo valor fuera el más alto.

Tabla 5-14. Muestras de *C. ensiformis* con adición de ácido o álcali y tratamiento térmico y posteriormente liofilizadas.

Condición % p/v	Tiempo de exposición en microondas (min)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
HCl 0.1%	3	12	11	12	12	12	12
HCl 0.1%	3	12	12	12	12	12	12
HCl 0.1%	5	0	0	0	0	0	0
HCl 0.1%	5	0	0	0	0	0	0
Ca(OH) ₂ 0.02%	3	13	12	13	13	13	13
Ca(OH) ₂ 0.02%	3	12	13	12	13	13	13
Ca(OH) ₂ 0.02%	5	0	0	0	0	0	0
Ca(OH) ₂ 0.02%	5	0	0	0	0	0	0
con H2O dest.	5	5	4	4	4	4	4
con H2O dest.	5	4	4	4	4	4	4
Patrón (+) Harina	0	18	18	19	19	19	19
Patrón (+) Harina	0	18	19	19	19	19	19

En estos resultados se observa que con los dos tratamientos aplicados ácido y álcali se obtuvo la inactivación completa de las lectinas.

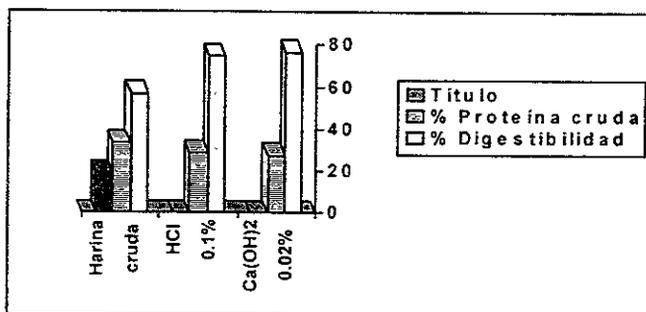
La tabla 5-15 presenta la comparación de los resultados obtenidos de algunas determinaciones tanto de las harinas tratadas como de la harina cruda y así conocer el efecto de los tratamientos aplicados.

Tabla 5-15. Cuadro comparativo de la harina cruda, y las harinas tratadas, en cuanto a título, % de proteína cruda y % de digestibilidad in vitro. Los resultados son el promedio de tres determinaciones, después de una exposición de 5 minutos

DETERMINACIÓN	Harina cruda	HCl 0.1(%p/v)	Ca(OH) ₂ 0.02(%p/v)
Título	19	0	0
%Proteína cruda (6.25)	33.040	27.143	28.570
% Digestibilidad (<u>in vitro</u>)	58.6142	74.4945	76.5884

La fig. 5-4 muestra en una diagrama de barras la comparación de los resultados obtenidos en cuanto a porcentaje de proteína cruda, título y por ciento de digestibilidad in vitro tanto en las harinas tratadas y la harina cruda.

Fig. 5-4. Comparación de % proteína cruda, título y % digestibilidad in vitro en harina cruda y harinas tratadas de *C. ensiformis*



Como se observa, el título que presentó la harina cruda fue relativamente alto y se eliminó por completo en las harinas tratadas con álcali y con ácido. El porcentaje de proteína cruda no disminuyó considerablemente con los tratamientos empleados (ácido, básico y tratamiento térmico). Esta disminución no se esperaba ya que el porcentaje de N debe permanecer constante en las tres muestras de harina, atribuyendo esta ligera disminución a

problemas analíticos. Realizando el análisis estadístico de estos resultados se concluyó que si hay diferencias significativas entre el valor obtenido de las harinas tratada y cruda con una confiabilidad del 95% (el análisis estadístico se encuentra en el apéndice A-2). En cuanto al porcentaje de digestibilidad, existieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con un nivel de confianza del $P=0.05\%$, incrementándose en las harinas tratadas y observándose un mayor aumento con el tratamiento básico. Comparando este resultado con el porcentaje de digestibilidad para la harina cruda, el uso de la energía no ionizante (fuente de temperatura) influye en la conformación de las proteínas, cambiando así su estructura terciaria (referida al modo en que la cadena se curva o se pliega, siendo ésta más estable y rígida en las proteínas de tipo globular), haciéndola más apta para que las enzimas proteolíticas puedan actuar sobre ellas y así hacerlas más digeribles. Aunado a este hecho, también está incluida la eliminación o inactivación de factores tóxicos y antinutrimientales termolábiles que afectan la digestibilidad de una proteína, por citar un ejemplo, los inhibidores de tripsina, que reducen en gran medida la digestibilidad de las proteínas, en este caso las lectinas (Concanavalina A, que es una proteína de tipo globular) están siendo inactivadas en su totalidad por lo que puede atribuirse este éxito al porcentaje de digestibilidad mayor que presentan las harinas que recibieron los tratamientos.

