

Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

ESTUDIO DE ALGUNAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS DEL DESIERTO DE SONORA. FACTORES ANTINUTRICIONALES Y CALIDAD DE SUS PROTEINAS Y ACEITES

ESTUDIO DE ALGUNAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS DEL DESIERTO DE SONORA. FACTORES
ANTINUTRICIONALES Y CALIDAD DE SUS PROTEINAS Y ACEITES

Por

MARIA MAGDALENA ORTEGA NIEBLAS

MARIA MAGDALENA ORTEGA NIEBLAS

Tesis

ESTUDIO DE ALGUNAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS DEL DESIERTO DE SONORA. FACTORES ANTINUTRICIONALES Y CALIDAD DE SUS PROTEINAS Y ACEITES

Por MARIA MAGDALENA ORTEGA NIEBLAS

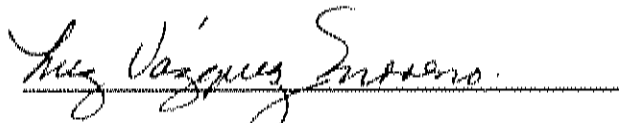
Presentada al Comité de Examen de Tesis del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

En Hermosillo, Sonora, a los 15 días del mes de Mayo del año 1993.

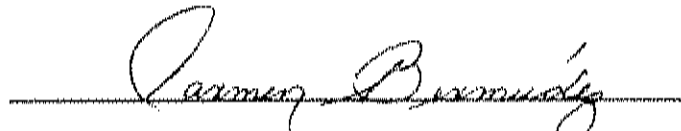
ESF>[C1/LI]/[] [Vj 1)l)fl:1 C 1)1M \ (/L,lrvilE•r\J1()S

APROBACION

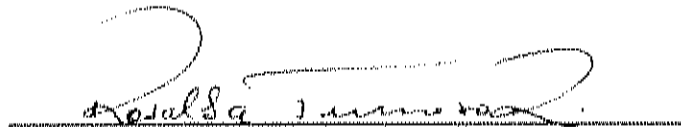
Los miembros del comité designado por revisar la tesis de María Magdalena Ortega Nieblas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Nutrición y Alimentos.



Dra. Luz Vázquez Moreno
Directora de Tesis



M.C. María del Carmen Bermúdez A.

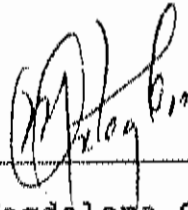


M.C. Rosalba Troncoso Rojas

DECLARACION DEL AUTOR

Se permite citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando de dé el crédito correspondiente. Para citas y consultas mas amplias o para la reproducción integra de este documento con fines académicos, se podrá solicitar permiso al Director del Centro o al Jefe del Departamento de Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. Hermosillo, Sonora. México. Bajo cualquier otra circunstancia, se deberá solicitar permiso al autor.

Firmado



María Magdalena Ortega Nieblas

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se hizo posible gracias al apoyo financiero del Centro de Investigación Científica y Tecnológicas (CICTUS). Asimismo, quiero agradecer a la Universidad de Sonora por haberme facilitado una beca y al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, quien me facilitó el material y equipo necesario para la realización de este estudio.

De manera muy especial, con afecto y respeto, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Luz Vázquez Moreno, por su ayuda y apoyo total durante mi desarrollo en este Centro de Investigación, y particularmente en la realización de este trabajo, brindandome un ambiente de confianza, armonía, respeto e independecia, aunado a su valiosa asesoría, haciendo que ésta llegará a ser realidad. Gracias por enseñarme un poco de su sabiduría.

Con aprecio a la M.C. María del Carmen Bermúdez y la M.C. Rosalba Troncoso, por su asesoría y aportaciones durante la elaboración de este manuscrito.

Agradezco al Dr. Alejandro Castellanos, por su apoyo e interés en la realización de este estudio. A mis amigos y compañeros, Biol. Rigoberto López e Ing. Rubén A. Corella, por su ayuda y apoyo moral.

Con afecto, a todas las personas que de una u otra forma me ayudaron en esta etapa de mi vida profesional.

A Marisa y Héctor por su ayuda incondicional.

/

DEDICATORIAS

.... A la memoria de mi padre.

.... A mi madre Doña Malena, con todo mi amor y profundo
cariño.

.... A mis Hermanos por su apoyo y comprensión.

.... A Doña Chole, Mercedes y Armida por sus
oraciones.

.... A Refugio Robles por su amistad y
apoyo.

A mis compañeros de generación 88-90.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCION.....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
Importancia de las Leguminosas en Dieta..	3
Leguminosas que se Consumen Comunmente...	4
Distribución y Descripción Protéica de Semillas Leguminosas.....	6
Usos de las Proteínas de Leguminosas en la Alimentación.....	7
Usos de Leguminosas Silvestres en la Alimentación.....	9
Usos de Aceites Vegetales.....	11
Domesticación de Especies Silvestres de Leguminosa.....	12
Comparación de Costos de Producción de Leguminosas Comunes con Silvestres.....	13
Variación en el Contenido de Aceite y Proteína de Semilla Leguminosas.....	14
Distribución y Descripción Botánica de las Semillas Silvestres Estudiadas.....	16
CAPITULO 1	
COMPOSICION Y CALIDAD PROTEICA DE ALGUNAS LEGUMINOSAS DEL DESIERTO SONORENSE.....	23
Introducción.....	23
Materiales y Métodos.....	30
Resultados y Discusión.....	36

CONTENIDO (continuación)

	Página
CAPITULO 2	
FACTORES ANTINUTRICIONALES EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS SILVESTRES DEL DESIERTO SONORENSE	47
Introducción.....	47
Materiales y Métodos.....	58
Resultados y Discusión.....	63
CAPITULO 3	
CARACTERIZACION DE LOS ACEITES DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS DEL DESIERTO SONORENSE.....	81
Introducción.....	81
Materiales y Métodos.....	85
Resultados y Discusión.....	89
CONCLUSIONES.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	102

