



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio etnobotánico, bromatológico y toxicológico en brotes, botones
florales y semillas de guaje verde (*Leucaena leucocephala*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

ERIKA SABINA REYES ORTÍZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Bernardo Lucas Florentino

VOCAL: M. en C. Lucia Cornejo Barrera

SECRETARIO: Q.F.B. Juan Diego Ortíz Palma Pérez

1er. SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández

2° SUPLENTE: M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ANEXO 1 DEL LABORATORIO 4A Y 4C, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M EN C. MARÍA EDELMIRA LINARES MAZARÍ

SUSTENTANTE:

ERIKA SABINA REYES ORTIZ

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
2.1 Objetivo General:	4
2.2 Objetivos particulares	4
3. MARCO TEÓRICO O GENERALIDADES	5
3.1 Leguminosas.	5
3.2 Guaje Verde (<i>Leucaena leucocephala</i>)	6
3.2.1 Antecedentes etnobotánicos del Guaje	7
3.2.2 Usos en el Campo	9
3.2.3 Composición Química del Guaje	10
3.3 Digestibilidad in Vitro	11
3.4 Factores Tóxicos y Antinutricionales	12
3.4.1 Inhibidores de tripsina	13
3.4.2 Lectinas (fitohemoaglutininas)	14
3.4.3 Taninos	15
3.4.4 Nitratos	16
3.4.5 Mimosina	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
4.1 Obtención de datos Etnobotánicos	19
4.1.1 Análisis bibliográfico	19
4.1.2 Corroboración en campo de información etnobotánica	19
4.2 Recolección del Material biológico	19
4.2.1 Limpieza del Material biológico	20
4.3 Determinación de Humedad Original	20
4.4 Análisis Proximal	21
4.4.1 Determinación de Humedad por secado al vacío	23
4.4.2 Determinación de Grasa	24
4.4.3 Determinación de Fibra Cruda	26
4.4.4 Determinación de Proteína Cruda	29
4.4.5 Determinación de Cenizas	32
4.4.6 Determinación de Hidratos de Carbono	33
4.4.7 Proteína Verdadera	33
4.4.8 Fibra Dietética Total	37
4.4.9 Digestibilidad in Vitro	44

4.5	Determinación de Factores Tóxicos	47
4.5.1	Inhibidores de Tripsina	47
4.5.2	Lectinas	50
4.5.3	Taninos	55
4.5.4	Nitratos	58
4.5.5	Mimosina	63
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
5.1	Datos Etnobotánicos	66
5.2	Determinación de Humedad en material biológico en fresco	69
5.3	Análisis Proximal	70
5.4	Análisis de Factores Tóxicos	75
6.	CONCLUSIONES	79
7.	BIBLIOGRAFIA	81

RESUMEN

La utilización de las leguminosas presenta beneficios múltiples desde los puntos de vista social y económico, así como en el mejoramiento ambiental de los recursos naturales y productividad tanto de la vegetación asociada y del ganado en pastoreo. Su utilización para la alimentación, tanto del ser humano como de los animales, se remonta a tiempos inmemoriales. Su importancia radica en el elevado contenido proteínico lo cual las convierte en una importante y económica fuente de proteína vegetal.

La presente investigación consistió en evaluar la composición bromatológica, el contenido de factores tóxicos naturales y anti nutricionales de brotes, botones florales y semillas de la leguminosa denominada Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) y con base a la información etnobotánica recabada en el municipio de San Sebastián Zinacatepec y Tehuacán Puebla evaluar el potencial nutritivo de estas partes comestibles.

En base al estudio etnobotánico realizado los nombres comunes con los que es conocida la *Leucaena leucocephala* son múltiples y variados, dependiendo del área geográfica y cultura, sin embargo el más común es “guaje”. De acuerdo a la composición bromatológica se obtuvo que las tres muestras comestibles de guaje verde presentan un alto contenido de proteína cruda y proteína verdadera, siendo para ambos casos la semillas las que presentan los mayores porcentajes de las tres muestras con 34.03% y 22.06% respectivamente determinado en base seca. De igual manera las tres muestras tuvieron una digestibilidad *in vitro* que oscila alrededor del 59%. En cuanto a la toxicología analítica se obtuvo que las semillas presentan un contenido alto de mimosina con un 5.05% (en base seca) y un contenido de lectinas menor a 1UHG/g muestra. Dentro de los factores antinutricionales los brotes en base seca presentan un 10.11% de inhibidores de tripsina, los botones florales 6.24% de taninos y el contenido de nitratos está por debajo del Límite Máximo Permisible (LMP) ya que no fue posible cuantificarlos con la metodología empleada.

De acuerdo a los datos obtenidos en el análisis bromatológico, la toxicología analítica y en conjunto con la información etnobotánica se obtuvo que la *Leucaena leucocephala* presenta un alto contenido de proteína, sin embargo el consumo por humanos en grandes cantidades puede causar un riesgo a la salud por el contenido de factores tóxicos.

1. INTRODUCCIÓN

La actual situación nutricional de la población mexicana es un indicador más de la notable desigualdad social que existe en el país, es por ello que desde hace ya algunos años México presenta el problema de la escasez de alimentos de alta calidad nutritiva ocasionada por el alto índice demográfico y la desfavorable situación socioeconómica de ciertas regiones y sectores de la población ocasionando así un alto porcentaje de desnutrición proteínico-energético, la cual afecta principalmente a la población de bajos recursos económicos, en especial al sector infantil y al sector de la tercera edad. De acuerdo a cifras reportadas por el INEGI 50.6 millones de mexicanos, en el 2008, vivían en condiciones de pobreza de patrimonio y 19.5 millones se encontraban en situación de pobreza alimentaria. [3, 37]

Debido al problema del hambre y en consecuencia la desnutrición que asecha al país, es importante la búsqueda de nuevas alternativas alimentarias y que sean de buena calidad, sostenibles y baratos. México cuenta con una gran biodiversidad vegetal que es destruida en forma indiscriminada; sin embargo, esta puede ser incorporada en la alimentación animal e incluso humana. Dentro de dicha vegetación se encuentran especies de plantas de la familia de las leguminosas, las cuales ocupan uno de los primeros lugares de importancia en el consumo humano después de los cereales. En la actualidad las leguminosas son uno de los alimentos de origen vegetal de mayor consumo en dietas de los países en vías de desarrollo. [2,7]

Dentro de las leguminosas se reconoce a las semillas como una buena fuente de proteína ya que el rango va de 20 al 35% de proteína bruta, aunque hay variedades de semillas que pueden presentar un contenido superior. En algunas comunidades el consumo de leguminosas no solo se limita a las ya conocidas como son: frijoles, garbanzos, lentejas entre otras, si no que aprovechan algunos de los cultivos incipientes de leguminosas que se dan en la región como es el caso de los guajes verdes (*Leucaena leucocephala*) en Tehuacán Puebla, pertenecientes al género *Leucaena*, de los cuales se consumen las hojas, flores y semillas.

El Guaje es una leguminosa forrajera de tipo arbustivo, que en forma natural abunda en nuestro país y la ramonea el ganado. Es muy digestible con alto porcentaje de proteína (superior al 25%), resistente al pastoreo y fertilizadora del suelo. Se reporta en la literatura, que las hojas llegan a presentar hasta un 30% de proteína, sin embargo, contiene una sustancia tóxica llamada mimosina, aminoácido libre no proteínico muy común en el género *Leucaena*, que actúa lentamente causando alopecia y bocio. [15, 16]

A pesar de sus importantes atributos nutricionales, el bajo aprovechamiento de las leguminosas se debe, principalmente, a que suelen contener factores tóxicos naturales como lo son: Inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas (lectinas), taninos y nitratos, los cuales se encuentran muchas veces en las hojas, vainas, y semillas. Debido a que en Tehuacán Puebla y municipios aledaños existen regiones con zonas templadas, tropicales y áridas y el crecimiento de leguminosas se da de manera óptima se pretende en este trabajo estudiar las tres partes comestibles del guaje verde que crecen en dichas zonas a través del análisis bromatológico y toxicología analítica que se propone en este trabajo con el fin de verificar de acuerdo a los resultados obtenidos si es conveniente y recomendable el consumo de las tres partes comestibles de la planta *Leucaena leucocephala* (brotes, botones florales y semillas) en la dieta alimentaria de los habitantes de las regiones donde se da dicha planta aprovechando el uso de la vegetación silvestre que es propia de algunos estados de la República Mexicana.

Ya que lo que se busca es el aprovechamiento de estas tres partes comestibles del guaje verde como fuente potencial de proteína, por un lado se pretende realizar para cada una de las muestras la determinación del análisis químico proximal, proteína verdadera, fibra dietética total y digestibilidad proteínica *in vitro* de la harina desengrasada de cada muestra, por otro lado es importante saber si existe la presencia de agentes tóxicos ya que varios de estos se encuentran en las semillas de las leguminosas y la presencia de estos factores tóxicos en las semillas las hace un alimento no apto para el consumo humano, por ello se evaluarán los siguientes factores tóxicos y antinutricionales: Inhibidores de tripsina, lectinas, taninos y nitratos y se implementará el método para la determinación de mimosina.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General:

Realizar la caracterización bromatológica y el contenido de los factores tóxicos naturales en brotes, botones florales y semillas del Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) consumidos en los municipios de San Sebastián Zinacatepec y Tehuacán Puebla y evaluar el potencial alimenticio de estos alimentos no convencionales y así demostrar su beneficio nutricional sin que presente un riesgo potencial por la presencia de factores tóxicos naturales en el material de estudio.

2.2 Objetivos particulares

- Analizar las tres formas de consumo del guaje verde del municipio de San Sebastián Zinacatepec en la Ciudad de Puebla y Tehuacán Puebla con base en la información etnobotánica obtenida en la misma área geográfica.
- Realizar el análisis proximal en la harina de los brotes, botones florales y semillas del Guaje verde.
- Realizar la determinación de proteína verdadera, fibra dietética total y digestibilidad *in vitro*.
- Realizar la toxicidad analítica (inhibidores de tripsina, lectinas, taninos y nitratos) en las muestras de guaje verde.
- Implementar el método para cuantificar el aminoácido no proteínico mimosina en el material en estudio.
- Evaluar el balance riesgo-beneficio del material biológico con fines alimenticios tomando en cuenta los aspectos bromatológicos y etnobotánicos, junto con la toxicología analítica.

HIPÓTESIS

Si encontramos que el contenido nutrimental de todas o algunas de las partes de la *Leucaena leucocephala* presenta beneficios nutritivos y el contenido de los factores tóxicos naturales no presenta un riesgo a la salud de los consumidores entonces se puede proponer su ingesta como complemento de la dieta en las comunidades rurales.

3. MARCO TEÓRICO O GENERALIDADES

3.1 Leguminosas.

Las leguminosas constituyen un extraordinario grupo de plantas superiores con flor. Son de distribución universal y en cada zona o región hay una “judía” o “guisante” local. Alrededor del mundo existen aproximadamente 19,400 especies de leguminosas, distribuidas en casi 730 géneros; de estas, una mínima cantidad ha sido domesticada con fines antropogénicos, mientras que el resto han sido empíricamente utilizadas en sus ecosistemas naturales con múltiples propósitos. La utilización de las leguminosas presenta beneficios múltiples desde los puntos de vista social y económico, así como en el mejoramiento ambiental, de los recursos naturales y productividad tanto de la vegetación asociada y como del ganado en pastoreo. [29, 43]

En cuanto a composición, existen básicamente dos grupos de leguminosas. En primer lugar un grupo rico en proteína y aceite, en el que figuran la soya, cacahuate, altramuza y la judía saltadora. El segundo grupo comprende los tipos de leguminosas con un contenido alto de proteína y bajo de aceites. Las leguminosas representativas de este grupo son muy importantes como alimento humano. [29]

La utilización de las leguminosas para la alimentación, tanto del ser humano como de los animales, se remonta a tiempos inmemoriales. Su elevado contenido proteínico las convierte en una importante y económica fuente de proteína vegetal, que adquiere especial relevancia en aquellos países en que la ingesta proteínico-energética es baja, y donde han sido consideradas como “carne de los pobres”. Las cantidades de este nutriente en las leguminosas habituales en nuestra alimentación pueden oscilar entre el 17% (judías) y el 42% (soja), son por lo tanto imprescindibles en lo que a aporte de proteínas se refiere en los países en vías de desarrollo. Las leguminosas destacan por su contenido en hidratos de carbono y en algunos minerales y vitaminas, así como por la baja cantidad de grasa con excepción de aquellas auténticas oleaginosas como la soya, cacahuate entre otras. [2]

Las leguminosas presentan algunos inconvenientes desde el punto de vista nutritivo, su digestibilidad es baja, pueden contener factores tóxicos y antinutricionales como inhibidores de la proteasa, saponinas, hemaglutininas y latirógenos. Afortunadamente

algunos de estos factores tóxicos presentes en las leguminosas se destruyen al someterlas a remojo durante 24 horas seguidas de una prolongada cocción. Dentro de los hidratos de carbono, las legumbres muestran un alto contenido en fibra dietética, con valores del 10 al 20%. [29]

Como prueba de su toxicidad se ha reportado bocio endémico en algunas comunidades de Indonesia, relacionada a la ingesta de ensaladas preparadas con brotes jóvenes, vainas y semillas verdes de especies de *Leucaena ssp.* [13, 16]

3.2 Guaje Verde (*Leucaena leucocephala*)

El guaje es una leguminosa arbustiva, perenne, de alto contenido nutricional, especialmente como fuente de proteínas y que se utiliza para consumo humano. Es un árbol o arbusto caducifolio o perennifolio. En México mide de 1 a 6 m de altura, pero puede llegar a medir hasta 12 metros y tener un diámetro de 25 cm. A pesar de su altura reportada, la *Leucaena* puede despuntarse aproximadamente a 1 m del suelo, lo que mantiene los brotes jóvenes al alcance de los bovinos que ramonean y evita que las vacas rocen sus ubres contra los tocones. [31,32, 34]

Posee cabezuelas con 100 a 180 flores blancas, de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flor de 4.1 a 5.3 mm de largo. Vainas oblongas, estipitadas, en capítulos florales de 30 o más vainas, de 11 a 25 cm de largo por 1.2 a 2.3 cm de ancho, verdes cuando tiernas y cafés cuando maduras; conteniendo de 15 a 30 semillas. Semillas ligeramente elípticas de 0.5 a 1 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho, aplanadas, dispuestas transversalmente en la vaina. La semilla está cubierta por una cera que retarda la absorción de agua durante la germinación. [31,36]

Es una especie de amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del país, es decir, en zonas del trópico húmedo, trópico subhúmedo, árida y semiárida, acuática y subacuática. [31, 32, 34]

Por ser una planta de origen tropical, crece bien desde el nivel del mar hasta los 1,500 m de altitud y prospera en temperaturas altas, siendo las óptimas entre 25 y 35°C. Se desarrolla mejor en completa exposición a la luz solar, es tolerante a la sombra, sin embargo su

crecimiento es lento. El Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) tolera una gran variedad de condiciones de suelo, desde suelos pedregosos y esqueléticos hasta arcillas densas, así como desde suelos neutros hasta alcalinos siempre y cuando sean suelos bien drenados, no compactados ni ácidos, el guaje también es capaz de tolerar sequias. [31, 34, 36]

Su distribución nativa es en la península de Yucatán, el Istmo de Tehuantepec y Golfo de México. En México se distribuye en todo el territorio; Campeche, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Puebla, San Luís Potosí, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Morelos y Distrito Federal, excepto en los estados de Baja California, Chihuahua, Aguascalientes, Zacatecas, y Guanajuato. [8, 31, 32, 34]

A continuación se presenta en la figura 1 una fotografía tomada en el Municipio de San Sebastián Zinacatepec donde se muestran las diferentes etapas de maduración del Guaje verde.



Figura 1. Fotografía que muestra los brotes, botones florales y frutos del Guaje verde.