Observando otro factor implicado en la disminución de digestibilidad de las proteínas, está el de su origen ya que las proteínas de origen vegetal tienen una menor digestibilidad que las de origen animal, atribuido a que los alimentos de origen vegetal tienen un contenido mayor de fibra que las de origen animal, por lo que hay una mayor velocidad de tránsito en el tracto intestinal, lo que en consecuencia hace que haya una menor absorción de nutrimentos.

La tabla 5-16. muestra el contenido de aminoácidos tanto de la harina cruda como de las harinas tratadas, obtenidos mediante un aminograma.

El total de los aminoácidos cuantificados en la harina tratada con álcali, presentó un ligero aumento en comparación con el reportado para la harina cruda y la harina tratada con ácido.

Este hecho es atribuido a que en algunos aminoácidos se ve aumentado su valor, como es en el caso de la treonina y la arginina. Observando el cromatograma, se puede inferir que los valores correspondientes a estos aminoácidos no pueden ser muy confiables ya que los picos en donde sobresalen éstos, se advierte una superposición de los picos que impide cuantificar correctamente su valor. La proteína de las harinas tratadas contiene 7 aminoácidos indispensables requeridos por el ser humano, el otro aminoácido esencial no está contenido ya que como se sabe las leguminosas son limitantes de los aminoácidos azufrados no encontrándose el triptofano y la cantidad de metionina reportada es muy baja, en comparación a la reportada por la FAO en 1973. Se puede decir que las proteínas presentes en la harina contienen la mayoría de los aminoácidos esenciales, aunque en cantidades menores a las requeridas por animales monogástricos.

Tabla 5-17. Cuadro comparativo del análisis proximal obtenido de las harinas tratadas y el patrón (g/100g)

COMPONENTE	Harina cruda	HCl 0.1% p/v	Ca(OH) ₂ 0.02% p/v
		Tiempo de exposición en microondas=5 min	
Proteína cruda	33.040	27.143	28.570
Cenizas	2.670	2.576	2.628
Grasa	2.770	3.022	3.106
Fibra	13.670	12.400	12.180
Carbohidratos*	47.850	53.432	54.940

* Obtenidos por diferencia

Estos resultados son el promedio de tres determinaciones

La composición química de las harinas tratadas, presentada en la tabla 5-17, muestran que no hay diferencias significativas en sus componentes en comparación con la harina cruda, lo que implica que los tratamientos aplicados no están influyendo en los valores de estos constituyentes, por lo que hay un mínimo daño producido sobre los mismos por la energía no ionizante.

Como último punto, se procedió a determinar si los tratamientos aplicados a la harina de C.

canavanina, cuantificando su concentración espectrofotométricamente por medio de una curva estándar. La técnica de obtención de la curva, se encuentra en el apéndice A-1. La concentración de canavanina se obtuvo interpolando los resultados de la absorbancia registrada en el espectrofotómetro para cada muestra en la curva patrón (Tabla 5-18).

Tabla 5-18. Muestra la curva estándar de canavanina

Concentración canavanina	estándar canavanina	amortiguador	PCAF (mL)	30°C/25 min	Abs ₅₅₀ nm
0	0.0	9.6	0.4	“	0.000
20	0.2	9.4	0.4	“	0.013
50	0.5	9.1	0.4	“	0.053
100	1.0	8.6	0.4	“	0.143
150	1.5	8.1	0.4	“	0.230
200	2.0	7.6	0.4	“	0.361
300	3.0	6.6	0.4	“	0.550

En donde:

PCAF= Pentacianoamonioferrato

La curva patrón de canavanina se encuentra en el apéndice A-2

La tabla 5-19 presenta los resultados obtenidos. Puede verse que hay una ligera reducción pero no significativa. Esto implica que será necesario estudiar otra metodología para inactivar la canavanina.

Tabla 5-19. Resultado de la concentración de canavanina presente en las harinas tratadas y la harina cruda. Resultado del promedio de tres determinaciones.