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
1	Composición Química de Leguminosas que Comunmente se Consumen.....	5
1.1	Análisis Químico en Semillas de Plantas Silvestres.....	37
1.2	Digestibilidad <u>in vitro</u> en semillas de Leguminosas.....	40
1.3	Contenido de Aminoácidos Esenciales en las Semillas Silvestres.....	42
2.1	Factores Antifisiológicos en Semillas de Plantas Silvestres del Desierto de Sonora	65
2.2	Especificidad Química de la Lectinas de palo verde y de palo fierro.....	68
2.3	Extracción y Purificación de las Lectinas de palo verde y palo fierro en Minileak-fetuína.....	72
2.4	Extracción y Purificación de las Lectinas de palo verde en Minileak-Nacetil galactosamina.....	75
3.1	Análisis Fisicoquímicos de los Aceites...	90
3.2	Composición de Acidos Grasos de los Aceites	92
3.3	Composición Total de Acidos Grasos Saturados e Insaturados.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de las Especies en el Estado de Sonora.....	18
1.1	Perfil de Aminoácidos de la Semilla de gatuña.....	44
1.2	Perfil de Aminoácidos de la Semilla de huizache.....	44
1.3	Perfil de Aminoácido de la Semilla de palo verde 1.....	45
1.4	Perfil de Aminoácido de la Semilla de palo verde 2.....	45
1.5	Perfil de Aminoácido de la Semilla de brea.....	46
1.6	Perfil de Aminoácido de la Semilla de palo fierro.....	46
2.1	Cromatograma de Purificación de las Lectinas de <u>Parkinsonia aculeata</u> (palo verde) por Cromatografía de Afinidad en Minileak-fetuína.....	70
2.2	Cromatograma de Purificación de las Lectinas de <u>Olneya tesota</u> (palo fierro) por Cromatografía de Afinidad en Minileak-fetuína.....	71
2.3	Cromatograma de Purificación de las Lectinas de <u>Parkinsonia aculeata</u> (palo verde) por Cromatografía de Afinidad en Minileak-Nacetil galactosamina.....	74
2.4	Patrón Electroforético de las Lectinas de palo verde Salino en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras.....	78
2.5	Patrón Electroforético de las Lectinas de palo verde Salino en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras.....	79

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
2.6	Patrón Electroforético de las Lectinas de palo fierro Salino en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras.....	80
3.1	Cromatograma del Aceite de <u>Mimosa grahamii</u> (gatuña).....	96
3.2	Cromatograma del Aceite de <u>Olneya tesota</u> (palo fierro).....	96
3.3	Cromatograma de Aceite <u>Cercidium microphyllum</u> (palo verde 1).....	97
3.4	Cromatograma del Aceite de <u>Acacia farnesiana</u> (huizache).....	97
3.5	Cromatograma del Aceite de <u>Parkinsonia aculeata</u> (palo verde 2).....	98
3.6	Cromatograma del Aceite de <u>Cercidium sonora</u> (brea).....	98
3.7	Cromatograma del Aceite de <u>Prosopis juliflora</u> (mezquite).....	99

RESUMEN

El Desierto de Sonora cuenta con una gran variedad de plantas silvestres con potencial alimenticio, de las cuales se tiene poca información, por lo que se seleccionaron y estudiaron las siguientes semillas *Acacia farnesiana* (huizache), *Mimosa grahamii* (gatuña), *Cercidium microphyllum* (palo verde 1), *Cercidium sonoarae* (brea), *Parkinsonia aculeata* (palo verde 2), *Olneya tesota* (palo fierro) y *Prosopis juliflora* (mezquite). A las harinas previamente desgrasadas se les determinó proteína, cenizas, fibra cruda y grasa cruda, así como la digestibilidad in vitro de la proteína utilizando un método multienzimático. La proteína se hidrolizó con ácido clorhídrico y con hidróxido de sodio para la obtención de sus aminoácidos indispensables. El C-PER se calculó en base a los aminoácidos esenciales y la digestibilidad in vitro. También a cada una de las harinas se les determinó los factores antifisiológicos como fenoles, alcaloides, saponinas, inhibidores de tripsina y lectinas. A los aceites recuperados se les evaluaron índices de calidad y la cuantificación de los ácidos grasos se obtuvo por cromatografía de gases. Las harinas desgrasadas presentaron valores de proteína del 19.5 a 30.1 % ; la mayor concentración se obtuvo en la semilla de gatuña. Se encontró deficiencia en los aminoácidos azufrados, en cambio se obtuvo lisina y fenilalanina en alta concentración.

La digestibilidad **in vitro** de las proteínas de las semillas varió en un rango de 73 a 84%, con un ligero incremento al someter las semillas a un tratamiento térmico. El e-FER fue de 1,8 a 2,1, La presencia de inhibidores de tripsina varió entre 50 y 70 UTI encontrándose relativamente alto en todas las semillas con excepción de la de gatuña. También se detectó la presencia de lectina y de alcaloides en la mayoría de las harinas, las de hui. zache y palo fierro presentaron saponinas. Las lectinas de palo verde y de palo fierro fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una matriz de fetuina obteniéndose para palo verde una lectina con dos subunidades de 66 y 45 kDa, y en palo fierro se obtuvieron dos lectinas diferentes; una de 97 kDa y 66 kDa de peso molecular. El contenido de aceite fue del 8 al 23 %, la mayor concentración correspondió a la semilla de gatuña. se obtuvieron bajos los índices de acidez, peróxidos y ácidos grasos libres, lo que es indicativo de aceites estables, Todos los aceites mostraron un alto grado de insaturación, de 86 a 871, cuyo índice de iodo fue de 101 a 136, en el aceite de gatuña el valor fue de 147. En la composición de los ácidos grasos predominó el linoléico y como ácido saturado el palmitico. En todos los aceites, el linolénico y erucico estuvieron en bajas concentraciones. De las semillas estudiadas se considera a la de gatuña con los mejores atributos de calidad y con potencial alimenticio.

INTRODUCCION

Alrededor de dos terceras partes de la población infantil del mundo, principalmente en Asia, Africa y América Latina, sufren desnutrición. Sin embargo, muchos países de estas áreas cuentan con iguales o mayores recursos naturales que los países desarrollados.

La desnutrición se debe principalmente a una deficiencia de proteínas de buena calidad. Este problema ha originado cambios dentro de la investigación, es decir, principalmente se ha dirigido hacia el mejoramiento en la producción de alimentos básicos, así como a la búsqueda de nuevas fuentes alimentarias (Sotelo, 1981), que de una u otra forma mejoren la situación nutricia existente en estos países.

En la actualidad existen 13,000 especies de leguminosas silvestres distribuidas por todo el mundo. México cuenta con alrededor de 1,500 especies de leguminosas localizadas en diferentes regiones con clima y vegetación muy variada. Estas plantas pueden constituir una fuente abundante de aceite y proteína.

El desierto sonorense tiene una flora aproximada de 2,500 especies de plantas superiores de las cuales 450 especies han sido utilizadas como alimento por los nativos de esta región. De éstas, mas de 375 son nativas del desierto sonorense y 75 adaptadas o naturalizadas. Se considera que el 10 % de las 375

especies pueden ser empleadas para mejorar los recursos de alimentación de la región y en el país (Felger y Nabhan, 1978).