3.2.1 Antecedentes etnobotánicos del Guaje

Guaje es el nombre común con el que se le conoce a diversas especies de árboles y arbustos del género *Leucaena*, cuya familia son las Fabáceas. [28]

Los nombres comunes con los que también es conocido el guaje son: cascahuite, guash o huash, guashi o guaxi, huasi, oaxe entre otros. [30]

Es conocido en otras regiones como: almendra de guaje (Sinaloa, *Leucaena leucocephala*), cacala (Zacualpan de Amilpas, Morelos). Conocido en la Sierra Norte de Puebla como: huaxi (nahua), lakak (totonaca), liliaz (totonaca). En Chiapas es conocido como: casi, chajal, chjlib, guaje de Castilla, huashi, pacapaca y uaxi. Conocido en otras lenguas como: guaxiquilitl (náhuatl), huaxin (náhuatl), kuata (huichol). [30]

Históricamente el primer uso de *Leucaena* pudo haber sido como alimento para humanos, en muchas regiones del sur de México se cultiva para utilizarse como alimento, las partes que se aprovechan son los retoños de las hojas, los tallos jóvenes, las yemas florales y las semillas cuando ya son maduras, estas partes son consumidas en diferentes modos, por ejemplo: los retoños y tallos tiernos son usados como condimentos en los frijoles, también pueden ser hervidos y consumidos como verduras. Las semillas son las que más comúnmente se aprovechan, ya sea mediante salsas o crudas directamente de la vaina a la boca. Las especies que más se utilizan para este propósito son: *Leucaena leucocephala* y *Leucaena esculenta* (guaje rojo), debido a las características de las semillas y por su distribución que se encuentra hasta en los centros de población. En comunidades rurales e indígenas se consumen sus semillas crudas, cocidas, tostadas o molidas; también se utiliza para dar consistencia y sabor al huaxmole [30]. El huaxmole es un guiso preparado con las semillas de guaje, es típico de los estados del centro del país. En Guerrero es un platillo muy común, especialmente en la zona norte del estado y en Chilpa; se trata de un guiso espeso elaborado con semillas de guaje, jitomate, chile y carne. En Puebla se preparan varios tipos de huaxmole, tienen mayor preferencia en Tehuacán y la sierra [30]. Las vainas se venden en los mercados populares del centro del país en pequeños montoncitos o en rollos. En el estado de Morelos las semillas crudas son también muy populares como golosinas y se preparan las tortitas de guaje. Las semillas secas conocidas como huajesquite, se emplean molidas para dar volumen a las tortas de camarón seco de vigilia. Las hojas o retoños tiernos de guaje crudo llamados huaxquelite, se comen en tortilla de maíz con sal y chile piquín asado o en salsa. En Nayarit, los huicholes lo consumen frescos, molidos con chile silvestre y sal con salsa. [8]

La *Leucaena* o Guaje ha sido usada en México desde la conquista como planta medicinal, ya que puede aliviar daños por parásitos intestinales. En la población Zapoteca la utilizan

como colorantes de sarapes. En la península de Yucatán solo se usa para fines medicinales y es poco utilizada como alimento; en Veracruz se utiliza como cerca viva, y en algunas regiones de ese estado y Puebla es comestible, cultivada o semicultivada. La flor se utiliza para la elaboración de aceites esenciales aromáticos; los frutos son muy apreciados por su alto contenido de vitamina A y proteína (46%). [8, 31]

En México y las Filipinas usan las semillas para hacer artesanías como collares y pulseras. En México se extraen tintes rojos, marrones, y negros de las vainas, hojas y corteza. [8, 31, 35].

3.2.2 Usos en el Campo

La *Leucaena* o guaje es un árbol multipropósito, aparte de producir forraje, se usa en muchas partes de los trópicos como un árbol de sombra o una siembra acompañante en plantaciones de cacao, café, té vainilla y otras siembras de enredadera, coco, hule, teca y cinchona, también se utiliza como barrera rompevientos, como soporte para plantas trepadoras tales como haba, vainilla y camotes y soporte en viñedos, mejoramiento de suelos degradados y en disturbio. Las Vainas y semillas son usadas como alimento para humanos, medicinal, leña y setos. [8, 34, 35]

Entre sus características forrajeras se encuentra su uso como Bancos de Proteína ya que produce alta ganancia en peso y producción de leche. Un estudio realizado en Colima reporta que hubo un incremento significativo en peso de 1,0 hasta 2,5 kilogramos por uso de *Leucaena leucocephala* en sistemas bovinos. También es usada en praderas asociadas, forraje verde y sistemas agroforestales. Tiene buen valor nutricional, tolerancia a sequias, larga vida y de bajo costo, como fijadora de nitrógeno atmosférico, mejora la fertilidad del suelo y el crecimiento de los pastos asociados. [35]

Desde 1900, la *Leucaena* fue reconocida en Indonesia como un fertilizante orgánico y mejoradora del suelo; algunos trabajos sugieren que puede convertirse en una de las fuentes renovables de nitrógeno más barato del mundo, debido a que esta planta tiene la capacidad de fijar nitrógeno, además de que al incorporar las hojas al suelo, éstas lo fertilizan y lo mejoran en sus condiciones físicas y biológicas, porque al descomponerse aumentan los

organismos que viven en el suelo y se reconstituye el humus. Además el follaje es comparable con el estiércol desde el punto de vista de su contenido de nitrógeno y sus raíces expansivas desintegran capas del subsuelo impermeable, lo cual mejora la penetración de la humedad y disminuye la escorrentía en la superficie, que hace que los elementos nutritivos de las capas profundas se depositen paulatinamente en la superficie. [8]

Sin embargo a pesar de sus usos la *Leucaena* se considera a veces como una “mala hierba” debido a su capacidad de colonizar rápidamente y su tendencia a formar matorrales densos en sitios perturbados. [31, 35]

3.2.3 Composición Química del Guaje

Hace unos años los especialistas la catalogaron como la leguminosa tropical más productiva y sustentable, dedicándole una gran cantidad de trabajos de investigación. Se sabe entonces que sus hojas son ricas en proteína y que es fácilmente digerida por los rumiantes. La digestibilidad de la proteína alcanza el 63% y la digestibilidad de la materia seca entre 60 y 70% medida *in vivo*. [6, 38]. Otros datos reportan una digestibilidad *in vitro* que van desde 59.1 hasta 69.8; Marlene reporta 59.1%, Saavedra et al., reportan valores de digestibilidad *in vitro* entre 61 y 64% y Hernández reporta valores de 67.6 a 69.8%. La *Leucaena leucocephala* es utilizada en la alimentación animal debido a que posee un alto valor nutritivo considerando su elevado contenido en proteína cruda que va desde el 24 hasta el 37%, dependiendo de la variedad, época del año, condiciones de clima y suelo donde se cultive. [18,40].

Uno de los principales inconvenientes para su uso es la presencia del aminoácido tóxico mimosina, que se localiza en la fracción soluble de la planta. Su contenido en la leguminosa oscila entre 2 y 5%, ésta variación depende de la especie, variedad, estado de la planta y época de cosecha. La mayor concentración se presenta en las partes tiernas de activo crecimiento, así las hojas tiernas contienen dos a tres veces más que las hojas maduras y el follaje de tres o cuatro veces más que los tallos. Con dietas mayores al 40% de *Leucaena* pueden aparecer síntomas de intoxicación con mimosina. La intoxicación en animales por

mimosina se manifiesta como anorexia, disminución en la ganancia de peso, ptialismo, incoordinación, ceguera y muerte. Los monogástricos son más sensibles a esta intoxicación ya que los rumiantes, mediante la microflora rumial, son capaces de transformar la mimosina a un compuesto menos tóxico que es la Dihidroxi piridina. Este efecto tóxico es el principal factor que ha limitado su difusión y aprovechamiento en la industria animal y en la alimentación humana. La mimosina no es el único compuesto antinutricional existente en la *Leucaena*, se han detectado taninos, lectinas y otras sustancias. [8, 10, 16]

3.3 Digestibilidad in Vitro

La digestibilidad es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento, aunque no siempre se cumple, y es definida como “la disponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo.

El proceso de digestión se ha definido, como el proceso de reducción del tamaño de una molécula orgánica por hidrólisis, ella precede a la absorción que es la entrada de nutrientes, iones y moléculas de las células a través de la mucosa intestinal. Sin embargo los dos fenómenos se miden combinados y al valor obtenido se le llama digestibilidad de un nutrimento. [27]

El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante, ya que este es el que va a marcar la diferencia entre la alimentación cuantitativa de la cualitativa. En las pruebas de digestibilidad o de balance se cuantifican los nutrimentos que se ingieren y se absorben en el tubo digestivo y las cantidades que se eliminan en las heces. Para esto es necesario conocer la cantidad del alimento ingerido como excretado, siendo la diferencia entre ambas cantidades la parte que se asume fue digerida y absorbida, que al ser expresada como porcentaje resulta ser el coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca o de cada uno de los componentes de los alimentos, en general, los valores de la digestibilidad son aparentes ya que normalmente no se hacen mediciones, ni correcciones de los aportes metabólicos endógenos, tales como enzimas, hormonas, metabolitos y células de descamación, entre otros, que se producen como consecuencia del proceso digestivo y que

aparecen en las heces sin ser un residuo alimentario. Cuando dichos valores son tomados en consideración y corregidos se obtiene la digestibilidad verdadera. [27]

Existen diferentes métodos para determinar la digestibilidad de un alimento, entre ellos se encuentran la digestibilidad *in vivo*, *in vitro* e *in situ*.

El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante ya que existen diferentes nutrientes en éste, unas de fácil absorción y otras que son resistentes a la degradación enzimática en el caso de los animales monogástricos y por ende excretadas en las heces; es precisamente este tipo de análisis los que marcan la diferencia entre la alimentación cuantitativa de la cualitativa de un alimento. Los estudios *in vitro* en condiciones de laboratorio se han desarrollado como alternativa a las técnicas de digestibilidad *in vivo*. Los métodos *in vitro* para probar la digestibilidad de una proteína se basan en el uso de enzimas proteolíticas para correlacionarse con la digestión de la proteína *in vivo*. Para imitar la digestión humana, se usan enzimas gástricas y/o pancreáticas además de enzimas intestinales en el ensayo. La principal ventaja de éste método es la rapidez de éste y la poca cantidad de muestra que se requiere para el ensayo. [27]

3.4 Factores Tóxicos y Antinutricionales

Algunos alimentos habituales en la dieta, además de nutrimentos, contienen proporciones variables de sustancias sin valor nutritivo o incluso peligrosas para el organismo. [12]

Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Las sustancias antinutrimientales, el efecto adverso de las cuales se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida de los nutrimentos indispensables. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que en un inicio se compensa con un aporte suplementario de los nutrientes implicados; sin embargo, si no se corrige a la larga determinan la aparición de una patología particular. Pertenecen, por ejemplo a este grupo las sustancias que provocan el bocio, que

actúan aumentando las necesidades de iodo del organismo, y los inhibidores de los enzimas digestivos, como el factor antitripsina de las leguminosas.

- Los tóxicos de los alimentos, de efectos nefastos, que no pueden compensarse por aporte suplementario de nutrimentos. Son compuestos que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo (en el sentido estricto del término). Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o, en ciertos casos, por la existencia de alteración genética que favorezca la aparición de una determinada patología. [12]

3.4.1 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de las proteasas están muy difundidos en el reino vegetal, son sustancias que se encuentran en la fracción proteínica de las leguminosas aunque también se encuentran en otros alimentos, se caracterizan por su capacidad de inhibir la acción de enzimas digestivas como la tripsina y quimiotripsina. La tripsina es un enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de los monogástricos como el ser humano. Como consecuencia, las proteínas no son digeridas adecuadamente, lo que afecta a la disponibilidad de los aminoácidos. [9, 41]

Los inhibidores de proteasas son proteínas termolábiles que se encuentran en granos y semillas cuyo consumo reduce la digestibilidad y el aprovechamiento de proteínas que participan en el proceso digestivo. Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Bowman-Birk de la soya. El primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos de un peso molecular de 21500 Daltons con dos enlaces disulfuro, de los cuales uno de ellos es fundamental para su actividad, el segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7975 Daltons, este contiene 8 enlaces disulfuro, se asocia reversiblemente y forma una mezcla monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero. Ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumento de la secreción de la bilis y jugo pancreático. [23, 24]

Los principales efectos adversos de los inhibidores de tripsina son [5]:

- Inhibición del crecimiento
- Reducción de la digestibilidad de la proteína
- Incremento de los requerimientos de aminoácidos azufrados
- Estimula la secreción de enzimas pancreáticas
- Estimula la actividad de la vesícula biliar
- Hipertrofia de páncreas
- Reduce la energía metabolizable

En cuanto al mecanismo de inhibición existen varias teorías entre las cuales se mencionan:

- Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que ellos inhiben
- La enzima e inhibidor experimentan un tipo de interacción enzima-sustrato
- Los inhibidores son resistentes a la proteólisis, aunque la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos

La mayoría de los inhibidores de tripsina, pueden ser destruidos mediante un tratamiento térmico adecuado, con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de las proteínas. [24]

3.4.2 Lectinas (fitohemoaglutininas)

Las lectinas están muy difundidas por la naturaleza, son un grupo importante de proteínas y glucoproteínas que tienen la propiedad de ligar ciertos hidratos de carbono. Cuando los hidratos de carbono forman parte de las paredes celulares, las lectinas causan la aglutinación de las células que las contienen. Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Los estudios llevados a cabo indican que cuando las lectinas se unen a los hidratos de carbono de las células epiteliales intestinales se produce una disminución del transporte de nutrimentos a través de la pared intestinal, hipertrofia de la mucosa, inhibición de las

hidrolasas del borde en cepillo, precipitación de eritrocitos y alteraciones en el sistema inmunitario. [2, 27, 41]

Se caracterizan por tener una gran afinidad con los residuos glucídicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, la cual está asociada a una gran especificidad según la fuente vegetal, propiedad que se utiliza para diferenciar los grupos sanguíneos humanos. [12]

Los efectos de las lectinas en el crecimiento se manifiestan sobre todo por una disminución de la utilización de nitrógeno, de la vitamina B₁₂ y de las calorías de la dieta. [12]

Se ha observado en estudios que cuando animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas crudas con elevado contenido de lectinas presentan diarreas, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso y en algunos casos la muerte. Los eritrocitos de rata son sensibles a una gran cantidad de aglutininas, mientras que los de ternera y oveja son resistentes a la mayoría, [24, 27]

Las fitohematoglutininas como la mayoría de las proteínas, son termolábiles y generalmente su efecto tóxico se puede eliminar o disminuir notablemente por medio de un tratamiento térmico adecuado, presentándose así un incremento en cuanto al valor nutritivo de las leguminosas. Sin embargo, en determinadas condiciones puede no conseguirse una destoxificación completa, sobre todo si se utilizan semillas molidas o si se aplican procedimientos industriales de comida rápida, ya que las lectinas no se inactivan por el tratamiento con calor seco. [9, 41]

3.4.3 Taninos

Los taninos comprenden un grupo amplio de componentes fenólicos capaces de unirse a enzimas y a otras proteínas mediante puentes de hidrógeno, formando compuestos insolubles y termoestables. Esta reactividad particular, es decir, su facultad de combinarse con las proteínas, en la que se basa el curtido de pieles, que presentan los taninos hidrolizables y los taninos condensados, define también su actividad biológica, que se

manifiesta por su gusto astringente. La unión con las proteínas de la saliva de la mucosa bucal provoca el conocido efecto astringente. [2,12]

La presencia de estos polifenoles en los alimentos determina una disminución del valor biológico de éstos, es decir, son responsables de la disminución de la digestibilidad proteínica y de la utilización de aminoácidos azufrados en reacciones de metilación, inactivación de enzimas, así como de la inhibición de la absorción intestinal de azúcares. [12]

Su dosis diaria admitida (DDA) es de 500 mg/día. La astringencia es el factor determinante de una reducida ingestión de los alimentos demasiado ricos en taninos. [12]

Los taninos se localizan a nivel del tegumento de los vegetales, se acumulan en raíces, cortezas, frutos, hojas y semillas, su actividad deriva de su capacidad de ligarse a las proteínas y a desnaturalizarlas, formando complejos estables. [4, 12]

La actividad antinutricional de los taninos puede manifestarse también por la aptitud que tienen estos polifenoles a asociarse a los iones di y trivalentes, disminuyendo la disponibilidad de calcio, hierro y cobre. El ácido tánico, al combinarse con la vitamina B₁₂ y al factor intrínseco, disminuye la disponibilidad de esta vitamina. Por otro lado la vitamina B₁ puede ser destruida por los taninos del té y las reservas hepáticas de vitamina A, disminuyen en presencia de determinados taninos en la dieta. [9, 12, 24]

Pero los taninos ejercen así mismo un efecto beneficioso sobre la salud: tienen actividad antioxidante. Previenen y mejoran enfermedades cardiovasculares, y por último, también parecen ejercer actividad anticancerígena. [9]

3.4.4 Nitratos

Una gran variedad de plantas almacenan nitrato en sus tallos y hojas; especialmente cuando han sido abundantemente abonadas con estas sales. Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos de origen vegetal como componentes inherentes a las plantas, en el aire que se respira y como contaminante en el agua potable debido al uso de fertilizantes

nitrogenados. Los nitratos contenidos en la planta por lo general no son muy tóxicos; su toxicidad radica en la reducción de nitratos (NO_3) a nitritos (NO_2). En Estados Unidos el promedio de ingesta de nitratos es aproximadamente de 75 a 100 mg por día, cerca del 80 a 90% de esta cantidad proviene de los vegetales. [19, 24]

El único síntoma característico es su carácter diurético, esta cualidad terapéutica ha sido empleada desde el siglo XVII. Solo en dos condiciones se puede tener una toxicidad por nitratos: en primer lugar si tiene una ingestión realmente masiva de estos compuestos y en segundo lugar si los nitratos se transforman en nitritos por la microbiota digestiva. El ión nitrito en contraste con el ión nitrato, es inestable, por lo tanto es muy reactivo y está dotado de numerosos efectos tóxicos. El paso del ión NO_3^- al ión NO_2^- no es posible de forma espontánea ya que se trata de una reducción que necesita energía; en los medios biológicos esta reducción sólo puede efectuarse bajo la acción de una enzima, la nitrato reductasa, presente en las plantas y en las bacterias, pero esta enzima está totalmente ausente en los tejidos animales. [12, 24]

En cualquier caso el metabolismo de los nitratos ingeridos es conocido, se absorben muy rápidamente a nivel del intestino delgado, una cierta fracción, difícil de estimar, se recicla a nivel enterohepático y sobre todo por las glándulas salivares, los nitratos se eliminan rápidamente por vía urinaria. [12]