Tratamiento	Absorbancia nm	Concentración canavanina (µg/mL)
Ca(OH) ₂ 0.02%	0.057	52.4867
HCL 0.1%	0.083	62.9373
Harina cruda	0.087	64.5451

Los tratamientos aplicados en las harinas para la inactivación de lectinas, no resultaron apropiados para la eliminación del aminoácido no proteico canavanina, aunque hubo una ligera disminución en la harina tratada con álcali. Sin embargo, esta disminución, dado que no es significativa y que la ingestión de este aminoácido trae consecuencias graves si se consume en la dieta, da la pauta para una continuación de esta investigación.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones que pueden derivarse de este trabajo son:

- La radiación no-ionizante es una fuente de inactivación de las lectinas presentes en la leguminosa *C. ensiformis*.
- La inactivación de las lectinas se llevó a cabo empleando 0.1% de HCl y 0.02% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ambas condiciones con tiempos de exposición en el horno de microondas de 5 min, en suspensiones en agua destilada, de 89.36% de humedad.
- El efecto del tratamiento básico es significativamente diferente al efecto del tratamiento ácido, en cuanto a porcentaje de digestibilidad, concentración de canavanina y porcentaje de proteína cruda, con un nivel de confiabilidad del 99%. Por ello se eligió un tratamiento básico en combinación con el tratamiento térmico (microondas) como medio de inactivación de lectinas presentes en la leguminosa *C. ensiformis*.
- La radiación no-ionizante no afecta significativamente los constituyentes de la harina, como son las proteínas, etc.
- Los tratamientos aplicados, mejoraron la digestibilidad in vitro de la harina de *C. ensiformis*.

Las recomendaciones para continuar esta investigación son las siguientes:

- La harina tratada aún no es apta para su consumo, debido a que no se han inactivado el resto de los agentes tóxicos o antinutricios presentes en la harina.
- Para poder optimizar su inactivación, es necesario encontrar las condiciones adecuadas en

donde se destruyan todos los componentes tóxicos de la leguminosa, además de realizar un estudio de digestibilidad in vivo.

- Se recomienda experimentar con otro medio alcalino, como lo es NaOH, teniendo en cuenta la concentración adicionada de sodio para, por un lado observar si es posible reducir los tiempos de exposición en el horno de microondas y, por el otro, no dar en la dieta un exceso de sodio.

- Por otro lado, aun cuando los objetivos fueron cumplidos, a esta metodología no se le puede dar un enfoque comercial, ni se pueden conocer costos en cuanto a energía consumida, ya que como parte inicial de este trabajo es observar la factibilidad del método propuesto, aunque ya se comprobó que el horno de microondas es buena fuente de inactivación de lectinas, quedan otros factores determinantes por analizar para que se pueda decir que la harina obtenida puede ser utilizada como complemento en dietas u otro tipo de formulaciones para alimento pecuario.

Los puntos antes mencionados podrían ser cubiertos en proyectos posteriores cuando se optimice el método y los métodos subsecuentes.

Lo que si se puede hacer mención es que el tiempo de exposición de la harina en el horno de microondas para lograr la inactivación de lectinas es menor a que si se utilizara un tratamiento térmico convencional. por lo que el gasto de energía es menor, además de que se reduce el daño que pudieran sufrir los demás constituyentes de la harina.

BIBLIOGRAFÍA

Agraz-Balcázar, M. G. 1989. Actividad biológica de extractos crudos de lectinas de leguminosas silvestres y comestibles. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México.

AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Assoc. Offic. Anal. Chem. Horwitz, W. Ed. 13a Ed. Washington, D.C. EEUUA.

Baduí-Dergal, S. 1990. Química de los alimentos. Editorial Alhambra-Universidad. P.40. México D.F., México.

Becker, J. W. y Reeke, G. N. 1975. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A: Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. J. Biol. Chem., 250(4):1513-1524.

Cunningham, B. A., Wang, J.L, y Waxdal, M.J. 1975. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A: Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F₃. J. Biol. Chem., 250:4(1503-1512).

Carbajal, A.J.1988. Caracterización agronómica de la C. ensiformis y otras leguminosas con potencial en el municipio de Tizimin. Yucatán. En Memorias de la Segunda Reunión sobre la producción y utilización del grano de C. ensiformis en sistemas pecuarios de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UADY, Mérida, Yucatán, México.

Crail-Chávez, M.L. y Dávila-Ortiz, G. 1989. Efecto del tratamiento térmico alcalino sobre las proteínas del frijol (Phaseolus vulgaris L.). Evaluación de los cambios fisicoquímicos y calidad de la proteína. Tecnol. Aliment. (Méx.), 23(5):13-14.

Chávez-López, M. 1990. Aplicación de la energía de microondas en la industria de alimentos. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México.