Existe una gran reserva de proteínas y aceites provenientes de semillas silvestres, cuya composición química aún no se conoce, como son los siguientes géneros de leguminosas: *Acacia*, *Cercidium*, *Parkinsonia*, *Mimosa*, *Olneya* y *Prosopis*; estos géneros no necesitan de una gran cantidad de agua, energía, y minerales para tener el máximo de productividad. Además considerando la creciente demanda de aceite y proteína que necesita el país, se ha visto la necesidad de buscar nuevas fuentes no convencionales de alimentos.

Una alternativa sería aprovechar los recursos naturales, empleando semillas silvestres, por lo que se consideró importante en este trabajo estudiar la calidad proteica y del aceite de las semillas de *Acacia farnesiana* (huizache), *Cercidium microphyllum* (palo verde 1), *Parkinsonia aculeata* (palo verde 2), *Cercidium sonora* (brea), *Mimosa grahamii* (gatuña), *Olneya tesota* (palo fierro) y *Prosopis juliflora* (mezquite).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Importancia de las Leguminosas en la Dieta

De las miles de especies de leguminosas conocidas, menos de veinte son usadas extensamente. Las de mayor uso incluyen el cacahuete (Arachis hipogaea), la soya (Glycine max), el chícharo (Pisium sativum), la lenteja (Lentilus esculenta), haba (Vicia faba), el garbanzo (Cicer arietinum) y el frijol (Phaseolus vulgaris). Por sus cultivos y la gran variedad de productos que pueden elaborarse, las leguminosas son alimento básico para el hombre. Estas contribuyen mas que otro tipo de alimentos en el aporte calórico y protéico, especialmente en los países en desarrollo en donde aportan un 40% de las proteínas consumidas, contra un 30% en los países desarrollados (Barclay y Earle, 1974).

En México, la ingesta de leguminosas ha variado con el tiempo, y es difícil conocer la dinámica del cambio en los hábitos de consumo (Penella, 1988). En el Estado de Sonora, el frijol comun (Phaseolus vulgaris) es la leguminosa que actualmente presenta mayor consumo (Elias, et al, 1976).

Leguminosas que se Consumen Comunmente

Desde hace bastante tiempo, se conoce la importancia de los granos de leguminosas como fuente de proteína. Sin embargo, el deseo de incrementar su producción y uso en la alimentación humana, y el de conocer más a fondo sus limitaciones nutritivas, así como el de aumentar su utilización industrial, son aspectos de interés más recientes.

Se sabe también, que en la dieta del poblador Centroamericano, desde hace mucho tiempo las leguminosas y particularmente el Frijol común, ocupa el segundo lugar como fuente de proteína después de los cereales (Elias, et al, 1976). Las especies de leguminosas que son mayormente consumidas, se muestran en el Cuadro 1, observándose que el contenido de proteína varía de 19.3 a 31.8 % excepto para soya, que su contenido proteico es más alto. El contenido de grasa es similar entre ellos excepto para soya y cacahuete que contienen los porcentajes mas altos. Los ácidos grasos que predominan son los insaturados, entre los que se encuentran el oléico, linoléico y linolénico. También contienen ácidos grasos saturados como el palmítico (Mc Farlane, 1977). El contenido de ceniza varía de 2.4 a 5.3 %. Se ha encontrado que el fósforo predomina sobre el calcio, también la riqueza en hierro es una característica muy importante en estas leguminosas (Hernández y Bourges, 1987). Los valores de

Cuadro 1. Composición química de las leguminosas que comunmente se consumen.

Semillas	Proteína %	Grasa %	Ceniza %	F.C ^a %	CHO* %
<u>P vulgaris</u> Frijol común	20.9	1.5	4.3	5.1	68
<u>C arietinum</u> Garbanzo	20.1	6.6	3.5	5.6	71
<u>L esculenta</u> Lenteja	29.6	3.1	2.4	3.2	62
<u>P sativium</u> Chicharo	19.3	3.2	4.0	5.5	68
<u>G max</u> Soya	37.3	18.7	5.3	5.8	33
<u>V faba</u> Haba	31.8	0.9	3.6	8.5	55
<u>A hipogae</u> Cacahuate	30.0	50.0	3.1	3.0	14

Fuente: Antunez, 1980; Hernández y Bourges, 1987.

a: Fibra Cruda.

* Carbohidratos por diferencia.

carbohidratos que presentan mayor diferencia son para soya y cacahuete, y se encuentran en un rango de 14 a 33 %, y la fibra cruda no presenta mayor variación.

Distribución y Descripción Protéica de las Semillas Leguminosas

La familia de las leguminosas comprende cerca de 650 géneros y mas de 18,000 especies. Forman la tercera familia mas numerosa entre las fanerógamas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial, tanto en climas templados como en trópicos, en zonas áridas, en las montañas o en las tierras bajas y hasta en el medio acuático. Son encontradas en su forma de enredaderas, arbustos o árbol (Bourges, 1987).

La proteína en especies comestibles de granos de leguminosas, está localizada en los cotiledones y axis embriónico, solo pequeñas cantidades están presentes en la cubierta de la semilla. Los cotiledones contienen cerca del 27 % de la proteína, entre las que predominan principalmente las globulinas solubles en soluciones salinas diluidas, y muchas de ellas han mostrado ser resistentes a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (Bressani, 1975).

La mayor parte de los carbohidratos se encuentra en los cotiledones de las leguminosas compuestos por almidón, pentosas, dextrinas, sacarosas y gomas. En las leguminosas se

encuentra un número de cuatro oligosacáridos no reductores, tres de los cuales han sido identificados como rafinosa, estaquiosa y verbascosa, mismos que pertenecen a la familia de la rafinosa y contienen uniones 1-6 galactosa que son indigeribles por las enzimas de los mamíferos (Aman, 1977).

Las leguminosas son deficientes en carotenos, riboflavina, ácido nicotínico y vitamina C, pero son ricas en tiamina. Algunos reportes indican que esas vitaminas se encuentran en más alta concentración en el germen que en los cotiledones (Bressani y Elías, 1979).

Usos de las Proteínas de Leguminosas en la Alimentación

Los granos y sus productos son una fuente que provee algunos de los nutrientes necesarios para el hombre. En aquellos Países donde la disponibilidad de productos animales es baja, los granos tienen un lugar muy importante en la dieta, debido a su aporte en proteínas y cantidades considerables de vitaminas y minerales que ayudan en cierta medida a combatir la mala nutrición.