Durante muchos años se ha sabido que los nitratos tienen la capacidad de formar compuestos cancerígenos. Los nitratos por sí no son cancerígenos, pero actúan como pro-cancerígenos, lo cual quiere decir que reaccionan con otras sustancias para formar compuestos que sí lo son, a través de un proceso de numerosas etapas. [19]

Primero el nitrato es reducido a nitrito después de la ingestión. En segundo lugar el nitrito reacciona con compuestos orgánicos conocidos como aminas secundarias o amidas, presentes en los alimentos, para formar nuevas entidades químicas conocidas como N-nitroso compuestos ya sean nitrosaminas o bien nitrosamidas, muchas de las cuales son cancerígenas. Dentro del organismo esta síntesis se lleva a cabo en el estómago ya que se reúnen las condiciones necesarias como pH ácido, nitrito libre, aminas secundarias básicas provenientes de los alimentos o medicamentos. [19]

En 1974 la OMS (Organización Mundial de la Salud) en cooperación con la FAO, establecieron la Dosis Diaria Admisible (DDA) de nitrato de 3.65 mg/kg de peso corporal/día que comparada con la de los taninos, nos indica que los NO_3^- presenten mayor riesgo su presencia. [12]

3.4.5 Mimosina

La mimosina es un aminoácido no proteínico, una alanina β -sustituida con un anillo de 3-hidroxi-4 (1H)-piridona (3,4-DHP), que se puede considerar como una toxina encontrada en grandes cantidades en las hojas, raíces y semillas de *Leucaena*. Este compuesto juega un papel importante en la resistencia de la planta a una gran variedad de agentes fitopatógenos. Los típicos signos de toxicidad en rumiantes que consumen una dieta con alto contenido de *L. leucocephala* incluyen: alopecia, anorexia, pérdida de peso, salivación profusa, lesiones a nivel de esófago, papilas necróticas en rumen y retículo, hiperplasia de la glándula tiroides y bajos niveles de la hormona tiroxina T_4 circulante. La toxicosis puede ser aguda o crónica y conllevar, incluso a la muerte. Los efectos sobre la reproducción incluyen bajo índice reproductivo debido a la mortalidad embrionaria precoz y a la muerte perinatal. Bajo condiciones metabólicas, la mimosina puede ser degradada, sin destrucción del anillo heterocíclico aromático, a 3,4-DHP el cual presenta menor toxicidad que la mimosina y es el responsable de la disfunción de la glándula tiroides en rumiantes siendo un potente agente bociógeno. [39]

La mimosina inhibe el crecimiento y la síntesis de proteínas en microorganismos y tiene actividad antimetabólica en animales [1]

La mimosina fue aislada por primera vez en 1939 de semillas de *Leucaena* durante investigaciones sobre la pérdida del cabello en mujeres jóvenes que consumían la semilla. El contenido de mimosina es muy variable y puede fluctuar entre 2 y 5 % de la materia seca. [38]

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Metodología General

4.1 Obtención de datos Etnobotánicos

Se visitó el municipio de San Sebastián Zinacatepec y la ciudad de Tehuacán, Puebla en donde se realizaron entrevistas semiestructuradas referentes a las muestras en estudio.

4.1.1 Análisis bibliográfico

Se realizó la búsqueda bibliográfica del arbusto de Guaje verde, la cual incluye información como nombres de la planta, usos, platillos y su preparación.

4.1.2 Corroboración en campo de información etnobotánica

Se realizaron entrevistas semiestructuradas con 6 personas, n=6, para corroborar usos tradicionales de guaje y consumo tradicional de guaje con gente conocedora.

4.2 Recolección del Material biológico

Con apoyo de la M en C. Edelmira Linares Mazarí investigadora del Instituto de Biología de la UNAM se recolectaron los brotes y semillas del Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) en Cuautla, Mor., posteriormente en el municipio de San Sebastián Zinacatepec y Tehuacán, Pue., se recolectaron los botones florales de los cuales se preparan los especímenes de Herbario (E. Linares 2695 y R. Bye) (E. S. Reyes #1) y se depositaron en el Herbario Nacional MEXU. El material biológico fue transportado al Anexo 1 del laboratorio 4A y 4C de la Facultad de Química, UNAM, en costales y bolsas.

4.2.1 Limpieza del Material biológico

Las muestras fueron recolectadas de los árboles del Guaje Verde, en el caso de los brotes se cortaron las ramas completas y posteriormente se hizo la limpieza separando los brotes de las ramas. En el caso de las semillas, éstas se recibieron dentro de sus respectivas vainas y se limpiaron sacando las semillas de las vainas. Por otra parte los botones fueron cortados con todo y rama, al igual que los brotes se hizo la limpieza separando a los botones de las ramas, dejando únicamente el botón. También se realizó una limpieza para separar impurezas y cuerpos extraños y ajenos a las muestras.

Una vez limpias las muestras, se seleccionó cierta cantidad para realizar las determinaciones correspondientes. En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo general para las muestras de Guaje Verde con número de colecta 2695

4.3 Determinación de Humedad Original [6]

La determinación de humedad se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

Material

- Balanza analítica Sartorius modelo A-210-P
- Estufa de vacío Lab-line modelo 3620
- Desecador en óptimo funcionamiento
- Pesafiltros o charolas de aluminio
- Espátula

Procedimiento

Poner a peso constante la charola de aluminio en donde se va a efectuar la determinación, hasta alcanzar el peso constante. Pesar de 2 a 5 gramos de muestra aproximadamente e introducir en la estufa a presión reducida, considerando que la línea de vacío debe dar por lo menos 25 mm Hg y una temperatura de 60 a 65°C.

Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerán durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta peso constante.

Se considera peso constante cuando al pesar una muestra en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal. Efectuar todas las pesadas inmediatamente después de sacarlas del desecador.

Cálculos

Muestra seca = Muestra seca a peso constante – Charola a peso constante

$$\%Humedad = 100 \left[\frac{Muestra\ seca}{Muestra} \times 100 \right]$$

4.4 Análisis Proximal [6, 17, 20]

Se determinó el análisis proximal bajo el esquema Weende, con métodos establecidos por la AOAC (**Association of Official Analytical Chemists**) y ligeras modificaciones a las tres muestras del Guaje verde. El análisis proximal incluye el contenido de humedad, grasa, proteína cruda, cenizas, fibra cruda e hidratos de carbono los cuales se determinan por diferencia.

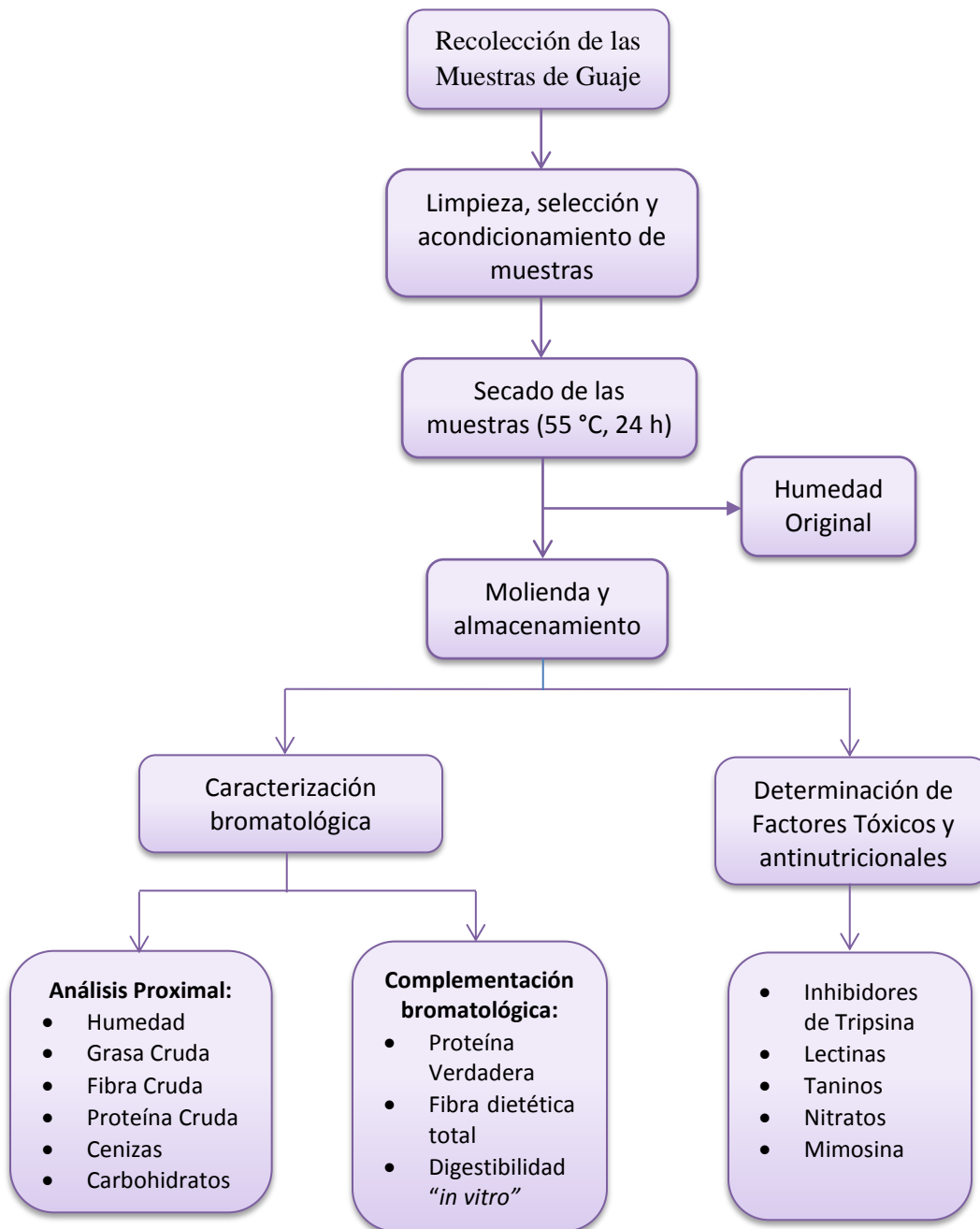


Figura 2. Diagrama general de trabajo

4.4.1 Determinación de Humedad por secado al vacío [17, 20]

Fundamento

El agua en los alimentos se encuentra en dos formas como “agua libre” o “agua ligada”, el agua es la forma predominante y es la que está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede perder con facilidad por secado, mientras que el agua ligada se halla combinada o absorbida, se encuentra en los alimentos como agua de cristalización o ligada a las proteínas y las moléculas de sacáridos. La Humedad se define como la pérdida de agua debido a la evaporación de la muestra durante el secado; esta determinación se realiza en estufa al vacío de 60 a 65 °C.

Material

- Estufa de vacío Lab-Line
- Balanza analítica Sartorius Extend
- Desecador de Vidrio
- Pesafiltros o charolas de aluminio

Procedimiento

Poner a peso constante en la estufa al vacío la charola de aluminio en donde se efectuara la determinación, hasta pero constante.

Pesar en la charola de aluminio a peso constante de 2 a 5 g de muestra y distribuirla tratando de que presente la mayor superficie de evaporación e introducirla en la estufa que se encuentre entre 60 y 65 °C.

Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerán durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta peso constante.

Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta decimal con respecto al valor anterior. La determinación se realiza por triplicado.

Cálculos

Teniendo el peso de charola con muestra antes y después de ser secada, y con el peso de la charola sola, se puede hacer la determinación. Generalmente la pérdida del material que se volatiliza bajo estas condiciones, se le acostumbra denominar como humedad.

$$\%Humedad = \left(\frac{P_i - P_f}{m} \right) \times 100$$

Donde:

P_i = peso en gramos de la charola con muestra antes de secada

P_f = peso en gramos de la charola con muestra después de secada

m = peso en gramos de muestra

4.4.2 Determinación de Grasa [17, 20]

Fundamento

Las grasas se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua, pero solubles en compuestos orgánicos tales como cloroformo, benceno, hexano, éter etílico y éter de petróleo. El contenido de grasa se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubilizan la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación.

Material y Reactivos

- Equipo de extracción Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa de 22x80mm
- Estufa de vacío Lab-Line

- Vasos con borde esmerilado, LABCONCO
- Éter de petróleo p. eb. 30-60°C
- Balanza analítica Sartorius

Procedimiento

Para esta determinación es aconsejable trabajar con la muestra previamente seca. Dentro de un cartucho de celulosa se coloca de 2 a 5g de muestra (dependiendo del contenido de grasa), se tapa con un pedazo de algodón y se coloca en el compartimiento de extracción. En este caso el cartucho de celulosa se coloca en el porta dedal y este a su vez en el seguro metálico del aparato. A continuación se coloca aproximadamente 50 mL de solvente sobre el vaso de borde esmerilado, y este con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción.

Para el calentamiento en el aparato, se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso, además se abre la llave del agua para que circule ésta dentro de los refrigerantes. Cuando se trabaja con éter, es conveniente colocar el control de calentamiento en LOW (bajo).

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se baja la parrilla de calentamiento, y se coloca el platillo de seguridad, se quita el anillo de rosca y se saca el porta dedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador volviéndose nuevamente a colocar el vaso para nuevamente proceder a calentar, pero en este caso el solvente quedará retenido en el tubo recuperador.

Una vez que el vaso esté libre de solvente, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación de solvente y humedad.

Cálculos

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

$$\% \text{ Grasa} = \left(\frac{P_f - P_0}{m} \right) \times 100$$

Donde:

P_f = peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

P_0 = peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m = peso de la muestra seca (en gramos)

4.4.3 Determinación de Fibra Cruda [17, 20]

Fundamento

Para la determinación de fibra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia sacar el contenido de hidratos de carbono no-digeribles.

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

Determinación en Digestor Labconco

Material

- Balanza analítica Sartorius Extend
- Aparato de digestión LABCONCO
- Estufa de vacío Lab-Line
- Mufla Heraeus

- Vasos de Berzelius de 600 mL
- Mechero Bunsen
- Cisoles de porcelana
- Matraces de vidrio Kitasato
- Embudo buchner con malla metálica tipo california
- Filtro de lino o papel (Yo no use papel)
- Solución de H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico
- Silicato de aluminio (limpio y calcinado)

Procedimiento.

Pesar de 3 a 5 gramos de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. Adicionar 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% (m/v) hirviendo, y unas gotas de antiespumante y colocarlo inmediatamente en el aparato de digestión **Labconco**, el cuál debe estar previamente caliente; digerir por espacio de 30 minutos exactos. Después de dicho período vaciar el contenido sobre un buchner con malla metálica realizar la filtración con ayuda de vacío; lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL). Una vez lavado el residuo transferir nuevamente al vaso Berzelius y adicionar 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) que este hirviendo y unas gotas de antiespumante y colocar inmediatamente en el aparato de digestión, y dejar digerir por espacio de 30 minutos exactos. Trascurrido el tiempo filtrar en el mismo buchner California y lavar el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 mL), hasta eliminar el álcali y

quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfiere de forma cuantitativa en un crisol de porcelana (a peso constante) cuidadosamente. Colocar en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 a 8 horas), y después pesar. Carbonizar e introducir el residuo en la mufla para su incineración. Posteriormente pesar el crisol con las cenizas residuales previamente enfriado en un desecador y por diferencia obtener el contenido de fibra.

Cálculos

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

$$\% \text{ Fibra} = \left(\frac{P_s - P_c}{m} \right) \times 100$$

Donde:

P_s = peso crisol con residuo después de secado (en gramos)

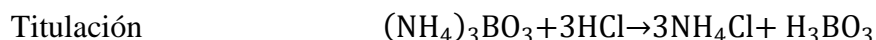
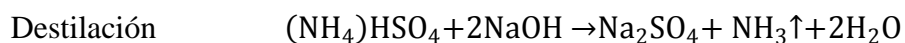
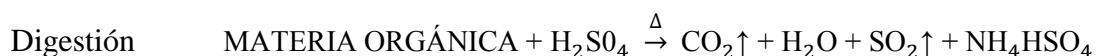
P_c = peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

4.4.4 Determinación de Proteína Cruda [17, 20]

Fundamento

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl. El procedimiento consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico para formar dióxido de carbono, agua y reducir el nitrógeno orgánico como sal de amoníaco; éste se encuentra en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso de ácido.



La digestión de la muestra para formar el sulfato ácido de amonio, es la parte más difícil de la operación. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio, selenio o algunas combinaciones como son cobre-mercurio entre otras.

Material

- Digestor TECATOR mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- Tubos de digestión TECATOR de 100 mL
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R. A.)
- Solución de NaOH al 40%

- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- Solución de HCl 0.01N valorada.

(a) Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada y una vez que esté bien disuelto agregar 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) a continuación adicionar con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitar por aproximadamente 30 minutos.