Douglas, Ch. y Viera J. 1990. Crecimiento, nodulación y fijación de N₂ en plantas de C. ensiformis, bajo diferentes dosis de fertilización con N₂ y frecuencias de riego. Agronomía tropical, 40:103-107.

Durán-Domínguez, C. Peña-Betancourt, S. Chel-Guerrero, L. A. Calderón-Villagómez, H. 1991 Estudio de inactivación de compuestos tóxicos presentes en C. ensiformis (ayocote) empleando el proceso de extrusión a nivel de laboratorio, banco y planta piloto. FIQ-UADY, México D.F., México

Duch, G. J. 1988. La conformación territorial del Edo. de Yucatán. Tesis profesional, Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Duke, J.A. 1981. Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plenum Press. Nueva York.

Elinbaum, Y. y Bonomo, A. 1990. Efecto de los tratamientos de microondas sobre las propiedades nutricionales y funcionales de porotos alubia. La Alimentación Latinoamericana, 25:52-62.

Emaldi, J. U. y Pérez, E. S. 1990. Caracterización proximal y estudio amilográfico de granos de *C. ensiformis*. Alimentaria. Julio/Agosto Pp. 39-41,

Fearon, W.R. y Bell, E.A. 1954. Canavanine: Detection and occurrence in *Colutea arborescens*. Department of Biochemistry, Trinity College, Dublin, and Department of Biochemistry, King's College London 59:221-224.

Fernández, Q.A y Larralde, J. 1989. Leguminosas y concentrados de proteína: Nuevas perspectivas y aplicaciones. Alimentaria, Enero/Febrero. Pp. 59-62.

García-Ramírez, G. 1989. Efecto de la concentración de extracto de leguminosa para la determinación de lectinas. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México.

Gómez-Rodríguez, F.E. 1986. Caracterización, actividad mutagénica y producción de inmunoglobulinas in vitro, por lectinas de dos variedades de *Phaseolus vulgaris*. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México.

Güemez-Sandoval. E. 1986. Obtención de Concanavalina A, a partir del frijol de *C. ensiformis*. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México D.F., México.

Inbar, M y Sachs, L. 1969. Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Department of Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 63:1418-1424.

Jaffé, G. W. 1980. Toxic constituents of plant foodstuffs. Food Sci. Technol. Series of Monographs. 2a Edición. Ed. Academic Press. Pp. 73-98.

Jaffé, G.W., Levy, A. y González, P.I. 1974 Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinins. Phytochemistry, 13:2685-2693

Kalb, J. A. y Levitzki, A. 1968. Metal-binding sites of Concanavalin A and their role in the binding of α -Methyl D-Glucopyranoside. Biochem, 109:669-672.

- Mancini, F. M. y Vizav, D. M. 1974. Lectins from red kidney beans: Radiation. Effect on agglutinating and mutagenic activity. J. Food Sci., 44:1194-1200.
- Moguel-Ordóñez, Y Betancur-Ancona, D. y Chel-Guerrero, L. 1996. Aprovechamiento integral del grano *Canavalia ensiformis*: Extracción de proteína y almidón. Tecnol. Aliment. (Méx.), 31(1):11-16.
- Mudgett, R. E. 1986. Microwave properties and heating characteristics of foods. Food Technol., 84:84-96.
- Nathan, S y Halina, L. 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science, 177(4053):949-958.
- Olson, O: J. y Liener E. I. 1967. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the Jack bean. Department of Biochemistry, College of Biological Sciences, Minnesota, 6(1):105-111
- Pine, H., Hendrickson, B., Cram, J. y Hammond, S. 1986. QUÍMICA ORGÁNICA. 4ª. Edición, Editorial Mc Graw Hill. P. 170. México D.F., México.
- Potter, N. 1978. LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Irradiación de alimentos y su procesamiento por microondas. Edutex, S.A. 2:326-325, 349-352. México D.F., México.
- Ramírez-Schuetz, M. G. 1985. Aislamiento de Canavanina presente en cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, México D.F., México.
- Román-Gaspar, M. E. 1985. Función de las enzimas ureasa y arginasa durante los primeros estadios del desarrollo de *C. ensiformis*. Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM, Pp. 4-7. México D.F., México.
- Rosenthal, G. A. 1977. Preparation and colorimetric analysis of L-Canavanina. Anal. Biochem, 77:147-151.
- SAGAR. 1995. Claridades Agropecuarias. Datos preliminares al 31 de diciembre. No. 32. Abril 1996. México D.F., México.
- So, L.L y Goldstein, I.J. 1967a. Protein-Carbohydrate interaction: Application of the Quantitative Hapten Inhibition Technique to Polysaccharide Concanavalin A Interaction. Some comments on the Forces Involved in Concanalin A-Polysaccharide Interaction. The Journal of Immunology, 99(1):158-161.
- So, L.L y Goldstein, I.J. 1967b. Protein-carbohydrate interaction: Application of the quantitative precipitation method to polysaccharide-Concanavalin A interaction. J. Biol. Chem, 242(7):1617-1622.