Los granos de leguminosas representan una parte importante en el aporte protéico en la mayoría de la población y, desde hace bastante tiempo, han sido consumidas por el ser humano complementando su alimentación junto con algunos cereales como lo son el trigo y el maíz. Cuando ambos granos

son consumidos en la proporción adecuada, la calidad de la proteína en la dieta es más alta (Canett y Valenzuela, 1984).

Las proteínas se emplean en muchos alimentos por su capacidad emulsionante, debido a su facilidad de formar estructuras lipoproteicas muy estables; el uso de caseinato y derivados de Soya en la manufactura de embutidos cárnicos ha aumentado considerablemente debido a que estas proteínas tienen la capacidad de actuar como emulsionante. Cada tipo de proteína tiene diferente capacidad emulsionante, que depende en gran medida del balance de aminoácidos que contenga (Badui, 1986)

Las leguminosas no se utilizan únicamente dentro de la alimentación humana, sino que también son excelentes forrajes para la alimentación animal. Son utilizadas como colorantes naturales, como gomas de amplio uso en la industria, como materia prima para la industria química y farmacéutica (reactivos, laxantes, esteroides, materiales aislantes y lubricantes, entre otros). Por lo general se puede aprovechar toda la planta como alimento, es, decir, la semilla seca, la vaina inmadura, los tallos, las flores y las raíces como en el caso de la jícama (Bourges, 1987).

El hecho de que las leguminosas tengan la propiedad de poder utilizar el nitrógeno fijado por las bacterias del suelo del género *Rhizobium*, les permite la facultad de sintetizar aminoácidos, así como el poder acumular una gran cantidad de

proteínas sin necesidad de obtenerla a partir del uso de fertilizantes. Siendo así, las leguminosas son una buena fuente de proteína, que contienen alrededor de 19 a 37 % superior al encontrado en cereales 5-12 % y en verduras, tubérculos y helechos que contribuyen solo con 0.5-3 % (Bidwell, 1987).

Usos de Leguminosas Silvestres en la Alimentación

Existe una gran densidad de plantas alimenticias que se han desarrollado en ambiente natural árido y que durante miles de años, han constituido la base para la subsistencia de los grupos étnicos en los desiertos. Así, en el desierto de Sonora, en el suroeste de América del Norte, y norte de México se cuenta con 375 especies de plantas alimenticias silvestres. Los nativos de la región utilizaban un 40 % de esas especies como alimento básico, siendo las de mayor consumo: las semillas de cardón, raíz y semilla de calabacilla, la semilla del mezquite, el frijol tepari, semilla de uña de gato y la semilla de zosteria marina, entre otras. Todas ricas en aceite y proteína (Felger y Nabhan, 1976).

Desde tiempos prehistóricos hasta años recientes, el mezquite y el palo fierro han servido a los pueblos nativos del suroeste de los Estados Unidos, como una fuente primaria de alimento, combustible, abrigo, armas, fibra, cosméticos,

tintura, entre otros. Del mezquite, sus vainas secas eran trituradas para hacer harina, la cual era luego tamizada para eliminar la parte fibrosa; la harina se consumía como pinole, se preparaban panecillos ó bien se hacía atole; con la fermentación de una mezcla de harina, con las semillas y agua fría, preparaban una bebida parecida a la cerveza (Langford, 1969). La vaina del mezquite es muy apetecida por el ganado. El mesocarpio contiene de 13-36 % de azúcares (principalmente sacarosa) mientras que el endospermo de la semilla posee de 55-69 % de proteínas, 8 % de grasa así como de diversos minerales, lo cual la hace de un valor nutritivo superior al frijol y chícharos y equiparable a la soya, cebada y el maíz. Dado que las proteínas son deficientes en metionina y cisteína, la harina de mezquite debe combinarse con otros alimentos como la alfalfa y el trigo, para balancear la dieta de los animales (Miranda, 1978).

En México y Centro América se conocen varios usos de la semilla de mezquite, en alimentos como, pasteles preparados de la harina, llamados "mezquitamal", que se consumen como dulces debido a su alto contenido de azúcar. También es usado el grano para preparación de varias bebidas fermentadas (Del Valle *et al.*, 1983). Estudios recientes demuestran que las plantas silvestres pueden multiplicar al máximo la energía alimentaria existente en sus semillas y raíces, esto debido a que estas plantas desérticas pueden transformar un mayor

porcentaje de energía en productividad de la semilla (Felger y Nabhan, 1976).

Usos de los Aceites Vegetales

Todas las grasas del reino vegetal son líquidas (aceites) a temperatura ambiente. Los aceites provenientes de semillas generalmente se extraen para emplearse como aceites puros de cocina y con otros fines. La mayor parte de ellos poseen una proporción alta de ácido linoléico, los aceites de oliva y cacahuete son las excepciones porque contienen más ácido oléico que los demás aceites para ensaladas y para cocinar.

Las margarinas y las grasas para cocinar suelen fabricarse de aceites de verduras (aguacates y aceitunas), aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de frijol soya y del maíz (Anderson, et al, 1985).

El aceite de soya es un aceite que en su estado refinado, blanqueado y desodorizado es utilizado en su forma natural para ensaladas y, en su forma hidrogenada puede ser utilizado como: manteca para freír, manteca especial para pastelería la cual además de ser hidrogenada contiene 20 a 30 % de humedad y de 2 a 3% de monoglicéridos de dureza intermedia, esta manteca también sirve para bizcochos, en los que la sequedad o la humedad pueden controlarse ajustando el nivel de aceite líquido que se agrega (Erickson, 1990). Los aceites como el

de soya, cártamo, girasol, ajonjolí, cacahuete, maíz, oliva, coco, colza, entre otros pueden refinarse bien con bajas pérdidas y una vez refinados y blanqueados con técnicas óptimas se convierten en unos aceites fácil de hidrogenar, de los cuales se fabrican una gran variedad de productos.

En los aceites con alto contenido de ácido linolénico, como el de soya y colza aparte de ser aceites comestibles son usados también para barniz de muebles (Baileys, 1979).

Domesticación de Especies Silvestres Leguminosas

El frijol tépari Phaseolus acutifolius ó frijol del desierto, presenta una mayor capacidad de producción en Zonas áridas y Semiáridas donde el frijol común no se desarrolla adecuadamente (Thomas et al, 1983). Las variedades silvestres del frijol tépari son plantas rastreras de 2 a 3 m. de altura, sus semillas germinan después de las lluvias, frecuentemente se trepan a los arbustos.