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

Ajustar:

25 mL de ácido bórico con indicadores + 100 mL de agua. La solución da un tono gris, si persiste el color rojo inicial, ajuste con NaOH 0.1N hasta obtener al color gris vire. Calcular la cantidad del álcali necesario para ajustar el ácido bórico (**regresar la solución al matraz antes de aforar**).

$$\text{mL NaOH 0.1N} = \text{mL titulado} \times 40$$

Procedimiento

(a) Digestión de la muestra

Pesar de 10 a 100 mg de muestra y un blanco de glucosa en papel cebolla, colocarla en el tubo de digestión, agregar aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio o potasio y 3 mL de mezcla digestiva; colocar el tubo en el digestor por un tiempo de 15 minutos a una temperatura de **340°C**, posteriormente retirar los tubos del digestor y dejar que se enfríen

para adicionarle 1.5 mL de H₂O₂ al 30% y nuevamente se coloca en el digestor a una temperatura de **370°C**. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión sea traslucida con un ligero tono verde-azuloso.

(b) Destilación

La destilación se realiza en el Kjeltec Auto 1030 Analyzer una vez que los tubos estén fríos. El equipo se enjuaga con un tubo sin muestra y una vez listo se agregan 25 mL de agua destilada a los tubos con muestra, se coloca el tubo, se cierra la puerta de seguridad y se da inicio a la destilación y a la titulación, la destilación la lleva a cabo el equipo con NaOH al 40% y la titulación con HCl 0.01N. Se corre primero los blancos, después un control interno de caseína y al final las muestras.

Cálculos

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

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

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

Donde:

P= mL de la titulación de la muestra

B= mL de la titulación del blanco

N= normalidad

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = Factor de conversión (6.25)

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

4.4.5 Determinación de Cenizas [17, 20]

Fundamento

Las cenizas representan la fracción de materia inorgánica que posee el alimento, pero para llegar a esa fracción es necesario eliminar la materia orgánica por lo cual se somete a calcinación. Posteriormente se determina el grado de cenizas totales por gravimetría.

Material

- Balanza analítica Sartorius Extend
- Mufla Heraeus
- Campana de extracción
- Desecador de vidrio
- Crisoles de porcelana
- Mechero Fisher

Procedimiento

Colocar tres crisoles en la mufla a una temperatura de 500 a 550°C, hasta alcanzar peso constante, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia (solución de cloruro férrico) que no se elimine en el proceso de incineración. Para pesar el crisol, una vez que se retira de la mufla dejarlo enfriar un poco y colocarlo en un desecador y hasta que alcance la temperatura ambiente. Se considera a peso constante cuando la última pesada en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

En cada crisol se colocan de 2 a 3 gramos de muestra. El crisol con muestra se coloca sobre un triángulo de porcelana para incinerar, en la flama del mechero; con el fin de carbonizar la muestra, hasta que no desprenda humo. Posteriormente introducir los crisoles a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500 a 550°C. Realizar pesadas periódicas, sacando los crisoles con muestra de la mufla y colocándolos inmediatamente en un desecador donde permanecerán 25 minutos aproximadamente para enfriarse hasta alcanzar el peso constante. La determinación se realiza por triplicado.

Cálculos

$$\%Cenizas = \frac{(P_f - P_i)}{m} \times 100$$

Donde:

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

Pi = peso en gramos del crisol a peso constante

m= peso en gramos de la muestra.

4.4.6 Determinación de Hidratos de Carbono[17]

Los Hidratos de Carbono se calculan por diferencia, es decir, la suma de los porcentajes obtenidos de los componentes principales menos 100%.

$$CH = 100 - [\%(humedad + cenizas+ extracto etéreo + proteína + fibra cruda)]$$

4.4.7 Proteína Verdadera [17]

Como complementación bromatológico se realizó la determinación de proteína verdadera, la cual permite discriminar la cantidad de nitrógeno proteínico del no proteínico,

así mismo se realizó la cuantificación de Fibra Dietética total (FDT) y la determinación de digestibilidad proteínica “*in vitro*”, de acuerdo al método multienzimático indicado por la AOAC para determinar la biodisponibilidad de la proteína.

Fundamento

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble (así que la muestra deba estar finamente molida) y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl.

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

Material y Reactivos

- Balanza analítica Sartorius Extend
- Microdigestor Tecator Mod. Ab
- Microdestilador Tecator
- Agitador magnético Corning
- Barras magnéticas de 12 x 5 mm
- Papel Whatman #50 de 5cm diámetro (poro cerrado) o equivalente.
- Tubos de digestión Tecator
- Mezcla digestiva (1)
- Solución de peróxido de hidrógeno 30%
- Solución de ácido bórico con indicadores (2)
 - Indicador A: 100 mg de fenolftaleína aforados a 100 mL con alcohol etílico.
 - Indicador B: 33 mg de verde de bromocresol y 66 mg de rojo de metilo aforados a 100 mL con alcohol etílico.
- Solución de ácido clorhídrico 0.01N (valorado)
- Solución de hidróxido de sodio 60%
- Solución precipitante (3)
- Sulfato de potasio (reactivo analítico)

- (1) Mezcla digestiva: Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 100 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y 300 mL de ácido sulfúrico concentrado durante 30 minutos.
- (2) Solución de ácido bórico con indicadores: Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlos en un matraz de 2 L, adicionar agua hasta disolverlo, a continuación se agregan 70 mL de indicador A y 20 mL de indicador B. Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera, se afora a 2 L.
- (3) Solución precipitante: disolver 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de H_2O , añadir 22 mL de HCl 2N y mezclar, aforar a 50 mL con agua destilada.

Procedimiento

(a) Proceso de precipitación

Pesar de 50 a 100 mg de muestra finamente molida y colocarla en un vaso de precipitados de 50 mL. Agregar 5 mL de H_2O caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, agregar 2 mL de solución precipitante y se dejar que repose durante 10 min.; transferir cuantitativamente y filtrar en papel (Whatman #50 o 542) utilizando 25 mL de agua destilada caliente.

(b) Proceso de digestión

Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión y agregar 0.5 g de K_2SO_4 5 mL de mezcla digestiva, colocar el tubo durante 15 minutos en el digestor a una temperatura de **340 °C**, retirar los tubos del digestor y esperar que se enfríen para añadirle 3 mL de H_2O_2 al 30% y colocarlos nuevamente en el digestor el cual debe estar a una temperatura de **370 °C**. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es translúcida con un ligero tono verde-azuloso.

(c) Destilación y titulación

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar el tubo digestor y se procede a la destilación, para la cual se le agrega agua destilada (aproximadamente 10 mL) para trasvasar cuantitativamente la mezcla digerida a la copa de adición al microdestilador

enjuagando esta con 1 a 2 mL de agua destilada dos o tres veces. Después añadir al aparato de destilación por medio de la copa de adición, lenta pero en forma continua 15 mL de NaOH 60%. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer que contenga 50 mL de solución de ácido bórico. Se lava la copa de adición con 15 mL de agua destilada y se procede a la destilación, continuar hasta completar un volumen de 150 mL aprox. Al recibirse el nitrógeno amoniacal sobre ácido bórico, el indicador que éste contiene vira del café rojizo al verde esmeralda. Finalmente el complejo nitrogenado formado se titula con el HCl 0.01 N, hasta el vire del indicador, del verde esmeralda a rosa claro.

Nota: Es conveniente correr un blanco en donde se incluya el papel filtro, junto con aproximadamente 50 a 100 mg de glucosa, cada vez que se prepara nuevamente algún reactivo.

Cálculos:

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

Donde:

B= mL de la titulación del blanco

P= mL de la titulación de la muestra

N= normalidad del HCl

Meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

$$\% \text{Proteína verdadera} = \% N \times F = \text{g proteína}/100\text{g de muestra}$$

F = Factor de conversión (6.25) cuando se considera que la proteína de la muestra contiene un 16% de nitrógeno.

4.4.8 Fibra Dietética Total [17, 26]

Fundamento

En este ensayo se mide el contenido de fibra dietética de los alimentos usando una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos. Las muestras de alimentos, secas y libres de grasa son gelatinizadas con α -amilasa, estable al calor, posteriormente digeridas enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón presente en la muestra. Para precipitar la fibra dietética soluble se adiciona etanol. Los residuos obtenidos son filtrados y lavados con etanol y acetona. Después de secarlos, los residuos se pesan. En la mitad de las muestras se mide la proteína y las otras son calcinadas a cenizas. La fibra dietética se obtiene restando al peso del residuo, el peso de la proteína y el de la ceniza.

Material y Reactivos

- Crisol Gooch: Porosidad #2 (grueso 40-60 micrones)
- Fuente de vacío. Con trampa para prevenir la contaminación en caso de que se pase líquido.
- Horno a 105 °C o un horno con vacío a 70°C
- Desecador de vidrio
- Mufla Heraeus
- Baño de agua hirviendo
- Baño de agua constante a 60°C Lab-Line con agitador que proporcione agitación a los vasos de digestión durante la hidrólisis enzimática.
- Vasos de precipitados: de 100, 400 y 600 mL de forma alta.
- Balanza analítica Sartorius Extend
- Potenciómetro Thermo Scientific, Orion 3

- Matraces Kitasato de 100 mL
- Alargadera de hule para crisol Gooch
- Barras magnéticas 22x8 mm
- Micropipeta automática Genex-Beta de 50-200 μL
- Termómetro (-10 a 100 $^{\circ}\text{C}$)
- Kit Total Dietary Fiber Assay (SIGMA TDF-100A). Este equipo contiene reactivos para realizar 200 determinaciones.
 - α -Amilasa, estable al calor (10 mL); (Sigma A 3306)
 - Proteasa de *Bacillus licheniformis* (500 mg); (Sigma P 3910)
 - Amilogucosidasa de *Aspergillus niger* (10 mL); (Sigma A9913)
 - CelitaTM, lavada con ácido (50 g); (Sigma C 8656)
- Kit Total Dietary Fiber Assay Control (SIGMA TDF-C10). Cada frasco contiene reactivos para aproximadamente 10 análisis.
 - Arabinogalactana (1 g); (Sigma A9788)
 - Caseína (5 g); (Sigma 7906)
 - β -Glucano (1 g); (Sigma G 7391)
 - Pectina (1 g); (Sigma P 7536)
 - Almidón de maíz (10 g); (Sigma S 2388)
 - Almidón de trigo (10 g); (Sigma S 1514)
- Éter de Petróleo, reactivo analítico.
- Alcohol etílico, reactivo analítico
- Acetona, reactivo ACS

- Fosfato de sodio dibásico anhidro, reactivo analítico
- Fosfato de sodio monobásico anhidro reactivo analítico
- Hidróxido de sodio, 1.0 N
- Ácido clorhídrico, 1.0 N

Preparación de reactivos

Usar agua destilada o desionizada para hacer las soluciones.

1. Etanol al 78%. Medir 207 mL de agua en un matraz volumétrico de un litro. Agregar etanol al 95%. Mezclar y llevar al volumen con etanol al 95%. Mezclar.
2. Amortiguador de fosfatos, 0.08 M, pH 6.0. Disolver 1.4 g de Na_2HPO_4 , anhidro y 8.4 g de NaH_2PO_4 anhidro en aproximadamente 700 mL de agua. Diluir sin llevar a aforo con agua. Verificar el pH y ajustar si es necesario con NaOH o H_3PO_4 aforar a un litro y mezclar. Guardar en frascos bien tapados a temperatura ambiente.
3. Solución de hidróxido de sodio, 0.275 N. Diluir 275 mL de solución de NaOH 1 N a 1 litro con agua en un matraz volumétrico. Guardar en frascos bien tapados a temperatura ambiente.
4. Solución de Ácido clorhídrico, 0.325 N. Diluir 325 mL de solución de HCl 1 N a 1 litro de agua en un matraz volumétrico. Guardar en frascos bien tapados a temperatura ambiente.

Procedimiento

Usar un blanco de cada muestra a lo largo de todo el procedimiento para corregir cualquier contribución de los reactivos. A las muestras y blancos que se les va a medir el contenido de fibra dietética se le debe realizar, al menos, por cuadruplicado para tener duplicados de proteína y cenizas.

(a) Preparación de los crisoles

Lavar los crisoles, secarlos, calentarlos a una hora a 450 °C y enfriarlos, remojar y enjuagar los crisoles con agua y secarlos. Agregar 0.5 g de Celita a cada crisol y secar a 130°C hasta peso constante (una hora o más). Enfriar en desecador y pesar hasta tener 0.1 mg de diferencia. Registrar este peso como “Celita + Peso del crisol o P_1 ”. Conservar en desecador hasta utilizarlos.

(b) Preparación de la muestra

Si el contenido de grasa de la muestra es mayor al 10%, desengrasar con éter de petróleo como se describe en el procedimiento del AOAC [17]. Registrar la pérdida de peso debida a la grasa eliminada y hacer la corrección adecuada al por ciento total de fibra dietética. Cuando se manejan muestras desconocidas, desengrasar todas las muestras.

Homogeneizar cada muestra, si es necesario, secar durante la noche en una estufa con corriente de aire a 105 °C o a 55 °C y 25mm Hg en estufa de vacío. Enfriar en desecador y moler las muestras con una malla de 0.3 a 0.5 mm. O bien si no se cuenta con un molino, hacerlo en mortero. Si las muestras no se pueden secar en la estufa, liofilizarlas antes de molerlas. Conservar las muestras secas en un desecador hasta que se realice el análisis.

(c) Determinación de fibra dietética.

1. Hidrólisis

Pesar cuatro muestras de 0.5 g de cada material por analizar y poner en vasos de precipitado de 100 mL de forma alta. Los pesos de las muestras no deben tener una diferencia mayor de 20 mg. Registrar los pesos.

Agregar, a cada vaso, 25 mL de amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.05 mL de α - Amilasa (Clave A 3306) a cada vaso y mezclar muy bien. Cubrir cada vaso con papel aluminio y poner en un recipiente con agua hirviendo. Agitar suavemente los vasos a intervalos de 5 minutos. Incubar por 15 minutos después de que la temperatura dentro de los vasos alcance 95°C.

Dejar enfriar las soluciones a temperatura ambiente (o en hielo o agua). Ajustar el pH de las soluciones a 7.5 ± 0.2 agregando 5 mL de solución de hidróxido de sodio 0.275 N a cada

vaso. Verificar el pH y ajustar si es necesario, ya sea con NaOH o HCl. Preparar una solución de proteasa (Clave P3910) de 25 mg/mL en amortiguador de fosfatos pH 6.0, inmediatamente antes de utilizarse. Pipetear 0.1 mL (2.5 mg de proteasa) dentro de cada vaso.

Cubrir cada vaso con papel aluminio y colocar en un baño de agua con agitación continua a 60 °C, incubar por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcance 60°C.

Dejar enfriar las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar el pH de las soluciones a un pH de 4.0 a 4.6 agregando 5 mL de solución de HCl 0.325 N a cada vaso. Verificar el pH y ajustar si es necesario, ya sea con NaOH o HCl.

Agregar 0.05 mL de amilogucosidasa (Clave A9913) a cada vaso. Cubrir cada vaso con papel aluminio y poner en un baño de agua con agitación continua a 60 °C, incubar por 30 minutos después de que la temperatura en las soluciones alcance los 60 °C.

Agregar 125 mL de etanol al 41% a cada vaso*. Dejar la solución durante toda la noche a temperatura ambiente para permitir la precipitación completa de la fibra dietética soluble.

* Si se conoce que el contenido de fibra dietética soluble es alto se adiciona etanol al 95%.

2. *Filtración*

Montar un sistema de filtración al vacío para cada crisol Gooch. Humedecer y redistribuir la cama de Celita el filtro y formar una superficie lisa. Mantener la succión suave y pasar cuantitativamente el precipitado y suspensión de cada uno de los vasos a sus respectivos crisoles.

Lavar el residuo con tres porciones de 10 mL de etanol al 78%, dos porciones de etanol al 95 % y dos porciones de 5 mL de acetona.

Algunas muestras pueden formar una goma que atrapa el líquido. Con el uso de una espátula se rompe la película superficial mejorando la velocidad de filtración. Asegurarse de enjuagar dentro del crisol todo el material que se pegue a la espátula. El tiempo para filtrar y lavar puede variar de 10 minutos a 6 horas por crisol, en promedio se utiliza

aproximadamente 30 minutos por crisol. Secar los crisoles que contienen los residuos durante la noche en una estufa con aire a 105 °C o en estufa con vacío a 70 °C y 25 mm Hg.

Enfriar todos los crisoles en un desecador, pesar hasta la cuarta cifra decimal (0.1 mg) y registrar estos pesos como “Residuo + Celita + Peso del crisol” o **P₂**.

3. Determinación de Proteína

Con ayuda de una espátula sacar el residuo + Celita de cada crisol y pesarlo, moler en un mortero y pesar de este polvo por duplicado 100 mg para hacer la determinación de proteína. Con este dato, calcular el contenido de proteína en el residuo de cada crisol.

Analizar en los residuos de dos muestras y dos blancos el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, como se especifica en el procedimiento del AOAC [17]. Usar el factor de 6.25 para convertir el nitrógeno, medido en el análisis, a proteína excepto cuando al contenido de nitrógeno en la muestra de proteína es conocido y usar el factor respectivo adecuado.

4. Determinación de Cenizas

De los crisoles restantes de las muestras y de los blancos calcinar el residuo por 5 horas a 450°C hasta peso constante. Enfriar en desecador, y pesar hasta la cuarta cifra decimal (0.1mg) y registrar este peso como “Cenizas + Celita + Peso del Crisol” o **P₃**.