UADY. 1996. Universidad Nacional Autónoma de Yucatán. Laboratorio de investigación en edafología, Departamento de manejo y conservación de recursos tropicales (protrópico) UADY-FMVZ, Comunicación directa, Mérida, Yucatán. México.

Wang, J. L., Cunningham, B.A. 1975. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A: Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F1 and F2. J. Biol. Chem. 250(4):1490-1502.

Yáñez-Ibarra, A. 1985. Comportamiento de las enzimas responsables en la asimilación del amonio en *C. ensiformis*. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM, Pp. 4-7. México D.F., México.

APÉNDICE A-1

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS

1.1. Determinación de humedad (AOAC 1980)

a) Método de la termobalanza

b) Método de secado en la estufa

La humedad se determina usando una termobalanza OHAUS (Mod. MB200 serie 4973) perfectamente calibrada, usando el método de secado en la estufa.

El método consiste en pesar 10 g de muestra en el plato del aparato, extenderla lo mejor posible y conectar el aparato de tal manera que la lámpara quede exactamente sobre la muestra. Seleccionar el tiempo y el voltaje adecuado con los controles. Registrar la variación de peso cuando éste llegue a un valor constante. Calcular el porcentaje de pérdida de peso, el cual corresponde al contenido de humedad de la muestra.

b) Método de secado en la estufa

Pesar 2 g de harina en pesafiltro de aluminio con tapa, el cual ha sido previamente pesado después de secarlo 2 horas a 130°C. Secar la muestra una hora a 130°C con la ventilación abierta. Retirar de la estufa, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

Calcular el porcentaje de humedad reportándolo como pérdida de peso por secado a 130°C:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(A - B)}{m} * 100$$

donde: A= peso del pesafiltro más muestra húmeda

B = peso del pesafiltro más muestra secada en estufa

m = peso de la muestra en gramos

1.2. Determinación de cenizas (AOAC 1980)

Pesar con precisión 3 g de harina en una cápsula de porcelana previamente pesada después de haber sido calcinada 2 horas a 600°C. Calcinar la muestra carbonizándola primero con mechero en una campana de extracción, hasta que ya no salga humo. Meter a la mufla, cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar que los cloruros se volatilicen. Suspender el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises (si se observan puntos negros, humedecerlas con unas gotas de agua destilada, secar en la estufa a 130°C y volver a calcinar). Enfriar en desecador y pesar. El porcentaje de cenizas se calcula con la fórmula:

$$\%Cenizas = \frac{(A - B)}{m} * 100$$

donde: A = peso de la cápsula + cenizas

B = peso de la cápsula vacía

m = peso de la muestra en gramos

1.3. Determinación de grasa (AOAC, 1980)

Método de Goldfish

Poner a peso constante un vaso del aparato de extracción Goldfish con 2 ó 3 perlas de vidrio. En un cartucho del aparato de extracción Goldfish, colocar 2 g de muestra seca. Colocar el cartucho en el aparato de extracción y aproximadamente 60 a 80 mL de éter etílico en el vaso. Realizar la extracción durante 4 a 6 horas hasta que, por medio de una prueba con papel filtro, se conozca el final de la extracción. Retirar el cartucho y reemplazarlo por un tubo para recuperar la mayor parte de éter hasta que el contenido del vaso esté casi vacío. Terminar de llevar a sequedad en una estufa con vacío a 70-80°C, hasta que el peso del vaso con la grasa no varíe más de 5 mg. La concentración de lípidos se calcula por diferencia de pesos y los resultados se expresan en lípidos extraídos por 100 g de material.