El cultivo del frijol tépari en México tanto en su forma silvestre como la ya domesticada se da desde hace 5000 años (Nabhan, 1978). El frijol tépari alcanza una producción mayor que la del frijol común, obteniéndose hasta 1600 Kg/ha del tepari, en tanto que para el frijol común se obtienen 933 Kg/ha (Kumar, 1954). En el Estado de Sonora, en las regiones de Imuris, Unamichi, Bacuachi, Sinoquipe, Huepac y Campo San

Carlos se obtienen cosechas de frijol tépari de semilla blanca y café.

Por otro lado, se ha recomendado el cultivo y el mejoramiento del mezquite como el árbol forrajero por algunos autores. La productividad del Mezquite silvestre es alta, calculándose en más de 1000 Kg de vaina por hectárea, en una densidad de 200 árboles por hectárea (Felger y Nabhan, 1978). En Brasil bajo condiciones de cultivo, se ha logrado una producción de 4000 Kg/ha de esta especie sujetos a manejo de tipo hortícola (Figueredo, 1990).

Comparación de Costos de Producción de Leguminosas Comunes con Silvestres

Al sembrar una leguminosa como el frijol se requiere invertir un costo de \$ 3,050,000 por hectárea para algunas labores de cultivo ya establecidas como son: el barbecho, rastreo, empareje, surqueo, bordeo, semilla, siembra, fertilizantes, aplicación de fertilizante, cultivo mecánico, deshierbe manual, costo de agua, riego de presiembra, riego de auxilio, insecticidas y asistencia técnica (S.A.R.H., 1992).

Este cultivo tradicional tiene desventaja con un cultivo a nivel silvestre ya que este último no requiere de las labores mencionadas anteriormente, además de que es un cultivo que se produce solo, bajo sus condiciones ya establecidas como son la resistencia al ataque de insectos, a sequias, bacterias

y patógenos virales, soporta suelos de baja fertilidad y también es resistente a ciertas enfermedades que por lo general el cultivo del frijol común no soporta, lo que disminuye drásticamente su producción (Thomas y Waines, 1983).

Variación en el Contenido de Aceite y Proteína de Semillas Leguminosas

La composición química de las diferentes leguminosas varía ampliamente debido a que son influenciadas por factores como suelo, variedad, factores genéticos y condiciones ambientales (Pomeranz y Bechtel, 1978).

Desde el punto de vista bioquímico, las proteínas de las semillas leguminosas silvestres no se encuentran distribuidas uniformemente, ya que en base a su solubilidad se encontró que las globulinas, corresponden a más del 60 % de la proteína total, las glutelinas 17 %, albuminas 12 % y las prolaminas con 10 %. Estas variaciones son debido a las diferencias en su composición de aminoácidos (Duffus y Slaughter, 1985).

En la actualidad, son pocos los estudios sistemáticos relacionados con el nivel de proteínas y la composición de amino ácidos de semillas leguminosas silvestres.

Recientemente, Figueiredo (1990) al analizar semillas de mezquite de dos regiones silvestres, encontró variación en el porcentaje de proteína (36-39 %) y de aceite (5-7 %) de una región a otra en una misma especie. También obtuvo diferencias

en el contenido de aminoácidos, encontrándose alto contenido en lisina y deficiencia en metionina y cisteína. Esto es común con las leguminosas ya domesticadas.

Al analizar Sotelo (1981) las semillas de leguminosas silvestres, provenientes de habitat tropical, encontró en la semilla de mezquite 13.45 % de proteína y 2.08 % de grasa. En la semilla de huizache 25.15 % de proteína y de grasa 3.30 % y en la semilla de palo fierro su contenido de proteína fue de 31.54 % y de grasa 14.54 %. Los aminoácidos analizados en estas proteínas de fuente tropical fueron también deficientes en metionina y cisteína, y altos en lisina. En el estudio realizado por Earle y Jones (1960) al analizar varias semillas de la familia de acacias silvestres, encontraron un amplio rango de contenido de proteína en las diferentes especies obteniendo 21.3 % de proteína para la semilla de palo verde Cercidium microphyllum, y 6 % de grasa. Mientras que en el estudio realizado por Thorn et al., (1983) en semillas de palo verde obtuvieron 54 % de proteína y 15.7 % de grasa.

Nabhan, en (1980) al analizar muestras de frijol tepari silvestre, reportó un promedio de 23.3 a 25.4 % de proteína cruda.

En el estudio realizado por LLano y Gonzalez (1992) al analizar cuatro especies silvestres del Estado de Sonora, pertenecientes a la familia de leguminosae se obtuvieron 20.1 % de proteína y 8.9 % de aceite en la semilla de Parkinsonia

aculeata, en la semilla de Cercidium microphyllum encontraron 22.8 % de proteína y 18.1 % de aceite, en la especie de Acacia constricta 21.9 % de proteína y 10 % de aceite y en Prosopis grandulosa 44 % de proteína y 15.5 % de aceite respectivamente.

El contenido de proteína en la mayoría de las leguminosas silvestres que han sido estudiadas oscila entre 17 y el 30 %, y el aceite varía desde el 1 al 3 %, aunque hay algunas de ellas que aportan un gran porcentaje como las señaladas antes. Estos aceites son ricos en ácidos grasos esenciales. Las diferencias encontradas en la composición química son atribuidas al medio ambiente, a la presencia de sustancias tóxicas como saponinas, taninos, alcaloides, inhibidores de tripsina, lectinas, glucósidos cianogénicos y al tipo de suelo (Sotelo, 1981).

Distribución y Descripción Botánica de las Semillas Silvestres Estudiadas

Entre las leguminosas hay plantas de los más variados tipos y habitat, como hierbas, lianas, grandes árboles y arbustos. Son muy adaptables a todos los climas y altitudes, como los trópicos, regiones montañosas, subárticas y desérticas. El desierto Sonorense ocupa parte de los estados mexicanos de Sonora, Baja California Sur y Baja California y los Estados Norte Americanos de Arizona y California, se

extiende a través de las dos terceras partes de la porción alta de la cuenca del Golfo de California. Su altitud varía desde el nivel del mar hasta los 1,051 m y la precipitación, de 0 a 330 mm. El clima es relativamente uniforme con diferencias regionales determinadas por la elevación, la configuración y la latitud geográfica del área (Sheve y Wiggins, 1986).