Cálculos

Contenido de cenizas en el residuo de cada crisol.

$$C = P_3 - P_1$$

Donde:

C= g de cenizas en el crisol

P₁= Celita + peso del crisol

P₃= Cenizas + Celita + peso del crisol

Contenido de proteína

$$\%N = \frac{(Vm - Vb) \times meq \times N_{HCl}}{m} \times 100$$

$$\%P = \%N \times F$$

Donde:

% N = Porcentaje de nitrógeno (g N/100 g de muestra)

%P = porcentaje de proteína (g de proteína/100 g de polvo)

Vm = Volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra

Vb = Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco

Meq = Miliequivalente del N (Peso molecular/1000 = 0.014)

N_{HCl} = Normalidad de la solución valorada de HCl

m = g de muestra utilizada en la determinación

F = Factor de conversión a proteína 6.25

$$P = \frac{(R + Celita)}{100} \times \%P$$

Donde:

P = g de proteína en el crisol

(R + Celita) = g de residuo + celita del crisol

% P = Porcentaje de proteína (proteína g/100 g de polvo)

Contenido de fibra dietética total

$$\%FDT = \frac{R(P + C + B)}{pm} \times 100$$

Donde:

$$B = R_{\text{blanco}} - P_{\text{blanco}} - C_{\text{blanco}}$$

FDT = Fibra dietética total

R = Peso del residuo que corresponde a la definición de $P_2 - P_1$ (g)

P = Peso de proteína en el crisol (g)

C = Peso de cenizas en el crisol (g) o $(P_3 - P_1)$

pm = Peso de la muestra (g)

4.4.9 Digestibilidad *in Vitro* [20]

Fundamento

La AOAC describe un método que utiliza enzimas proteolíticas; tripsina, quimiotripsina, peptidasa y proteasa bacterial. Se mide el pH al final del experimento y se determina el porcentaje de digestibilidad con el dato proporcionado por el potenciómetro.

Material y Métodos

- Baños de recirculación a 37 y 55°C de agua con agitación LAB-LINE INSTRUMENT conectados por mangueras.
- Potenciómetro CORNING mod. 10

- Solución A: Disolver 227040 BAEE unidades de Tripsina (SIGMA T-0134) (1)+ 1860 BAEE unidades de α -quimotripsina (SIGMA C-4129) (2) + 2321 unidades de pepsina gástrica de porcino (SIGMA P-7000) (3) en 10 mL de agua.
- Solución B: Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (SIGMA P-5147) (4) en 10 mL de agua.

Donde: BAEE es el sustrato N- α -benzoil-L-arginina etil ester.

- (1) Una unidad de Tripsina produce un ΔA_{253} de 0.001 por minuto a pH 7.6 a 25 °C, usando BAEE como sustrato. Contiene 16700 BAEE unidades por mg de proteína. Por lo tanto para disolver 227040 BAEE unidades de tripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg proteína} \times 227040 \text{ unidades BAEE})}{16700 \text{ unidades BAEE}} = 13.59 \text{ mg de proteína}$$

Y debido a que 100 mg de tripsina equivalen a 100 mg de proteína, se requiere:

$$\frac{(100 \text{ mg de tripsina} \times 13.59 \text{ mg proteína})}{100 \text{ mg de proteína}} = 13.59 \text{ mg de tripsina}$$

- (2) Una unidad de α -quimotripsina hidroliza 1 μ mol de BTEE (N-benzoil-L-Tirosina etil ester) por minuto a pH 7.8 a 25 °C. Contiene 54 BAEE unidades por mg de α -quimo tripsina. Por lo tanto, para disolver 1860 BAEE unidades de α -quimo tripsina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg } \alpha - \text{quimi tripsina} \times 1860 \text{ unidades BAEE})}{54 \text{ unidades BAEE}} = 34.44 \text{ mg quimo tripsina}$$

- (3) Una unidad de pepsina libera 1.0 μ mol de β -naftilamina de L-Leucina- β -naftilamina por minuto a pH 7.1 a 37 °C. Contiene 456 unidades por g de pepsina. Por lo tanto para disolver 2.32 unidades de pepsina L-Leucina- β -naftilamina, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg pepsina} \times 2321 \text{ unidades})}{456 \text{ unidades}} = 5.09 \text{ mg pepsina}$$

- (4) Una unidad de proteasa hidroliza para producir color equivalente a 1.0 μmol (181 1.0 μg) de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C. Por lo tanto para disolver 65 unidades de proteasa bacterial, se requiere:

$$\frac{(1 \text{ mg proteasa} \times 65 \text{ unidades})}{5.5 \text{ unidades}} = 11.81 \text{ mg proteasa}$$

Procedimiento

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37 °C durante 1 h; al mismo se atemperan las soluciones enzimáticas a 37 °C y se ajusta el pH de éstas a 8.0 ± 0.03 antes de usarse. A continuación se mide el pH de la solución proteínica (caseína o muestra) el cual se ajusta a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1 N según sea necesario. Inmediatamente se le adiciona 1.0 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 min medidos con cronómetro exactamente en agitación a una temperatura de 37 °C, transcurrido el tiempo, se añade 1 mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 min a una temperatura de 55 °C. Al término, se coloca la muestra a 37 °C durante 1 min y a los 20 min exactos de haber adicionado la solución A, se mide pH con la lectura hasta las centésimas.

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

Cálculos

El por ciento de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

Reunida la condición de que la referencia de caseína muestra un pH que sea igual a 6.42 ± 0.05 .

4.5 Determinación de Factores Tóxicos [11, 21-22, 25]

En cuanto a la determinación de factores tóxicos se determinaron Inhibidores de tripsina, lectinas, taninos, nitratos y mimosina.

4.5.1 Inhibidores de Tripsina [22]

Fundamento

La técnica de Kakade y colaboradores se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH).

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

Material y reactivos

- Potenciómetro Corning pH meter 430
- Parilla con agitación magnética Corning Stirrer Multiple position
- Baño de agua a 37 °C Grant Mod. 67530
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 uv
- Vortex Lab-Line Mod. 1192
- Tubos de ensayo Pyrex
- Matraz aforado de 50, 200 y 1000 mL
- NaOH 0.01 N
- HCl 0.01 N
- Ácido acético al 30%

- Dimetilsulfóxido
- Solución amortiguadora de TRIS (hidroximetil-amino-metano, pH 8.2, 0.05 M (1)
- Solución BAPNA (2)
- Solución estándar de tripsina (3)

- 1) Solución amortiguadora TRIS: Se pesan 6.05 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P. M. 121.14) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 litro.
- 2) Solución BAPNA: Se pesan 100 mg de α -N Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) y se disuelven en 2.5 mL de dimetilsulfoxido y una vez disuelto el BAPNA se diluye en 250 ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37 °C
- 3) Solución estándar de tripsina: Pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) disolver y aforar a 200 mL con HCl 0.001 N.

Procedimiento

a) Preparación del extracto:

Se pesa 1 gramo de muestra finamente molida y desengrasada (<5% de grasa) en un vaso de precipitado y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01 N, a esta suspensión se le ajusta el pH a 9.6 ± 0.2 y se afora con agua a 50 mL.

A continuación se trasvasa a un vaso que contenga un magneto, para poder agitar la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2½ hora a 300 r.p.m. Después de este tiempo se quita el magneto y se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se separa el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1mL produzca una inhibición de 40-60%, este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad:

Porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL de extracto directo o diluido se pipetea en tubos de ensaye por duplicado ajustando el volumen a 2.0 mL con agua destilada, se

introduce a un baño de agua a 37 °C. Se adicionan 2.0 mL de solución estándar de tripsina (previamente mantenida a 37 °C) y se incuba por espacio de 10 minutos.

A continuación se adicionan 5 mL de solución de BAPNA (a 37 °C) a cada tubo y se mantiene dicha mezcla de reacción por 10 minutos exactos (con cronómetro). La reacción enzimática se detiene por la adición de 1 mL de ácido acético al 30%, el cual debe homogeneizarse inmediatamente.

Cuando por la adición del ácido al tubo de reacción se enturbie o forme un precipitado, será necesario filtrar el contenido a través de papel filtro (Whatman #1); para ellos es conveniente dejar el tubo en reposo por 15 minutos se filtra la porción del precipitado gelatinoso.

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410 nm y para cada una de las alícuotas del extracto es necesario ajustar primero el equipo con su respectivo blanco.

Cálculos

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

$$U. T. = A \times 100$$

Como se tiene una serie de alícuotas del extracto, se tiene a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia (0 mL de extracto, 40 µg de tripsina), se obtienen los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U. T. I.). Posteriormente se calcula el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas tomadas del extracto y calcular el promedio de U.T.I./mL. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U.T.I./mg de muestra, tomando en cuenta para el cálculo el volumen inicial del extracto, las diluciones realizadas y el peso de muestra empleada.

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

4.5.2 Lectinas [25]

Fundamento

La técnica se basa en la capacidad de aglutinar los eritrocitos por efecto de la cantidad de hemaglutininas presentes. Consiste en hacer diluciones seriadas de la cuales se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos de hámster lavados y sensibilizados con solución de proteasa para mejorar la sensibilidad; además se realiza mediante el método de microtitulación que es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra.

Se determina la cantidad mínima del extracto acuoso de una muestra vegetal, que produce prueba positiva de aglutinación con eritrocitos de hámster y este valor se relaciona con la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación definiéndose como una unidad hemaglutinante (U. H. G.) el equivalente a 1 mg de dicha lectina.

Material y reactivos

- Balanza analítica Sartorius modelo A-210P
- Agitador magnético múltiple Corning Stirer modelo 440825
- Centrifuga eppendorf 5702
- Incubadora Bacteriológica Blue M
- Espectrofotómetro COLEMAN, Junior II-A
- Adaptador para celdas de 12 x 80 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm²)
- Vasos de precipitados
- Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación
- Microtiter Kit. (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Microdilutor 50 µL
- Embudos de filtración de tallo corto.
- Pipeta automática multicanales
- Dispositivo de Lectura de placas
- Fibra limpia de vidrio
- Solución anticoagulante (A)

- Solución salina (NaCl) al 1%
 - Solución salina (NaCl) al 0.9%
 - Solución de lectina purificada de frijol *Phaseolus vulgaris* (PHT, SIGMA L-8754) al 0.2% en solución salina 0.9%. (B)
 - Proteasa 0.2% en solución salina al 0.9% (SIGMA L-5147)
- A. Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede emplear heparina. Solución heparina: Sangre = 15-20 UI: 1 mL de sangre. Si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por uno o dos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, ELSEVER.
- B. Pesar con la mayor exactitud posible 1 mg de faseolotoxina (SIGMA L-8754) y pasarla a un matraz aforado de 10 mL; a continuación aforar con solución isotónica (0.9%). De esta solución (0.1 mg/ mL) se realiza una dilución 1:100 para ocuparla en la placa de microdilución tipo “V”, con la finalidad de definir la cantidad mínima de faseolotoxina que produce prueba positiva de aglutinación (L).

Procedimiento

(a) Preparación del extracto

Moler finamente la muestra (con un contenido <5% de grasa), suspender 0.1 g de material en 10 mL de solución salina al 1% y efectuar la extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 rpm a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo centrifugar el extracto a 3000 rpm, durante 10 minutos para eliminar el residuo insoluble; filtrar el sobrenadante a través de un filtro de vidrio de porosidad gruesa y de ser necesario lavar el residuo con solución salina al 1% para llevar finalmente el extracto filtrado a un volumen de 10 mL.

(b) Preparación de la sangre

Una vez que se realizó la sangría al hámster (anestesiado) por vía ocular, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante. Agitar suavemente

para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. Para evitar al máximo la coagulación, se puede diluir esta con solución salina isotónica (de preferencia lavar la sangre lo más rápido posible para evitar la hemólisis). Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación “sangre: solución salina” es aproximadamente 1:10 y se centrifuga a 1500 rpm por 15 minutos, decantar el líquido sobrenadante. Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos, y diluir al 4% para lo cual se agrega por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%, en caso de la presencia de coágulos filtrar a través de una gasa.

(c) Sensibilización de los glóbulos rojos

A cada 10 mL de suspensión de glóbulos rojos al 4%, se agregará 1 mL de solución de pronasa al 0.2% y se colocará en incubadora por espacio de 1 hora a 37 ± 1 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifuga para eliminar la enzima sobrenadante y se efectúa 3 lavados con solución salina 0.9% a 1500 rpm por 15 minutos, decantar el líquido sobrenadante.

Después del último lavado se mide el paquete de eritrocitos y se resuspende al 4% por lo que por cada mL de paquete se añade 24 mL de solución salina 0.9%, colocar la suspensión en un matraz Erlenmeyer de 125 mL previamente efectuando una filtración con gasa.

(d) Ajuste de la suspensión de los glóbulos rojos

Se ajusta el espectrofotómetro COLEMAN al 100% de T con solución salina al 0.9%, a una longitud de onda de 620 nm, en el ajuste de la suspensión de eritrocitos se toman 0.5 mL con pipeta volumétrica (procurando que este lo más homogénea posible), colocándolo en una celda y se adiciona 2 mL de solución salina al 0.9% con pipeta volumétrica, se homogeneiza antes de introducir al espectrofotómetro COLEMAN, se diluye lo necesario, hasta obtener una lectura de $26 \pm 1\%$ de T.

(e) Microtitulación

Utilizando las placas tipo “V” del microtiter colocar en cada pozo de las hileras que se van a usar 100 μ L de solución salina al 0.9% con la pipeta automática multicanales evitando tocar las paredes del pozo y adicionando con precaución para que no se desfase el

volumen de adición. Se llena el microdilutor con 50 µL del extracto problema o del extracto de faseolotoxina y se realizan las diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se desee) y se elimina el residuo de la última dilución. Ya realizadas las diluciones pertinentes se colocan con el pipeteador de gota 50 µL de la suspensión de eritrocitos ya sensibilizados y ajustados, se recomienda que en cada placa se tenga una hilera de control negativo (solución salina: sangre ajustada) y otra positiva de solución salina 0.9% con estándar de faseolotoxina al 0.2%.

Terminada la placa se rota en forma circular, para homogeneizar y se coloca en la incubadora por 1 hora a 37 ± 1 °C.

(f) Lectura

Una vez transcurrido el tiempo, para obtener el título de hemólisis, colocar la placa sobre un espejo adaptado al dispositivo, observar a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba y localizar el número que corresponde al último pozo donde se aprecia la hemólisis, la cual resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

(g) Recomendaciones

Realizar la dilución necesaria para que el extracto produzca un título dentro de los primeros 10 pozos de una hilera. Cuidar el rango de temperatura establecida y todo el material que se utilice debe estar perfectamente limpio.

Cálculos

A. Cantidad de lectina que realmente se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada (E)

$$E = M * D$$

M: concentrado de lectina en la solución diluida (µg/mL)

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador (50 µL)

$$E = \left(\frac{1 \mu\text{g}}{\text{mL}}\right) (50 \mu\text{L}) \left(\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}\right)$$

$$E = 0.05 \mu\text{g}$$

B. Límite de detección del método (L)

$$L = 2\left(\frac{E}{3^t}\right)$$

t = título de la lectina de referencia

Unidades Hemaglutinantes

A. Cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva (e)

$$e = M * D$$

M: concentración de muestra en la solución diluida (mg/mL)

D: Cantidad de muestra tomada por el microtitulador (50 μL)

$$M = \left(\frac{\text{g de muestra}}{10 \text{ mL}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) F$$

$$F = \text{factor de dilución} = \frac{\text{aforo}}{\text{alícuota}}$$

B. Cantidad mínima de muestra que produce prueba positiva de aglutinación (MA)

$$MA = 2\left(\frac{e}{3^t}\right)$$

t= título de la muestra problema

C. Cantidad de lectina de referencias expresarla en μg de muestra, que también equivale a 1 mg de lectina sobre 1 g de muestra (LE)

$$LE = \frac{L}{MA}$$

D. Unidades hemaglutinantes (UHG)

UHG = 1 mg faseolotoxina

Resultados expresados en UHG/g muestra

$$\left(\frac{\mu g}{mg}\right) \left(\frac{1 mg}{1000 \mu g}\right) \left(\frac{1000 mg}{1 g}\right) = \frac{mg}{g}$$

$$\frac{\mu g}{mg} = \frac{mg}{g}$$

$$\frac{mg}{g \text{ muestra}} = \frac{UHG}{g \text{ muestra}}$$

$$\left(\frac{LEmg}{g \text{ muestra}}\right) \left(\frac{1 UHG}{1 mg \text{ lectina}}\right) = \frac{UHG}{g \text{ Muestra}}$$

4.5.3 Taninos [21]

Fundamento

Metodología que corresponde al método de determinación de contenido de taninos en sorgo (ISO 9648-1988). Dicha técnica se basa en la reducción del ión férrico debido a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a una $\lambda=525$ nm.

Químicamente los taninos son compuestos orgánicos, no nitrogenados heterogéneos, que van desde monómeros hasta polímeros, que contienen una gran cantidad de grupos hidroxilos (polifenoles), los cuales son los responsables de su interacción con proteínas y otras moléculas.