1.4. Determinación de fibra cruda (AOAC, 1980)

Se pesan 2 g de harina desengrasada, se colocan en un vaso digestor de 600 mL, se añaden 1 g de asbesto preparado y 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1.25% (0.255N) hirviendo. Se calienta de inmediato (debe empezar a ebullición antes del minuto) y se refluja durante 30 min, rotando el vaso de vez en cuando para incorporar las partículas que se adhieren a las paredes. Se filtra a través de papel seda especial utilizando vacío y se lava con agua destilada caliente hasta que no se dé reacción ácida con rojo de metilo, se pasa el residuo que quede en el filtro al vaso digestor ya limpio, usando una espátula y se repite la operación con una solución hirviendo de sosa al 1.25% (0.313N). Después de refluja 30 min, se filtra sobre el mismo papel seda, se lava con 25 mL de ácido sulfúrico al 1.25% hirviendo y con agua destilada caliente hasta que el filtrado no dé reacción alcalina al rojo de metilo.

Se pasa cuantitativamente el residuo a un vaso de precipitados lavando con agua destilada y se filtra sobre un crisol Gooch que lleva una delgada capa de asbesto y que ha sido calcinado durante 1 hora a 600°C. Se lleva a la mufla y se calcina a 600°C durante 30 minutos. Se enfría y se pesa.

Se determina un blanco, tratando 1 g de asbesto preparado, con ácido y con álcali en la misma forma en que se procedió para la muestra. El contenido de fibra se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%Fibra \cdot cruda = \frac{(A - B)}{m} * 100$$

donde: A = peso del crisol Gooch después de 2 h a 30°C menos el peso del crisol

después de calcinar 30 min, a 600°C

B = peso perdido en la determinación del blanco

m = peso de la muestra en gramos

1.5. Determinación de nitrógeno total (AOAC, 1980)

a) Método Macrokjeldahl

Se pesan 0.5 g de harina en un papel delgado y con todo y papel se introduce en un matraz Kjeldahl de 800 mL; se agregan 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y se añaden pedazos de plato poroso ó perlas de vidrio para regular la ebullición en la destilación. Se coloca el matraz en el digestor del aparato Kjeldahl, abriendo el extractor del vacío y calentando hasta la total destrucción de la materia orgánica. La solución debe quedar completamente cristalina (1 a 2 horas). Se deja enfriar y se diluye con 350 mL de agua destilada enfriando sobre hielo.

Se añade en 40 mL de una solución concentrada de hidróxido de sodio haciéndola resbalar lentamente por la pared del matraz de manera que se estratifiquen las dos soluciones. No debe agitarse porque puede haber desprendimiento prematuro de amoníaco. Se adicionan 0.2 g de polvo de zinc y antiespumante y se conecta inmediatamente el matraz a la trampa de Kjeldahl, unida al refrigerante que, a su vez, está conectado a una alargadera que va introducida en 50 mL de HCl 0.1 N, contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y adicionados de 5 gotas de indicador rojo de metilo al 0.1% en alcohol. Las conexiones deben ser de un ajuste perfecto para evitar las fugas.

Una vez conectado el matraz se agita para mezclar las dos capas e inmediatamente se coloca en la parrilla ya caliente del destilador, se regula la ebullición al inicio de ésta, agitando de vez en vez. Se destila aproximadamente hasta un volumen de 250 mL. Se suspende la destilación, retirando primero el matraz con el destilado de manera que la alargadera quede por encima y antes de apagar la parrilla se deja destilar unos minutos con objeto de lavar la alargadera por dentro y después lavarla por fuera recogiendo los lavados en el mismo matraz.

Se titula el exceso de ácido con solución valorada de NaOH 0.1 N, hasta el vire amarillo del indicador.

Se corrige mediante una determinación en blanco de los reactivos usados empleando la misma cantidad de papel.

El % de nitrógeno se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{Nitrogeno} = \frac{(mL \cdot \text{blanco} - mL \cdot \text{problema})(N(\text{NaOH}))(0.014)}{\text{masa} \cdot \text{muestra}} * 100$$

El % de proteína cruda se obtiene multiplicando el valor obtenido en % Nitrógeno por el factor 6.25 o el que corresponda al tipo de proteína.

1.6. Digestibilidad *in vitro*. (Método de Akbson y Stahmann)

En un vaso de precipitados de 600 mL se coloca 1 g de la muestra problema y se digiere de la siguiente manera: se añaden 430 mL de agua, 0.5 g de pepsina y 16 mL de ácido clorhídrico al 10%; se agita perfectamente y se coloca el vaso en una estufa a 38-40°C durante 16 horas, agitando de vez en cuando. Transcurrido este tiempo se añaden 11 mL de ácido clorhídrico al 10%, se agita y se deja a la misma temperatura durante 8 horas más, pasadas las cuales se añaden otros 11 mL de HCl al 10%, agitar dejar nuevamente en la estufa durante 16 h; transcurridas éstas se añaden 11 mL de HCl al 10%, se agita y se deja por último durante 8 h a 38-40°C. Pasadas las últimas 8 h se deja enfriar el vaso y su contenido; se filtra y se lava con agua caliente el vaso y el residuo en el filtro.