La temperatura es mas consecuente que la precipitación, ya que las variaciones en el año son muy pequeñas, pueden producirse temperaturas máximas de 32°C ó mayores durante el mes de febrero y continuar hasta diciembre. No es raro que transcurran períodos de 90 días consecutivos con temperatura máxima de 38°C. La porción Mexicana del Desierto Sonorense ocupa 188,500 km² y en ella radica una población aproximada de 1.5 millones de habitantes. Se ha desarrollado allí una explotación agrícola comercial técnicamente avanzada, la cual dispone de 757,510 ha. (7.575 km²) destinadas al pastoreo para explotaciones ganaderas intensivas (Sheve y Wiggins, 1986).

Los géneros empleados para el presente estudio son: Parkinsonia, Acacia, Cercidium, Prosopis, Mimosa y Olneya. Las cuales se describen a continuación y su distribución al Noroeste de Estado de Sonora, se aprecia en la Figura 1.

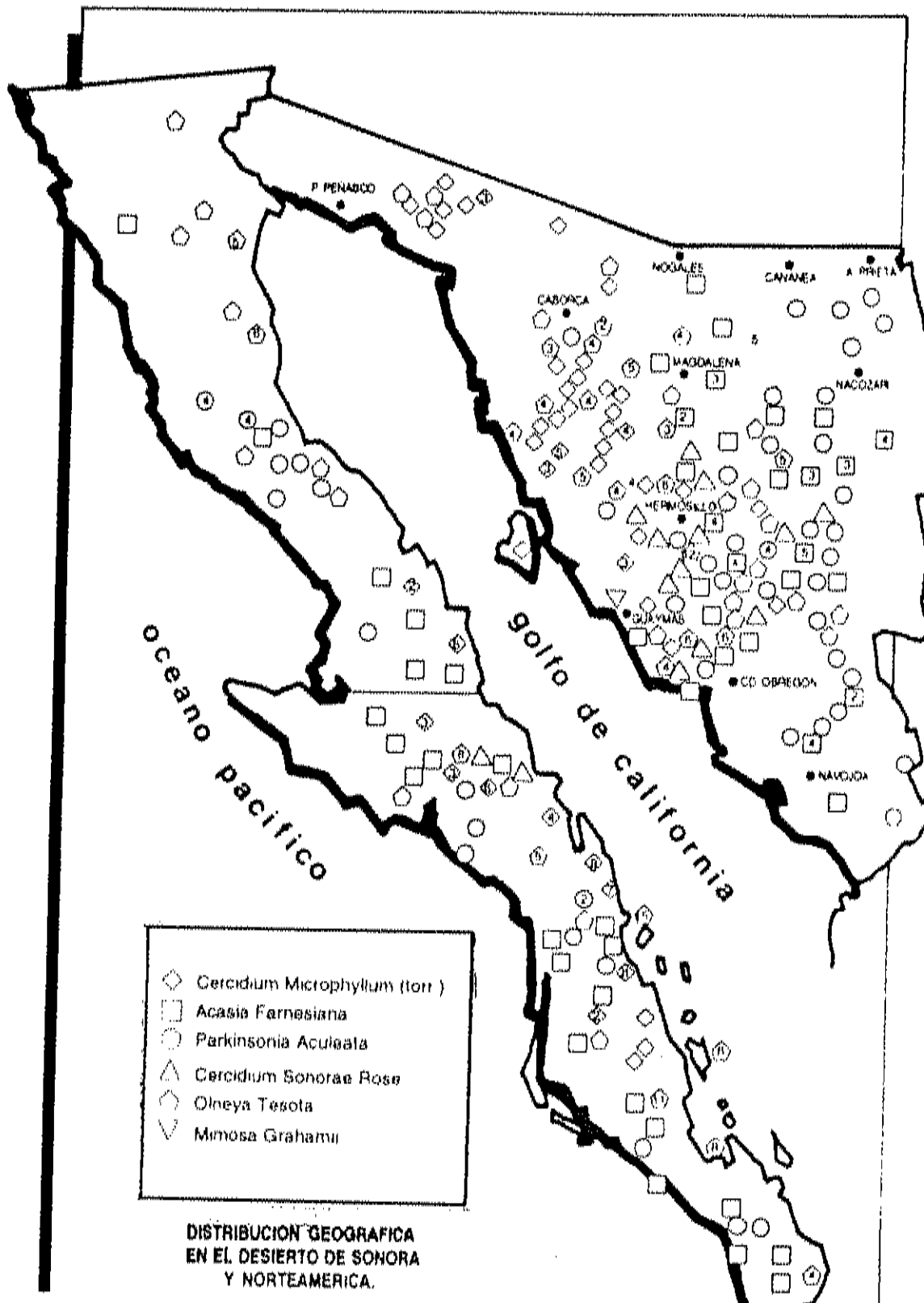


Figura 1. Distribución de las especies
en el Estado de Sonora.

Cercidium microphyllum (palo verde 1). Arbusto o árbol de la familia leguminosae. Se localiza en gran abundancia en México en los estados de Sonora y Baja California, en Estados Unidos de Norte América, en los estados de Colorado y California, así como en Venezuela y Perú (Shreve y Wiggins, 1986). Arbusto de 8 m. de alto, con ramas delgadas de color verde amarillosas, tiene de 4-6 pares de hojillas, anchas, elípticas de 1-2 mm de largo. Su periodo de floración y producción del fruto es en los meses de marzo a mayo. Las vainas son moniliformes de 4-8 cm de largo de color café, las semillas son ovoides de color verde, elípticas y tienen una longitud de 8-10 mm.

Parkinsonia aculeata (palo verde 2). Esta leguminosa es un árbol o arbusto localizado en México en gran abundancia. Se localiza alrededor de arroyos y en tierras arenosas, en zonas bajas del Estado de Sonora y zonas tropicales al sur de México (Shreve y Wiggins, 1986). Este arbusto llega a medir 12 m de altura, consta de ramas delgadas hacia abajo, se protege con espinas de 0.4-3 cm de largo, sus tallos son de color verde y sus hojas son cortas pecioladas. Las vainas son lineales y cilíndricas de 3-18 cm de largo, las semillas se encuentran estrechas longitudinalmente, son ovoides de 4-5 mm de diámetro, de 8-10 mm de largo, son lisas y brillantes de color verde combinadas con manchas café.