Material y reactivos

- Balanza analítica Sartorius Extend
- Agitador magnético múltiple Wisestir
- Centrifuga eppendorf 5702
- Baño de agua Grant Mod. 67530
- Vortex Lab-Line modelo Super-mixer 1290
- Espectrofotómetro Thermo-Scientific Genesys 10 uv
- Vasos de precipitados
- Tubos de ensaye
- Dimetil-formamida (DMF) 75%
- Ácido tánico 0.2/100 mL
- Citrato férrico amoniacal 3.5 g/L
- Hidróxido de amonio 0.8 g NH₃/100 mL (a)
 - (a) De una botella de Hidróxido de amonio de peso molecular 35.05 g/mol y con un 29% NH₃

$$gNH_3OH = \frac{0.8 gNH_3 \times 100 gNH_3OH}{29 gNH_3}$$

$$gNH_3OH = 2.7586$$

$$2.7586 g NH_3OH \left(\frac{mL}{0.8928 g} \right) = \frac{3.0899 mL}{100 mL H_2O}$$

Procedimiento

Moler de 1 a 5 gramos de la muestra hasta obtener una harina homogénea. Pesar 0.5 a 1 g de muestra y ponerlos en un vaso de precipitados, agregar 18 mL de dimetilformamida al 75% y agitar durante una hora a 500 rpm. Transcurrido este tiempo, centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm, aforar el sobrenadante a 25 mL con dimetilformamida al 75 %.

1. Desarrollo de Color

Rotular tres tubos (uno será el blanco y dos la muestra problema) y agregar los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Muestra y Reactivos	Blanco (mL)	Problema 1 (mL)	Problema 2 (mL)	Problema 3 (mL)
Muestra	1	1	1	1
Agua destilada	6	5	5	5
Solución III	--	1	1	1
Solución IV	1	1	1	1

Agitar y dejar reposar los tubos durante 10 minutos en un baño a 30 °C.

Posteriormente leer la absorbancia a una longitud de onda de 525 nm.

2. Elaboración de la curva estándar.

Rotular 8 matraces aforados de 25 mL y agregar 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución de ácido tánico y aforar a 25 mL con dimetilformamida al 75%.

Tomar 1 mL del extracto anterior y depositar en un tubo de ensayo. Adicionar 5 mL de agua destilada, 1 mL de citrato férrico amoniacal y por último adicionar 1 mL de solución de amoniaco, agitar y dejar reposar los tubos durante 10 minutos en un baño a 30°C. Leer la absorbancia a 525 nm, y utilizar como blanco al tubo con 0 mL de ácido tánico.

Cálculos

Elaborar la curva de calibración de ácido tánico, graficando la absorbancia vs mg ácido tánico sobre mililitro.

$$\frac{\text{mg ác. tánico}}{\text{mL}} = \frac{\frac{2 \text{ mg ác tánico}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}}{25 \text{ mL}}$$

A partir de la ecuación de la recta de la curva patrón de ácido tánico y la lectura de absorbancia de la muestra problema, determinar la concentración de ácido tánico en mg/mL de la muestra problema con la siguiente ecuación:

$$\frac{mg \text{ \u00e1c t\u00e1nico}}{mL} = \frac{Absorbancia - b}{pendiente}$$

Una vez obtenida la concentraci\u00f3n de \u00e1cido t\u00e1nico se puede calcular el % de taninos con la siguiente formula:

$$\%Taninos = \left(\frac{mg \text{ \u00e1c. t\u00e1nico}}{1 mL}\right) \left(\frac{25 mL}{g \text{ Muestra}}\right) \left(\frac{1 g}{1000 mg}\right) \times 100$$

4.5.4 Nitratos [12, 20]

Fundamento

M\u00e9todo de Cataldo

M\u00e9todo basado en la formaci\u00f3n de un complejo como resultado de la nitraci\u00f3n del \u00e1cido salic\u00edlico bajo condiciones \u00e1cidas extremas, este complejo tiene su m\u00e1ximo de absorpci\u00f3n a 410 nm en soluciones alcalinas (pH > 12). La absorbancia del crom\u00f3foro es directamente proporcional a la cantidad de nitratos presente. [12]

En resumen, el procedimiento consiste en la extracci\u00f3n acuosa de nitratos en tejidos vegetales. Posteriormente centrifugar y llevar a cabo en el sobrenadante la nitraci\u00f3n del \u00e1cido salic\u00edlico, desarrollar color mediante la adici\u00f3n del \u00e1lcali y leer absorbancia de la soluci\u00f3n as\u00ed obtenida en espectrofot\u00f3metro a 410 nm.

Se determina el contenido de nitratos usando una curva est\u00e1ndar preparada con sal de nitrato qu\u00edmicamente pura (sodio, potasio, etc.)

En caso de trabajar con muestras cuyo extracto est\u00e9 muy pigmentado, se recomienda emplear carb\u00f3n activado tanto en la curva est\u00e1ndar como en la obtenci\u00f3n del extracto.

Material y Reactivos

- Vasos de precipitado de 50 mL

- Probeta de 50 mL
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Tubos de ensayo de 140 x 14 mm
- Embudos Buchner
- Matraces Kitasato
- Micropipetas Genex Beta de 50, 200 y 1000 μL
- Bureta de 50 mL
- Tubos de centrifuga
- Agitador magnético Thermoline Multi-stir patle 4, No 29387
- Centrifuga Eppendorf Mod. 5702
- Adaptador para filtración en Jeringa Millipore
- Membrana Millipore tipo HATF-02500 (tamaño poro 0.45 μm)
- Agitadores mecánicos tipo Vortex
- Baño regulador de temperatura Grant con escala de 0-100 $^{\circ}\text{C}$
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 uv

Todos los reactivos son grado analítico y el agua empleada es destilada.

- Sal de nitrato
 - Solución estándar de nitrato de 0.6 mg/mL
 - Solución estándar de nitrato de 10 mg/mL (empleada en el caso de que se trabaje con carbón activado)
 - * Las concentraciones indicadas corresponden al ión NO_3^- que es nuestro objeto de estudio.
- Ácido salicílico
 - Solución al 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de sodio
 - Solución 2 M
- Carbón activado
 - Grado comercial Supelco.

Procedimiento

(a) Preparación de la curva estándar (usando carbón activado)

Preparar curva estándar con intervalos de concentraciones de 6 a 60 μg de nitrato (NO_3).

En un vaso de precipitado de 50 mL adicionar exactamente 3.0 mL de la solución estándar de nitrato de 10 mg/mL, 550 mg de carbón activado y aproximadamente 30 mL de agua. Mezclar hasta homogeneizar. Centrifugar por 15 minutos y filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 41, enjuagando el vaso sucesivamente con pequeñas porciones de agua. Transferir el filtrado a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a la marca de aforo con agua, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 mL, Centrifugar una hora a 2700 a 3000 rpm. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre papel Whatman del # 542 y homogeneizar.

La solución así obtenida tiene una concentración de nitrato de 0.6 mg/mL.

***Nota1:** El filtrado debe quedar perfectamente traslúcido, si se observan partículas en suspensión, se sugiere filtrar una vez más o bien filtrar con dispositivo Millipore.

Rotular 6 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la curva, los restantes corresponden a los puntos de la curva. Adicionar diferentes volúmenes de la solución patrón de nitrato de acuerdo con la tabla No 1. Añadir agua a cada tubo para llevar a un volumen final de 0.1 ml y mezclar por 15 segundos en Vortex. Adicionar 0.4 ml de solución de ácido salicílico, mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño de temperatura a 30 °C por 20 minutos \pm 1. Transcurridos los 20 minutos, adicionar lentamente con bureta 9.5 ml de la solución de NaOH y agitar por 15 segundos en Vortex. Introducir en baño de temperatura a 30 °C por 15 minutos \pm 1. Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm. Trazar gráficas de absorbancia vs concentración de nitrato, expresada como μg de nitrato.

Tabla 1. Datos para preparar la curva estándar

Tubo	Solución estándar de nitrato 0.6 mg/mL (µl)	H ₂ O (µL)	Solución de ácido salicílico (mL)	Incubación 20 minutos 30 °C	Solución NaOH (mL)	Incubación 15 minutos 30 °C
1 (blanco)	-	100	0.4		9.5	
2	10	90	0.4		9.5	
3	20	80	0.4		9.5	
4	50	50	0.4		9.5	
5	70	30	0.4		9.5	
6	100	-	0.4		9.5	

(b) Obtención de extracto

En un vaso de precipitado de 50 mL añadir de 0.25 a 0.9 g de muestra, 550 mg de carbón activado y 30 mL aproximadamente de agua. Agitar moderadamente, de 500 a 700 rpm, en agitador magnético durante 15 minutos \pm 1 min.

***Nota 2:** El carbón activado únicamente es necesario si se tiene una muestra cuyo extracto este muy pigmentado.

Filtrar con ayuda de vacío sobre papel Whatman del #41, enjuagando el vaso sucesivamente con pequeñas porciones de agua. Transferir el filtrado cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a la marca de aforo con agua, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50 mL. Centrifugar una hora a 2700 – 3000 rpm. Filtrar el sobrenadante con ayuda de vacío sobre el papel Whatman del #542 y homogeneizar para efectuar la determinación.

***Nota 3:** El filtrado debe quedar perfectamente traslúcido, si se observan partículas en suspensión, se sugiere filtrar una vez más o bien filtrar con dispositivo Millipore

***Nota 4:** Al obtener el extracto se recomienda llevar a cabo inmediatamente la determinación, de no ser así, éste se debe guardar en refrigeración hasta que vaya a ser utilizado.

(c) Determinación

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema (Ver Tabla No 2):

Rotular 4 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la muestra. Adicionar alícuota de 100 μL de sobrenadante a cada tubo. Añadir 0.4 mL de la solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual adicionar 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño regulador de temperatura a 30 °C por 20 minutos \pm 1. Transcurridos los 20 minutos, adicionar con bureta 9.5 mL de solución de NaOH, mezclar por 15 segundos en Vortex e introducir en baño de temperatura a 30 °C por 15 minutos \pm 1. Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 410 nm.

Cálculos

Elaborar la curva patrón de nitratos graficando la absorbancia vs μg de nitratos. Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón y la lectura de absorbancia de la muestra problema, determinar la concentración de nitratos (μg) con la siguiente ecuación.

$$\mu\text{g nitratos} = \frac{\text{absorbancia de la muestra} - b}{m}$$

Donde:

b = ordenada al origen de la ecuación obtenida de la curva patrón

m = pendiente de la ecuación de la curva patrón.

Con la concentración de nitratos de la muestra problema expresada en μg , obtener el % de nitratos con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{g de nitratos}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{\mu\text{g nitratos} \times 50 \text{ mL} \times \frac{1\text{g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}}}{a \times c} \times 100$$

Donde:

a = alícuota tomada del extracto (0.1 mL)

c = peso de la muestra en g

Tabla 2. Datos para efectuar la determinación de Nitratos

Tubo	Extracto muestra (μL)	H_2SO_4 Concentrado (mL)	Solución de ácido salicílico	Incubación 20 minutos 30°C	Solución NaOH (mL)	Incubación 15 minutos 30°C
1(blanco)	100	0.4	-		9.5	
2	100	-	0.4		9.5	
3	100	-	0.4		9.5	
4	100	-	0.4		9.5	

4.5.5 Mimosina [15]

Fundamento

Se implementó el método colorimétrico para la determinación de mimosina de Matsumoto y Sherman, (1951)

La Mimosina es un aminoácido libre muy común en algunas leguminosas, incluyendo a *Leucaena leucocephala* y *L. glauca*, consideradas excelentes fuentes de proteína para la alimentación animal.

Su presencia limita el uso de las hojas y semillas en la alimentación de monogástricos, ya que afecta la función de la tiroides, provocando reducción del crecimiento.

Reactivos y Material

- Solución de mimosina, 0.1% en HCl 0.1 N (mimosina de *L. leucocephala*, SIGMA ALDRICH número de catálogo M0253)
- Solución de Cloruro Férrico al 0.5% en HCl 0.1 N
- Ácido clorhídrico 0.1 N
- Carbón activado granulado
- Agua desionizada
- Vasos de precipitado de 50 mL
- Vasos de precipitado de 150 mL
- Agitadores magnéticos de 1½ in

- Matraz volumétrico de 25 mL
- Crisoles fibertec P0 (160-250 micrones), número de catálogo 1000-1174
- Matraz Kitazato de 125 mL
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 uv
- Parrilla de agitación y calentamiento Wisestir
- Potenciómetro Corning pH meter 430

Procedimiento.

(a) Curva de calibración

Pesar exactamente 0.0255 g de estándar de L. Mimosine de (***Koa Hoale***) de Sigma-Aldrich con número de catálogo M0253 y aforar a 25 mL con HCl 0.1 N, a partir de la solución concentrada preparar las siguientes soluciones de los estándares y aforar a 25 mL.

Tabla 3. Datos para preparar la curva de calibración

Tubo	mL de solución concentrada	HCl 0.1 N (mL)	FeCl ₃ al 0.5% en HCl 0.1N (mL)
1	0.125	2.5	1
2	0.250	2.5	1
3	0.500	2.5	1
4	0.750	2.5	1
5	1.000	2.5	1
6	1.250	2.5	1
7	1.500	2.5	1

(b) Extracción

Pesar 0.3125 g de muestra de Leucaena y dar una trituración en un mortero, depositarlo en un vaso de precipitados de 50 mL, adicionar 25 mL de HCl 0.1 N, agitar durante una hora a 300 r.p.m a 70 °C, transcurrido el tiempo se deja en reposo absoluto y se deja que alcance la temperatura ambiente.

(c) Clarificación

Transferir 2.5 mL del sobrenadante a un vaso de precipitados de 50 mL con 0.007 g de carbón activado granulado y adicionar 5 mL de H₂O desionizada, cubrir con un vidrio de

reloj y calentar a ebullición por 15 min, transcurrido el tiempo se deja enfriar y se filtra empleando vacío y se utiliza un crisol de filtración Filter-Crucible, posteriormente se enjuaga con 10 mL de HCl 0.1 N y finalmente con 10 mL de H₂O desionizada dividida en tres porciones.

(d) Determinación colorimétrica

Transferir el líquido a un vaso de precipitado de 50 mL, agregue 1 mL de solución de cloruro férrico al 0.5% en HCl 0.1 N, el pH de esta solución debe estar entre 1.5 y 2.5, después transfiera el líquido a un matraz volumétrico de 25 mL aforado con H₂O desionizada. Leer en el espectrofotómetro a 535 nm.

Cálculos

Elaborar la curva de calibración; µg mimosina sobre mililitro vs absorbancia. A partir de la ecuación de la recta de la curva patrón y con los datos de la absorbancia de la muestra problema, calcular los µg de mimosina sobre mililitro de HCL.

$$\frac{g \text{ muestra}}{mL \text{ HCl}} = \frac{g \text{ muestra pesada}}{25 \text{ mL HCl}} \times \frac{2.5 \text{ mL HCl}}{25 \text{ mL HCl/H}_2\text{O}}$$

$$\frac{\mu g \text{ mimosina}}{mL \text{ HCl}} = \frac{abs \text{ obtenida de la muestra} - b}{pendiente}$$

Con la concentración de mimosina expresada en µg de la muestra problema se puede calcular el % de mimosina con la siguiente formula:

$$\% \text{ Mimosina} = \left[\frac{\mu g \text{ mimosina}}{mL \text{ HCl}} \right] \times \left[\frac{1 \text{ g}}{1000000 \mu g} \right] \times \left[\frac{mL \text{ HCl}}{g \text{ muestra}} \right] \times 100$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Datos Etnobotánicos

Se entrevistaron a 6 personas, 3 en el municipio de San Sebastián Zinacatepec y 3 en la ciudad de Tehuacán, Puebla.

Las preguntas realizadas en las entrevistas fueron las siguientes:

- ¿Cómo nombran a la planta?
- Período de producción de brotes, botones florales y semillas
- ¿Consumen la planta?
- ¿Qué partes de la planta se consumen?
- ¿Cómo se llaman las partes que se consumen?
- ¿En qué fecha se consume cada parte?
- ¿Cómo consumen las partes?
- Se prepara alguna receta con las partes de la planta.
- ¿Cuándo se consume la receta, es preparada para una fiesta tradicional?
- Efectos o síntomas que presenta después de consumirla.
- ¿Se consume solo por humanos o también por animales, que partes les dan y cómo?
- ¿Se usa con fines medicinales o algún remedio, cómo se prepara y cómo se toma?
- La planta es fría o caliente

Con la información obtenida del estudio etnobotánico se sabe que en general el árbol o arbusto es conocido como guaje o “huashi” en náhuatl y cada año florece y fructifica, el árbol se siembra y a los siete meses produce flores, aunque algunas personas aseguran que es silvestre y no es necesario sembrarlo, crece con el temporal (de Junio a Septiembre).

Los brotes son conocidos así o como hojas y retoños o “ishifio” en náhuatl y se dan todo el año. A los botones florales se les conoce también como trompillos cuando están tiernos (con forma de cerillo), “xochitl” en náhuatl o “huashquelite” que es otro nombre dado por los pobladores de Tehuacán, los botones florales se dan por el mes de Agosto y Septiembre.

Las semillas de guaje son conocidas como semillas o guaje. El período en el que se da la semilla oscila entre los meses de Agosto a Diciembre, dependiendo de la región y el tipo de guaje, ya sea rojo o verde, en este caso el guaje verde se da en los meses de Octubre a Diciembre.