Se deben determinar las proteínas del residuo por Macrokjeldahl y las proteínas totales de la muestra problema, por Microkjeldahl.

1.7. Método Microkjeldahl

Reactivos: Ac. sulfúrico conc., óxido de mercurio, sulfato de potasio, ácido bórico con indicadores (*), hidróxido de sodio 1:1. Indicador A: 100 mg de fenolftaleína aforados a 100 mL con etanol. Indicador B: 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con etanol.

(*) Se pesan 5 g de ácido bórico y se colocan en matraz aforado de 1 L, se adiciona agua

hasta disolver y a continuación se agregan 35 mL de indicador A y 10 mL de indicador B. Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera y aforar a un litro con agua.

Determinación:

Pesar de 50 a 100 mg de muestra en un pedazo pequeño de papel delgado, envolver bien para que no se salga la muestra e introducir en el matraz de microkjeldahl; añadir un gramo de sulfato de potasio, 40 mg de óxido mercuríco, 3 mL de ác. sulfúrico conc. y unas perlas de vidrio. Colocar el matraz en el digestor y calentar hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz esté completamente claro y no contenga residuos de materia orgánica. Dejar enfriar, disolver el residuo en la menor cantidad de agua posible (5-10 mL), pasar esto al matraz de destilación, enjuagar el matraz dos veces con la mínima cantidad de agua posible y añadir estos lavados al aparato de destilación. A la salida del condensador del destilador colocar un vaso de precipitados de 250 mL que contenga 50 mL de ác. bórico. Se añaden 20 mL de NaOH 1:1 a la copa de adición del microdestilador y con mucho cuidado se abre la llave de adición del microdestilador para poder liberar el amoníaco de la mezcla de reacción. Continuar la destilación hasta obtener 50 mL del destilado, por último retirar el vaso del dispositivo y abrir la llave de succión, sacar el residuo de la mezcla de reacción. Pasar el contenido del vaso a un matraz Erlenmeyer y titular con una solución valorada de HCl 0.01N, hasta el vire del color verde a rojo fresa. Hacer un blanco utilizando un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra procediendo de la misma manera. La determinación de proteínas por macrokjeldahl se hace igual que para el análisis proximal.

2.0. Detección y determinación colorimétrica de canavanina

Esta determinación es propuesta por Fearon y Bell (1954). Está basada en el hecho de que los compuestos que tienen el grupo guanidoxi (-O-NH-C-NH₂), como la canavanina, reaccionan con el reactivo específico de pentacianoamonioferrato produciendo un color rojo magenta.

La determinación tiene como objetivo conocer la variación en la concentración de canavanina, como consecuencia de los tratamientos aplicados a la harina de *C. ensiformis*, si es que hubo efecto o no, y en qué medida.

Esta determinación se llevó a cabo en las harinas tratadas y en la harina sin tratamiento.

Material

Espectrofotómetro SPECTRONIC 21.

Potenciómetro

Agitador magnético

Balanza analítica Sartorius

2.1.1. Reactivos

Solución de HCl 0.1N

Solución de NaOH 1N

Solución amortiguadora de fosfatos a un valor de pH de 7

Solución de pentacianoamonioferrato (PCAF) al 1%. ALDRICH

L-Canavanina (jack bean), SIGMA

2.1.2. Técnica

Para la extracción de canavanina con HCl 0.1N, se pesan de 100-150 mg de la muestra preparada, se colocan en un vaso de precipitado pequeño con un magneto, adicionando 20 mL de HCl 0.1N y dejando en agitación toda la noche a 200 rpm. Se filtra el extracto sobre papel filtro doble (Watman #4) y con ayuda de vacío, se ajusta el pH cerca de la neutralidad (6.5-7.0) con NaOH 1N en un potenciómetro. El filtrado ajustado se afora a 25 mL, se toman 3 alícuotas de 0.5 mL, a cada una se adicionan 9.1 mL de solución amortiguadora a pH 7 y 0.4 mL de PCAF. Se lleva a un baño de 30°C, se deja por 25 min.

Pasado este tiempo se lee en un espectrofotómetro a 550 nm.