Cercidium sonorae (brea). Arbusto localizado en suelos áridos y en pendientes en la zona baja de Sonora, en la sercania de Magdalena Sonora, y en lugares planos al sur de Guaymas Sonora. Arbusto de madera fina de 6 a 8 m de alto, con ramas puberulentas y protegidas con espinas rectas de 5 a 15 mm de largo; con 4 a 6 pares de hojas redondeadas oblongadas de 1.5 a 2 mm. de ancho, tallo de color verde brillante encerados, las vainas son comprimidas de 7 a 8 mm. de ancho y de 4 a 7 cm de largo, con estrechamiento de semillas, por lo general contiene de 1 a 4 semillas lenticuladas oblangadas (Shreve y Wiggins, 1986).

Olneya tesota (palo fierro). Arbol de la familia leguminosae, es muy abundante en las partes del desierto de Sonora, al Suroeste de Hermosillo (región Seri), y al Sur de Sonora. Arbol de 8 m de altura, su corteza es dura y brillante, sus hojas son delgadas y verdes que pierde en tiempo de sequía o frios muy intensos. El fruto es una vaina pequeña indisciente, que contiene de dos a tres semillas, las cuales son de color negrusco, ovaladas de 8 mm de largo, con apariencia de enceradas. La madera externa es de color amarillo claro con un espesor de 2 a 4 cm, la madera del centro es café oscuro y es extremadamente dura (Shreve y Wiggins, 1986).

Acacia farnesiana (huizache). Arbusto de la familia leguminosae localizado en México en las zonas bajas del Estado de Sonora, Hidalgo, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas y en Baja California. Así como en el condado de Pima, Arizona, en el Estado de Florida y al sur del continente hasta Argentina (Shreve y Wiggins, 1986). El árbol llega a medir 9 m de alto, con ramas puberulentas de color gris, espinas rectas estipuladas de 0.5 a 5 cm de largo, de 8 a 25 pares de hojillas de forma lineal a oblongadas de 2 a 6 mm de largo. Las vainas son redondas y turgentes de 4 a 7 cm de largo y 1.5 cm de diámetro, son finamente venoreticuladas, y su semilla es de color negro de 8 a 10 mm de largo.

Mimosa grahamii (gatuña). Leguminosa que se encuentra en las pendientes rocosas y cañadas, pero sobre todo en las partes más altas de la región de Sonora, y los condados de Pima y Santa Cruz, del Estado de Arizona y Sureste de Nuevo México (Shreve y Wiggins, 1986). Es un arbusto de 7 m de altura, con espinas rígidas y cortas de 6 a 8 pares, las hojas son oblongadas de ápice agudo ó redondeado de 4 a 6 mm de largo; las vainas son oblongadas y redondeadas hasta el ápice de 7 a 9 mm de ancho y de 3 a 4.5 cm de largo. Las semillas son de color gris, ovoides y planas de 5 a 7 mm de ancho y de 3 a 7 cm de largo, con centro negrusco.

Prosopis juliflora (mezquite). Leguminosa que se encuentra distribuida en gran abundancia en el desierto de los Estados de Baja California, Chihuahua y Sonora, y al sur de los Estados Unidos de Norte América (Estados de California, Colorado, Utah y Texas) (Shreve y Wiggins, 1986). Es un árbol de 8 a 12 m altura, está adaptada a suelos áridos y resistentes a sequía, como todas las especies anteriores, con hojas bipinnadas, su corteza es dura, su fruto es una vaina que mide alrededor de 20 cm de largo y de 8 mm de ancho de color amarillo, sus semillas son comprimidas de 8 a 10 mm de largo, oblangadas (Signoret, 1970).

CAPITULO 1

COMPOSICION Y CALIDAD PROTEICA DE ALGUNAS LEGUMINOSAS DEL DESIERTO SONORENSE

Introducción

Las leguminosas forman un grupo dietético muy importante por la calidad y cantidad de los nutrientes que contienen, de manera particular por las proteínas y aminoácidos esenciales que les dan un valor intermedio entre los alimentos de origen animal (de alto valor biológico) y los cereales (de bajo valor). El valor biológico intermedio de las leguminosas se debe en gran parte a que su contenido de aminoácidos azufrados es bajo (Mc Farlane, 1975).

La calidad nutricional de una proteína está determinada por la cantidad, disponibilidad y la proporción de los aminoácidos esenciales y la presencia de aminoácidos no esenciales, para su óptima utilización. El concepto de calidad proteica puede ser aplicable para proteínas individuales, así como también para mezclas de proteínas. A pesar de la importancia de las proteínas, el concepto de calidad proteica nutricional no fue totalmente reconocido, hasta que se demostró que la calidad de la proteína del maíz (zeína) podía mejorarse por la adición de triptófano (Satterlee et al; 1981).

Existen diferentes métodos para evaluar la calidad de una proteína, la medida de respuesta más común es in vivo ó biológico, con animales de experimentación, que ha sido definida como la razón de eficiencia proteica (PER), la cual mide el peso ganado por gramo de proteína consumida. Este método fue desarrollado por Osborne y Mendel en (1919), y posteriormente fue tomado como método oficial de A.O.A.C.(1984), pero debido a las desventajas de este método ya que no toma en cuenta la proteína necesaria para mantenimiento, lo cual no es función directa del valor nutritivo de la proteína y puede estar influenciado por varios factores, que son: aumento de peso, alimento y niveles de proteína.

Agregando que es difícil establecer comparaciones entre los valores obtenidos del PER para una misma proteína en diferentes laboratorios, ya que las condiciones en que se efectúa un experimento en un laboratorio son difíciles de reproducir en otro (Hegsted y Chang, 1965). Además es un método que requiere de 28 días para su ejecución por estas razones se han preferido otras pruebas biológicas mas cortas tal como, razón neta de proteína (NPR), el cuál relaciona la alteración del peso en comparación al de las ratas con dieta libre de nitrógeno.

La utilización neta de proteína(NPU), es el nitrógeno retenido como una proporción de nitrógeno consumido y el valor

biológico(VB), el cual es otra medida del balance de nitrógeno (Barrón, 1984).

Debido a inconformidades de parte de los investigadores, así como de los inconvenientes reportados por las industrias, referentes a la aplicación de bioensayos en la regulación de alimentos, surgió un gran interés por ensayos rápidos que permitieran la determinación de la calidad de la proteína en alimentos e ingredientes durante el procesado, ensayos que reemplazaran al PER (Pellet, 1977). Los ensayos rápidos in vitro se han basado en la utilización de microorganismos (métodos biológicos), y perfil de aminoácidos (métodos químicos), así como también combinaciones de éstos (Satterlee et al; 1982). Los ensayos in vitro requieren de pequeñas cantidades de muestra y dan resultados sobre calidad proteica en periodos mas cortos que los ensayos biológicos (Hsu et al; 1977; Satterlee et al; 1982).