En cuanto al consumo de las tres partes del guaje estudiadas este varía, ya que hay quienes consumen los brotes, botones florales y semillas o solo botones florales y semillas y quienes únicamente consumen las semillas. Los brotes son consumidos crudos cuando están tiernos o bien los tuestan o doran un poco hasta tomar un color “negro tenue”, de igual manera se asan en comal y así son ingeridos como botana o en tacos. Los botones florales hay quién únicamente los consumen cuando están tiernos y quienes los comen todavía cuando están maduros y floreciendo y de igual manera son consumidos crudos, se dice tienen un sabor dulce. Las semillas son la parte de la planta que más se consume, estas se pueden ingerir cuando están tiernas o maduras, de preferencia tiernas, y normalmente las comen crudas y en algunas ocasiones un poco doradas como si fueran pepitas de calabaza. Tanto los brotes, los botones florales y semillas cuando son ingeridos por la gente lo hacen en forma de botana o bien acompañando algún otro alimento, como huevos o carne. Las semillas se comen en tortillas de maíz con un poco de salsa o sal.

Entre las recetas típicas de la región que destacan por ser preparadas con guaje se encuentran: El mole de Caderas, El Huaxmole (salsa de guaje) el cual ya está reportado en la literatura (30), Huevos en salsa de guaje y Salsa de chile y tomate con guaje.

El mole de Caderas es preparado únicamente en Tehuacán, Puebla cuando es la Matanza, que empieza desde a mediados del mes de Octubre y termina en Noviembre. El platillo lleva los siguientes ingredientes y se prepara de acuerdo a la señora María (no quiso dar sus apellidos) de Tehuacán, Puebla de la siguiente manera:

Ingredientes:

- Semilla de Guaje
- Chile Guajillo
- Chile Costeño
- Carne de Chivo (carne de matanza que solo hay en el mes de Octubre)

- Tomate o Jitomate
- Masa (opcional)
- Ejotes de Xomala
- Hoja de Aguacate o epazote

Modo de preparación

Se cocina la carne de chivo y luego se fríe. Se muele la semilla de Guaje con el chile guajillo, el chile costeño y tomate o jitomate según la preferencia. Freír la salsa y agregar la carne. Agregar hoja de aguacate o epazote según el gusto. Si se desea que espese la salsa se agrega un poco de masa.

Otro platillo típico de la región es el Huaxmole y se prepara de la siguiente manera:

Ingredientes

- Carne de Res o chivo
- Chile costeño
- Tomate o Jitomate
- Semilla de guaje

El Huaxmole es una salsa que se prepara en molcajete; se le agrega chile costeño tomate o jitomate según la preferencia de las personas y las semillas de guaje, se muele y este es acompañado con carne de res o chivo previamente cocinado.

Con el guaje también se pueden preparar otros guisados como por ejemplo los huevos con salsa de guaje y salsas con guaje. Para preparar la salsa de guaje se asa el chile y se muele con la semilla de guaje y un poco de ajo en el molcajete. Se fríen los huevos y posteriormente se agrega la salsa de guaje y al final ya que están cocidos los huevos se le agrega la hoja de aguacate para dar más sabor a la salsa.

Tras el consumo de las partes comestibles del guaje la gente de la región no ha detectado ningún síntoma ni efecto bueno o malo después del consumo del guaje.

Algunas personas comentan que los brotes, botones florales y semillas son consumidos únicamente por humanos y no por animales, por ejemplo ganado como ya antes se había

mencionado en los antecedentes. Aunque en esta región si hay gente que le da de comer guaje a su ganado y a ciertos animales, como por ejemplo a cabras, borregos y chivos. Únicamente se lo dan en las siguientes circunstancias: cuando ya se está secando el árbol y se caen las vainas, cuando la gente ya no lo compra en el mercado o ya no lo consume porque está muy maduro. En otro de los casos solo se les da “la cáscara de la vaina” ya sin semillas, una vez que han sido consumidas por la gente.

Aunque en la literatura el guaje está recomendado para usarlo como planta medicinal en el alivio de daños por parásitos intestinales, en el área de estudio no ha sido usado como remedio o con fines medicinales. En general toda la planta es considerada como caliente al estómago y de acuerdo al comentario hecho por una entrevistada de nombre anónimo se dice que es caliente porque quema la lengua y cae pesado al estómago y cuando se come en exceso uno de los síntomas es dolor e inflamación.

5.2 Determinación de Humedad en material biológico en fresco

A continuación se presentan en la tabla 4 los datos correspondientes al contenido de humedad en la muestra original de las tres partes comestibles del arbusto de guaje. Se observa que hay diferencia significativa del contenido de humedad entre las tres muestras analizadas y que este indica la frescura del material biológico de acuerdo al grado de maduración del arbusto de guaje y tiempo de recepción del mismo una vez recolectado.

Tabla 4. Determinación de Humedad en muestra original de tres partes comestibles de Guaje verde (g/100g)¹

Determinación	Brotes	Botones Florales	Semillas
Humedad	59.78 ± 0.892	75.55 ± 0.17	79.39 ± 0.54

¹Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV<5%

Una vez que el material biológico fresco se sometió a secado para su conservación en el laboratorio y se molió, se pudo obtener las harinas respectivas de cada muestra de guaje y se guardaron en envases con lo cual se permitió que se equilibrara su contenido de agua con la humedad relativa del laboratorio, para poder realizar las determinaciones analíticas que a continuación se describen.

5.3 Análisis Proximal

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los análisis realizados en las harinas de brotes, botones florales y semillas, por triplicado.

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos del análisis proximal de las tres harinas del arbusto de guaje; brotes, botones florales y semillas, además estos resultados se ilustran en la figura 3, en forma de gráficas de barras, donde se observa que el mayor componente del material biológico estudiado son los hidratos de carbono (>45%).

Tabla 5. Análisis proximal en la harina de tres partes comestibles del arbusto de Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) (g/100g)¹

Determinación	Brotes	Botones F.	Semillas
Humedad	6.52±0.18	4.23±0.01	5.08±0.03
Grasa	5.26±0.22	2.18±0.02	1.94±0.01
Fibra cruda	11.66±0.16	12.84±0.17	9.04±0.22
Proteína Cruda ²	20.67±0.13	25.33±0.27	32.3±.42
Cenizas	8.59±0.19	6.92±0.002	5.04±0.04
Hidratos de Carbono ³	47.27	48.51	46.61

¹Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV<5%

²Determinación %N*6.25

³Hidratos de Carbono calculados por diferencia de acuerdo al esquema Weende.

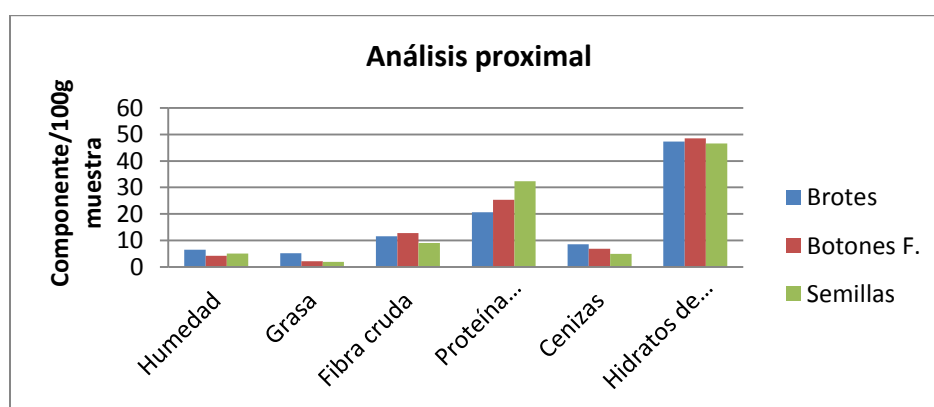


Figura 3. Presentación de barras del Análisis proximal de la harina de las tres partes comestibles del Guaje verde.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la complementación bromatológica realizada a la harina de las tres partes comestibles de Guaje verde, así mismo se presentan

estos datos en la figura 4 en forma de gráfica de barras, donde se observa que existe diferencia significativa en el contenido de Proteína Verdadera y FDT de las tres harinas y que el contenido de Proteína Verdadera va en incremento de acuerdo al estado de maduración, así mismo se logra apreciar que no hay diferencia significativa en la *digestibilidad in vitro* entre las tres muestras del material biológico analizado.

Tabla 6. Complementación bromatológica de tres partes comestibles del Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) (g/100g)¹

Determinación	Brotes	Botones florales	Semillas
Proteína Verdadera ²	15.47±0.22	17.18±0.07	20.94±0.29
Fibra Dietética Total	40.09±0.16	45.32±0.17	43.16±0.22
Digestibilidad <i>in vitro</i>	59.25±0.47	59.47±0.57	59.62±0.34

¹Promedio ± D.E., (n=3), CV <5%

²Determinación %N*6.25

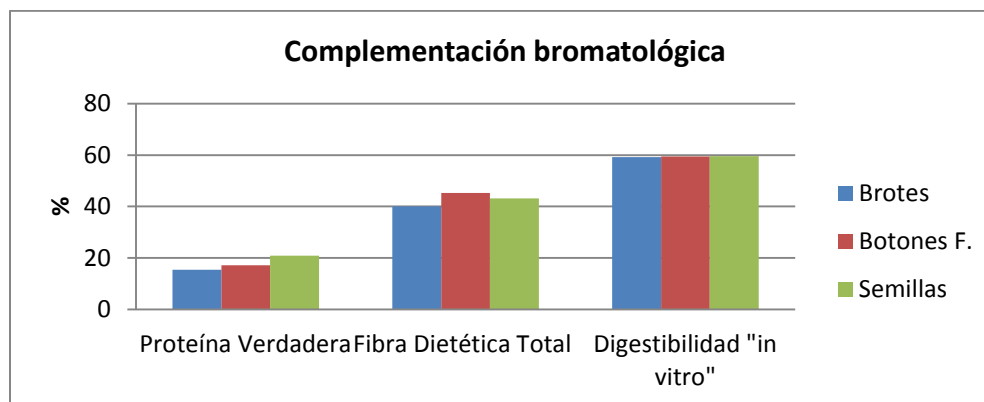


Figura 4. Complementación bromatológica de la harina de las tres partes comestibles de Guaje verde.

No obstante que las tres harinas presentan humedades muy parecidas entre sí como se puede observar de la tabla 5, es conveniente expresar los datos en base seca (100%ST) para una equitativa comparación, donde no influya el contenido de agua de las muestras.

A continuación se muestran en la tabla 7 los datos del análisis proximal y proteína verdadera en base seca acompañado de un análisis estadístico, que consistió en un análisis de varianza acoplado a la prueba de Duncan, para discriminar si existe diferencia significativa entre las tres muestras.

Tabla 7. Análisis proximal y proteína verdadera de tres partes comestibles del arbusto de *Leucaena leucocephala* en base seca (100% ST)¹

Determinación	Brotos	Botones F.	Semillas
Grasa	5.63±0.24 ^b	2.28±0.02 ^a	2.04±0.01 ^a
Fibra cruda	12.47±0.17 ^a	13.41±0.18 ^b	9.52±0.23 ^c
Proteína cruda ²	22.11±0.14 ^a	26.45±0.28 ^b	34.03±0.44 ^c
Proteína Verdadera ²	16.55±0.24 ^a	17.94±0.07 ^b	22.06±0.36 ^c
Cenizas	9.19±0.20 ^a	7.23±0.003 ^b	5.31±0.04 ^c

¹Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV <5%

²Determinado %N*6.25

Diferente letra dentro de la fila indica diferencia estadística significativa (p=0.05)

En la figura 5 se presentan los datos de la tabla 7 en forma de gráfica de barras para una mejor apreciación visual.

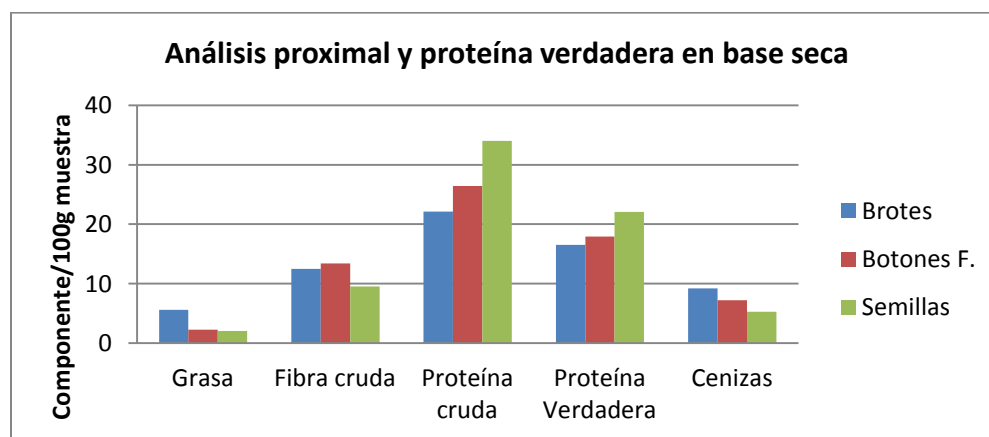


Figura 5. Análisis proximal de la harina de las tres partes comestibles del Guaje verde en base seca

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 7, se puede observar que casi todos los parámetros analizados en las tres muestras de harina de guaje verde presentaron diferencias

marcadas en su contenido, excepto la grasa, ya que el estudio estadístico mostro que no hay diferencia significativa en el contenido de grasa entre botones florales y semillas, únicamente con los brotes que presento un contenido de 5% de este nutrimento. De igual manera se observa que de acuerdo al estado de maduración de la planta el contenido de grasa tiende a disminuir.

La muestra que mostró el mayor contenido de cenizas fue la de los brotes con un 9.19%, seguida de botones florales (7.23%) y semillas (5.31), se puede observar que hay una tendencia a disminuir el contenido de cenizas de acuerdo a la etapa de maduración del arbusto de guaje. Respecto al contenido de cenizas, destacan León M. et al., que la cantidad de cenizas depende de la calidad y edad de la planta, del clima, de la época y de las riquezas minerales del suelo. [33]

En cuanto al contenido de fibra cruda, se puede apreciar que hay diferencia estadísticamente significativa entre las tres harinas de guaje, esto debido a la fisiología de cada una de las partes analizadas, así como al estado fenológico de la planta, es de esperarse que las semillas presenten un contenido bajo en fibra cruda en comparación con los brotes y botones florales por el contenido de hidratos de carbono estructurales que están presentes especialmente en los brotes, así que era de esperarse que la hoja presentara mayor contenido de fibra cruda que las flores por el contenido de celulosa y lignina en brotes, cabe mencionar que estos van aumentando con la edad de esta fracción, siendo superiores al contenido de hemicelulosa. [18, 40]

A si mismo se puede apreciar que el parámetro que presento la mayor variación entre las tres muestras analizadas fue el contenido de proteína cruda ya que va desde un 22.11% en brotes hasta un 34.03% en semillas, siendo esta última la muestra que presenta la mayor cantidad de proteína cruda, observándose que se incrementa este nutrimento conforme se avanza en el estado de maduración. Estos porcentajes son favorables ya que hablan bien de su contenido proteínico relativamente alto como se reporta en la literatura, los cuales van desde un 24 % hasta un 37% de proteína cruda, dependiendo de su estado de maduración, variedad, época del año, clima y suelo.[5, 18, 35, 42]. Sin embargo para determinar cuál de las tres muestras presenta mejor fuente proteínica real se realizó la determinación de proteína verdadera y digestibilidad *in vitro*, en donde se tiene un porcentaje de proteína

verdadera que va desde un 16.55% en brotes hasta un 22.06% en semillas, observándose que el contenido de proteína verdadera presenta la misma tendencia de proteína cruda a aumentar conforme se avanza en el estado de maduración del arbusto, siendo de nuevo las semillas quienes presentan el mayor valor para proteína verdadera, seguida de botones florales y los brotes. De este modo se puede apreciar que no todo el contenido de nitrógeno total es proteína, la fracción restante indican la presencia de otros compuestos nitrogenados que pueden pertenecer a factores tóxicos como mimosina y nitratos.

Por otro lado, en la tabla 6, se observa que la digestibilidad *in vitro* no presenta diferencia significativa entre las tres muestras analizadas. Los datos de digestibilidad *in vitro* experimentales están dentro del rango reportado en la literatura para alimentos de origen vegetal y de *Leucaena leucocephala* ya que se reporta un contenido mínimo de 59.1 y los datos experimentales van desde 59.25 a 59.62%. [18, 40, 33]. Los valores aquí reportados de digestibilidad *in vitro* en comparación con los reportados para alimentos de origen animal son bajos esto es debido a que la proteína de las leguminosas es de origen vegetal, la digestibilidad indica la biodisponibilidad (absorción) de este nutriente pero no indica la calidad de la proteína. Otra razón de su baja digestibilidad se debe a la presencia de inhibidores de tripsina, los cuales inhiben la actividad de las proteasas digestivas, y el contenido de fibra, la cual ocasiona que haya menor absorción de nutrimentos [14].