Si la alícuota de 0.5 mL no es suficiente para dar una lectura, se puede tomar una mayor cantidad de alícuota, hasta un volumen de 3 mL, en este caso será necesario introducir un blanco, para tomar en consideración la coloración del extracto, para lo cual a la mezcla de reacción se le adiciona 0.1 mL de NaOH 5 N tomando en cuenta que el volumen final es de 10 mL; con este tubo se ajusta a 100% de transmitancia.(Fearon y Bell, 1954; Rosenthal, 1977)

APÉNDICE A-2

Métodos estadísticos

Análisis de varianza, diseño por bloques y prueba de Duncan, efectuados para conocer el efecto de los tratamientos en el porcentaje de proteína de las harinas.

Si la F experimental era mayor que F de tablas se considera que existen diferencias significativas de este componente con los tratamientos aplicados.

FV	S.C	GL	CM	F Exp.	F Tablas	Nivel
Tratamiento	60.7194	2	30.3597	1152	5.1433	0.05
Error	0.1581	6	0.02635		10.92	0.01
Total	60.83	8	--		3.43	0.1

A_1 =Tratamiento ácido, A_2 =Tratamiento alcalino; A_3 =Harina cruda

Y_{A1} = 27.14

Y_{A2} = 28.55

Y_{A3} = 33.22

$\alpha=0.05$

	2	3
rp	3.46	3.58
RP	0.3242	0.3350

$Y_{A1} - Y_{A3} = 33.22 - 27.14 = 4.67 > 3.242$ Tratamientos significativamente diferentes

Era de esperarse ya que se está comparando una harina que no ha recibido ningún tratamiento con una harina tratada con ácido y tratamiento térmico.

$Y_{A1} - Y_{A2} = 33.22 - 28.55 = 6.08 > 0.335$ Tratamientos significativamente diferentes

Favoreciendo a la harina tratada con álcali.

$Y_{A3} - Y_{A2} = 28.55 - 27.14 = 1.41 > 0.3242$ Tratamientos significativamente diferentes

Asimismo, se realizaron análisis estadísticos por bloques del porcentaje de digestibilidad "in vitro" de la harina cruda y las harinas tratadas. Se busca si existen diferencias significativas entre tratamientos.

FV	S.C	GL	CM	F Exp.	F Tablas	Nivel
Tratamiento	6.72	1.6	6.72	158.1	7.71	0.05
Error	0.17	4	0.0425		21.20	0.01
Total	6.89	5				

Encontrándose que si hay diferencia significativa entre tratamientos, favoreciendo los resultados a la harina tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02%

A_1 =Tratamiento alcalino, A_2 =Tratamiento ácido.

$Y_{A1} = 76.5884$

$Y_{A2} = 74.4945$

$\alpha = 0.01$

	2
rp	3.93
RP	0.4676

$Y_{A1} - Y_{A2} = 76.5884 - 74.4945 = 2.0939 > 0.4676$ Los tratamientos son significativamente diferentes.

También se hicieron análisis estadísticos por bloques de la concentración de canavanina presente en la harina cruda y las harinas tratadas. Si existen diferencias significativas entre tratamientos se verifica cuál se favorece.

FV	S.C	GL	CM	F Exp.	F Tablas	Nivel
Tratamiento	415.74	2	207.87	3.9416	5.14	0.05
Error	312.426	6	52.737		10.92	0.01
Total	728.166	8				

Si existen diferencias significativas entre tratamientos. Favoreciendo a la harina tratada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02%

A_1 = Harina cruda, A_2 = Tratamiento alcalino; A_3 = Tratamiento ácido

Y_{A1} = 72.006

Y_{A2} = 52.013

Y_{A3} = 70.776

$\alpha=0.05$

	2	3
rp	3.46	3.58
RP	14.506	15.0098

$Y_{A1} - Y_{A2} = 72.006 - 52.013 = 20.993 > 15.0098$. Los tratamientos son significativamente diferentes. Se favorece el tratamiento alcalino.

$Y_{A1} - Y_{A3} = 72.006 - 70.776 = 1.236 < 14.506$. Tratamientos significativamente iguales, El tratamiento ácido no modifico significativamente el contenido del aminoácido canavanina en la harina de *C. ensiformis*.

$Y_{A3} - Y_{A2} = 70.770 - 52.013 = 18.763 > 15.0098$ Tratamientos significativamente diferentes. Se favorece el tratamiento alcalino.

En la siguiente figura se observa la curva estándar de canavanina, datos que se encuentra en la tabla 5-18 y 5-19 del capítulo resultados y discusión.

Fig. 5-4. Curva patrón de canavanina