De igual manera se puede observar que hay una correlación del contenido de proteína verdadera con la digestibilidad *in vitro*, entre mayor sea el contenido de proteína verdadera, mayor es la digestibilidad. [18, 33, 39]

Tabla 8. Caracterización bromatológica de tres partes comestibles de Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) en base seca (100% ST)¹

Determinación	Brotes	Botones florales	Semillas
Fibra Dietética Total	42.89±0.16 ^a	47.32±0.17 ^b	45.47±0.22 ^c

¹Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV<5%
Diferente letra dentro de la fila indica diferencia estadística significativa

En cuanto a fibra dietética total (FDT) se observa en la tabla 8, que los botones florales son quien reportan el mayor contenido de FDT con un 47.32%, seguida de las semillas y por último los brotes con 42.89% en base húmeda. En la tabla 5 se aprecia que el contenido de

hidratos de carbono en las tres muestras es alto como era de esperarse y es el componente con mayor predominancia. Así mismo, de esta cantidad de hidratos de carbono la mayor parte corresponde a FDT lo cual produce un beneficio a la salud ya que se reporta que interviene en el metabolismo de lípidos y hidratos de carbono y regulando la función intestinal. Así, la fibra actúa como reguladora sobre el metabolismo lipídico, reduciendo la absorción de grasa y desarrollando un efecto hipocolesterolémico; además reduce la absorción de glucosa e incrementa el volumen fecal. [14]

5.4 Análisis de Factores Tóxicos

En las leguminosas se encuentran varios factores tóxicos y antinutrimientales. En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis toxicológico realizado a las harinas de las tres partes del arbusto de guaje: brotes, botones florales y semillas.

Tabla 9. Análisis de factores tóxicos de tres partes comestibles del arbusto de guaje verde (*Leucaena leucocephala*)¹

Determinación	Brotes	Botones flores	Semillas
Inhibidores de Tripsina ²	9.43±0.49	6.96±0.73	5.01±0.67
Lectinas ³	0.012	0.0012	0.0038
Mimosina ⁴	2.17±0.10	3.48±0.04	4.79±0.02
Taninos ⁴	3.88±0.16	5.98±0.12	3.87±0.05
Nitratos ⁻⁻⁻	---	---	---

¹ Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV <5%

² U.T.I/mg (Unidades de tripsina inhibida/mg de muestra)

³ U.H.G/g muestra (Unidades hemaglutinantes/ g de muestra), en este caso el valor reportado es la mediana.

⁴ Se presenta en porcentaje

⁻⁻⁻ Abajo del límite de cuantificación del método empleado, es decir, su contenido es < 0.01%

De igual manera que en el análisis proximal, los datos obtenidos del análisis de los factores tóxicos se presentan en base seca para que el contenido de agua no interfiera y así poder hacer una mejor comparación estadística de estos parámetros, los datos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis de factores tóxicos de las tres partes comestibles del Guaje verde (*Leucaena leucocephala*) en base seca¹

Determinación	Brotos	Botones F.	Semillas
Inhibidores de	10.11 ^a	7.28 ^b	5.39 ^c
Lectinas³	0.012	0.001	0.0037
Mimosina⁴	2.32±0.04 ^a	3.63±0.01 ^b	5.05±0.004 ^c
Taninos⁴	4.15±0.06 ^a	6.24±0.03 ^b	4.08±0.01 ^a
Nitratos⁻⁻⁻	---	---	---

¹Se presenta el valor promedio ± D.E., (n=3), CV <5%

²U.T.I/mg (Unidades de tripsina inhibida/mg de muestra)

³U.H.G/g muestra (Unidades hemaglutinantes/ g de muestra)

⁴Se presenta en porcentaje

⁻⁻⁻ Abajo del límite de cuantificación del método empleado, es decir, su contenido es < 0.01%

De acuerdo a la tabla 10 los taninos no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de los brotes y semillas, pero si diferencia de estas dos con los botones florales. La presencia de taninos en los alimentos determina una disminución del valor biológico, es decir, son responsables de la disminución de la digestibilidad proteínica, así como de la inhibición de la absorción intestinal de azúcares. Se encontró que niveles mayores a 5% en taninos son letales. A sí mismo un contenido alto de taninos no es apto para su consumo ya que concentraciones elevadas de este factor producen un sabor astringente. [2, 19, 12, 24]. Los botones florales es la muestra que presenta un alto nivel de taninos, que si se consumiera en esta forma sería de alto riesgo a la salud del consumidor.

En cuanto a nitratos, de acuerdo a la metodología empleada, no fue posible cuantificar el contenido de nitratos en las tres muestras de la planta de guaje, lo que indica que el contenido está por debajo del límite máximo permisible (LMP), es decir, no hay riesgo por este factor tóxico.

En la cuantificación de lectinas no se obtuvo diferencia en el contenido de este factor entre las tres harinas, de igual manera se observa que se tuvieron valores menores a 1UHG/g muestra, lo cual indica que no hay riesgo por este factor tóxico.

Para mimosina se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las tres muestras de Guaje. También se puede apreciar que los niveles encontrados de este aminoácido son altos como era de esperarse en esta forma de la muestra, así mismo se observa que

conforme avanza el estado de maduración del arbusto de guaje el contenido de mimosina tiende a aumentar, siendo los brotes la muestra que tiene un menor porcentaje de mimosina con un 2.32%, seguida de botones flores y Semillas, donde llega al 5% en base seca.

En el caso de inhibidores de tripsina se aprecia que existe diferencia estadísticamente significativa entre las tres muestras de guaje y que presenta una tendencia descendente en el contenido de este factor conforme avanza el estado de maduración del arbusto de guaje.

Una vez realizado el análisis bromatológico y los análisis toxicológicos de las tres muestras en estudio y aprovechando que se contaba con los datos de la humedad original a continuación se presenta el contenido de macronutrientes, factores tóxicos y antinutrientales de estas fases de desarrollo en la muestra original ya que es como se colecta el material y como en ocasiones se consume.

En las tablas 11, 12 y 13 se observa que el contenido de todos los macronutrientes, factores tóxicos y factores antinutrientales se ven disminuidos por el alto contenido de humedad presente en las tres muestras analizadas.

Tabla 11. Composición de macronutrientes de las tres partes comestibles de guaje verde en muestra original (g/100g)

Determinación	Brotes	Botones F.	Semillas
Humedad	59.78	75.55	79.39
Grasa	2.26	0.56	0.42
Fibra cruda	5.02	3.28	1.96
Proteína cruda¹	8.89	6.46	7.01
Cenizas	3.70	1.77	1.09
Hidratos de Carbono	20.34	12.38	10.12

¹Determinado %N*6.25

Tabla 12. Complementación bromatológica en muestra original de tres partes comestibles de Guaje verde (g/100g)

Determinación	Brotes	Botones F.	Semillas
Proteína Verdadera	6.66	4.39	4.55
Fibra Dietética Total	17.25	11.57	9.37

Tabla 13. Factores tóxicos y antinutricionales en muestra original de tres partes comestibles de Guaje verde

Determinación	Brotes	Botones F.	Semillas
Inhibidores de tripsina (UTI/ mg muestra)¹	4.07	1.77	1.11
Lectinas (UHG/g muestra)²	0.005	0.0003	0.0008
Mimosina³	0.93	0.89	1.04
Taninos³	1.67	1.52	0.84
Nitratos³	---	---	---

¹U.T.I/mg (Unidades de tripsina inhibida/mg de muestra)

²U.H.G/g muestra (Unidades hemaglutinantes/ g de muestra)

³Se presenta en porcentaje

--- No se pudo cuantificar el contenido de nitratos mediante el método utilizado (<0.01%)

La muestra del guaje verde que se propone para su consumo son las semillas ya que de las tres muestras es la que presenta principalmente mayor contenido de proteína cruda y proteína verdadera por otro lado es la muestra que presenta mayor contenido en mimosina, sin embargo para disminuir el contenido de factores tóxicos se propone realizar un tratamiento térmico adecuado y cabe mencionar que para las tres partes comestibles del guaje verde su consumo no presenta riesgo a la salud si no se consume en abundancia o en forma habitual.

6. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el estudio etnobotánico corroboran en la mayor parte lo señalado en las fuentes de información bibliográfica.
- Los nombres comunes con los que se le conoce a las partes comestibles de la *Leucaena leucocephala* son múltiples y variados, dependiendo del área geográfica y la cultura. Sin embargo el más recurrente es “guaje”.
- El Huaxmole es la comida típica de la región de Tehuacán, Puebla y es una de las preparaciones que le ha dado renombre a esta área del país. El guaje es consumido principalmente por los humanos y solamente cuando está muy maduro o ya no tiene precio de venta se les da al ganado.
- Las semillas de guaje, los retoños, las inflorescencias tiernas y las vainas tiernas son productos no forestales de gran potencial económico en la región.
- Las tres partes comestibles del guaje son ricas en contenido proteínico, su intervalo va desde un 22.11% hasta un 34.03% en base seca, destacando las semillas por su mayor contenido en este macronutriente como se esperaba.
- La digestibilidad *in vitro* calculada de las tres partes del Guaje se encuentra dentro de los datos reportados en la literatura.
- Los brotes, botones florales y semillas presentaron un contenido de inhibidores de tripsina inferiores a 10 UTI/mg, lo cual no presenta un riesgo en su consumo por presencia de este factor antinutricional, sin embargo el contenido de este factor antinutricional puede disminuir aún más si se le aplica un tratamiento térmico adecuado a las muestras, con lo que se logrará mejorar el valor nutritivo de las proteínas.
- El contenido de taninos es significativo en especial para los brotes por lo que no sería muy recomendable su consumo en la alimentación humana por la disminución en la disponibilidad de las proteínas y el sabor astringente que producen.
- Mediante el método utilizado para nitratos no se obtuvo resultados, lo cual indica que no hay problema con este factor tóxico en las muestras evaluadas.
- Se logró implementar el método colorimétrico para la determinación de mimosina, encontrándose que el contenido de este factor tóxico no presenta riesgo a la salud siempre y cuando se moderé su consumo.

- El contenido de agua y la forma en que se haya obtenido y mantenido el material biológico influye significativamente en las concentraciones de los diferentes parámetros cuando se reporta en el material fresco u original.
- De acuerdo a los datos obtenidos en el aspecto bromatológico, toxicología analítica y en conjunto con la información etnobotánica, en general el consumo de la *Leucaena leucocephala* por humanos, en grandes cantidades puede causar un riesgo a la salud, ya que el alto contenido del factor tóxico en particular de mimosina limita su consumo, por lo cual se recomienda su uso cocido preferentemente, como en el caso del consumo tradicional en salsa o moles.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Anaya, A. y Espinosa G., 2010. Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Ed. Plaza y Valdez S.A. de C.V., México, D.F., pág. 107.
2. Astiasaran A. y Martínez A., 2000. Alimentos: Composición y propiedades. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, págs. 155, 159-161
3. Aykroyd, W. y Doughty, J., 1980. Las leguminosas en la nutrición humana. Estudio FAO: Alimentación y nutrición No. 20, Roma, pág. 1-98.
4. Badui S., 2006. Química de los Alimentos., Pearson 4ta edición, México D. F., págs. 427-428.
5. Barros R. y Briceño P., 2012. Sistemas Silvopastoriles con *Leucaena leucocephala* como alternativa en la producción ovina. Vol. 5 No. 2, Universidad autónoma de Yucatán. Mérida Yucatán. Págs. 22-23.
6. Bateman J. V., 1970. Nutrición animal (Manual de Métodos analíticos). Herrero Hnos., S. A. México D. F., Págs. 110-112, 123-131, 170-172.
7. Belitz H., 1997. Química de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, págs. 797, 807, 811-813.
8. Benitez Y. y Bernal H. Producción de Forraje de Guaje (*Leucaena ssp.*) asociado con Zacate *Brachiaria brizantha* var. Libertad para ovejas en pastoreo. 2009. Tesis. Universidad de Chapingo. Texcoco, Estado de México, págs. 26-28, 33-36.
9. Cameán A., y Repetto M., 2006. Toxicología Alimentaria. Editorial Diaz de Santos. Madrid págs. 193, 238-240, 245.
10. Castellanos C., y Soulé L., 1986. Técnica Pecuaria en México. No. 50., Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos SARH., México D.F., pág. 151
11. Catoldo, D., Haroon, M., Schrader, L. and Youngs, V., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80.
12. Derache, R., 1990. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, págs. 109-112, 120-121, 130, 234-239.

13. D'Mello, J. and Acomovic, T., 1989. *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition: A review. Anim. Feed Sci. Technol. 26, 1-28.
14. Gil, A., 2010. Tratado de nutrición, Tomo II; Composición y Calidad de los alimentos. 2a edición. Médica Panamericana. Madrid, pág. 156, 158,
15. Hegarty, M., Court, R. and Thorne, P., 1964. The determination of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine in biological material. Aust. J. Agric. Res. 15, 168-179.
16. Hegarty, M., 1986. Toxic amino acids in food of animals and man. Proc. Nutr. Soc. Aust. 11, 73-81.
17. Helrich, K., 1997 (Ed.) Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC, 16th edition, Arlington. Vol. II, section 45.4.07 method 960.52.
18. Hernández I., Benavidez J. y Simón L. 1999. Manejo de las defoliaciones de *Leucaena leucocephala* para la producción de forraje en el periodo seco en Cuba. 2. Efecto de podas únicas en el valor nutritivo. Pastos y Forrajes. Turrialba, Págs. 135-144.
19. Hidalgo G., 1999. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar nitratos y taninos en muestras vegetales. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México D. F., págs. 19-24, 45-48.
20. Horwitz, W. and Latimer, G. (Editors), 2006. Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists. Published of AOAC International, 18th edition, Gaithersburg. Chapter 4, pp. 1-2, 8, 3-36, 40-42, 44-47; Chapter 45, Pp. 77-78
21. ISO 9648-1998, 1998. Determination of tannin content in sorghum. 1th edition.
22. Kakade, M., Rackis, J., Maghee, J. and Puski, G., 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chem. 51, 376-382.
23. Liener, I., 1980. Toxic constituents of plant foodstuffs, 2^a Edicion Academic Press. New York, pp. 523-550.
24. Lindner E., 1995. Toxicología de los Alimentos. 2da edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, Págs. 1-5, 30, 82-84, 88.

25. Lucas, B. and Sotelo, A., 1993. A useful modification of the hemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. 2th International Workshop on ANFs. In legume seeds. EAAP Publication No. 70, Wageningen. Pp. 71-74.
26. Lucas, B., Guerrero, L., Sigales, L. and Sotelo, A., 1988. True protein content and non-protein amino acids present in legume seeds. Nutr. Rept. Int. 37 (3) 545-553.
27. López M., 2000. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética, 2000. Tesis Facultad de Química. UNAM. México D. F., págs. 15, 23-25.
28. Montañón E., Servin M., Pérez E. y Naranjo E., 1991. Árboles y arbustos de nuestra cultura alimentaria. Volumen 1. Sistema Nacional para el desarrollo Integral de la Familia. DIF. Programa de Orientación Alimentaria., México, D.F., págs. 22-23.
29. Muller, H. y Tobin, G., 1986. Nutrición y ciencia de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. Pág. 63-77, 141-145.
30. Muñoz, R., 2012. Larousse: Diccionario enciclopédico de la Gastronomía Mexicana. Ediciones Larousse, S. A. de C. V., México D.F., pág. 286, 327-328, 401, 595-596.
31. Página web: CONABIO
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/44-legum26m.pdf (consultada en Febrero 2013)
32. Página web: CONAFOR, *Leucaena leucocephala*
<http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/939Leucaena%20leucocephala.pdf> (consultada en Febrero 2013)
33. Página web: Indicadores de la composición química y digestibilidad *in vitro* de 14 forrajes tropicales.
<http://www.reduc.edu.cu/147/12/1/147120106.pdf> (consultada en Febrero de 2013)
34. Página web: *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.
<http://www.fs.fed.us/global/iitf/Leucaenaleucocephala.pdf> (consultada en Febrero 2013)
35. Página web: *Leucaena*, un arbolito que se las trae.

- http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/159-leucaena.pdf (consultada en Febrero de 2013)
36. Página web: SAGARPA, Guaje
<http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Hortalizas/Guaje.html>
(consultada en Febrero 2013)
37. Página web: SEDESOL, Diagnóstico sobre la población en condiciones de pobreza vulnerable a los efectos de la desnutrición.
http://www.sedesol.gob.mx/work/models/SEDESOL/Resource/1778/2/images/Diagnostico_Liconsal.pdf (consultada en Septiembre de 2012)
38. Página web: Tesis; Oscar Sierra P., Introducción de 90 variedades de *Leucaena leucocephala* (C. Lam) De Wit a las condiciones del CATIE. Universidad de Costa Rica. 1979, pág. 14
<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6911E/A6911E.PDF> (consultada en Febrero 2013)
39. Rincón M., Domínguez-Bello M., Lovera M. y Romero R., 2000. Degradación de piridinedioles tóxicos derivados de la mimosina por bacterias rumiales: I. Aspectos microbiológicos. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol. X, No. 3. Caracas. Págs. 222-232.
40. Saavedra C., Rodríguez N. y Sousa N., 1987. Producción de forraje, valor nutritivo y consumo de *Leucaena leucocephala*. Pasturas Tropi. 9 (2), 6-10.
41. Shibamoto T. y Bjeldanes L., 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza. Págs. 73,74, 76,77.
42. Van Genderen, H., 1997. Adverse effects of naturally occurring nonnutritive substances. In: Food Safety and Toxicity. De Vries, J. (Ed.). CRC Press. Boca Raton, pp. 147-162.
43. Villanueva J., Herrera F. y Plascencia R., 2010. Leguminosas Forrajeras: Un recurso sustentable para el trópico mexicano. INIFAP, México D.F., Págs. 26, 30.