El C-PER es un ensayo rápido para determinar el valor nutritivo de la proteína, el cual puede utilizarse para propósitos de control de calidad (Satterlee, 1984). Es un método computarizado que fue obtenido por (Satterlee et al; 1977 y Hsu et al; 1978), quienes utilizaron los datos de digestibilidad de proteína in vitro junto con los de perfil de aminoácidos, para predecir el PER de aproximadamente 60 alimentos.

Las ventajas del C-PER en relación al PER, es que el primero de estos métodos produce información de la digestibilidad de proteína y del contenido de aminoácidos indispensables, el ensayo de digestibilidad es sensible a inhibidores de proteasas comunes los cuales pueden estar presentes en ingredientes alimenticios no tratados, como la harina de soya. Es un método oficial de la A.O.A.C (1984), es rápido y no se ve afectado por los siguientes factores: contenido de proteína menor de 10 %. El alto contenido de cenizas, grasa o fibra en el alimento hace difícil la formulación de la dieta para el animal, así como sabores, especias y aditivos alimenticios los cuales reducen el consumo de alimento (Satterlee, 1984). Las desventajas que este método presenta es que se realiza en base a alimentos comunes de la dieta estadounidense, los cuales tienen un PER que va desde 0.5 hasta 3.25, además no es sensible a otros antinutrientes, aparte de los inhibidores de proteasas y las proteínas alimenticias digeridas parcial o completamente tendrán una digestibilidad subestimada por el ensayo de digestibilidad in vitro (Satterlee, 1984).

Investigaciones realizadas por Fisher y Abderhalden en (1964), mostraron que los aminoácidos de las diferentes proteínas son liberados por la acción de las enzimas (digestión in vitro), en diferentes cantidades y en varios

porcentajes. Este fenómeno ha sido utilizado como ensayo para evaluar la disponibilidad de los aminoácidos.

Se han desarrollado varios métodos in vitro, para medir la digestibilidad de una proteína. Ford y Salter (1966) y Buchanan (1969), describieron un sistema in vitro para medir la digestibilidad proteica de un concentrado de crema de trigo, utilizando una digestión enzimática con papaína y los parámetros obtenidos estuvieron de acuerdo con resultados de los bioensayos en ratas.

Reinchart en 1975, examinó varios sistemas enzimáticos, los cuales incluyen combinaciones de tripsina, pepsina-tripsina, tripsina-quimotripsina y tripsina-quimotripsina-peptidasa. Los resultados fueron alentadores con coeficientes de correlación de 0.79-0.80 respectivamente. Hsu et al, (1977) desarrollaron un sistema multienzimático consistente de tripsina, quimotripsina y peptidasa para determinar digestibilidad proteica e hicieron una correlación entre parámetros in vitro y digestibilidad in vivo. Se estableció que la digestibilidad in vivo tuvo una alta correlación con la caída del pH a los 10 minutos después de la adición del sistema multienzimático.

Posteriormente, Satterlee et al, (1982) desarrollaron un sistema multienzimático, consistente de tripsina, quimotripsina, peptidasa y una proteasa bacteriana (Streptomyces griseus), para determinar la digestibilidad

proteica, la que relacionaron con la digestibilidad in vivo, obteniendo un alto índice de correlación. Este método tiende a subestimar el porcentaje de digestibilidad de alimentos con animales, pero provee una estimación más cercana a la digestibilidad in vivo que el ensayo con las tres enzimas de Hsu y colaboradores. Así, Hernández y Bourges (1983), encontraron que la digestibilidad de las leguminosas es de 50-93 % con un valor biológico de 35-80 %.

Patrón de aminoácidos. La determinación de aminoácidos tiene aplicación en una multitud de campos de investigación, como en bioquímica, ciencias biomédicas, nutrición y biotecnología entre otras (Zumwalt et al, 1986). El patrón de aminoácidos de una proteína es el factor más importante de su calidad nutricional mientras que la biodisponibilidad de estos aminoácidos constituye la segunda variable en importancia. Es importante considerar la necesidad nutricional de proteínas, particularmente aquellas que contienen aminoácidos esenciales para la dieta humana. En la actualidad se han desarrollado granos de alto contenido de proteína y balance de aminoácidos mejorados, así como productos alimenticios fortificados (Gonzalez, 1988; Almeida, 1988). Por lo tanto, la composición de aminoácidos es útil en la industria alimentaria, donde el análisis nutricional de alimentos para consumo humano y animal tiene importancia económica (Cohen et al, 1984).

La técnica para el análisis de aminoácidos, como lo es la cromatografía de intercambio iónico, presenta algunos inconvenientes, como son: tiempo prolongado, escaso funcionamiento cromatográfico de las columnas de intercambio iónico así como límites de detección inadecuados (Umagat et al, 1982).

Recientemente, se han desarrollado los procedimientos de cromatografía de gases formando un doble derivado de aminoácidos que los hace suficientemente volátiles para el análisis, pero la alta cantidad de muestra involucrada restringe el uso de esta técnica (Golan y Wolfe, 1979).

Sin embargo, para el análisis de aminoácidos en proteínas existe un parámetro más limitante el cual determina la precisión y exactitud con las cuales, la composición de aminoácidos puede ser determinada así como la rapidez y costo con que los datos pueden ser obtenidos; este parámetro limitante es la preparación del hidrolizado de la muestra para el método cromatográfico. El ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio, han emergido como los reactivos más ampliamente utilizados para la hidrólisis y alcalinidad de sustancias proteínicas, y las condiciones que se utilicen en este proceso son vitales en la determinación de la composición de aminoácidos (Zumwalt et al, 1986; Moore, 1972).

Desde hace muchos años los granos de leguminosas representan una parte importante en el aporte proteico, en particular en países subdesarrollados.

En la actualidad algunas de las leguminosas ya han sido evaluadas nutricionalmente, como son: el frijol, lentejas, chícharo, habas, soya y el garbanzo entre otras, las cuales forman parte de la dieta poblacional por ser alimentos nutritivos muy valiosos (Bourges, 1987). Por otra parte, debido a los pocos estudios sistemáticos sobre la calidad proteica en granos de leguminosa no convencionales es necesario realizar trabajos que generen información que conlleve a una óptima utilización de estos recursos, como fuente de alimento para consumo humano.

Por lo que el objetivo de esta primera parte del trabajo fue determinar la composición química de las semillas de siete especies silvestres y su calidad proteica, determinando la composición de aminoácidos y su digestibilidad in vitro.

Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó con siete plantas silvestres pertenecientes a la familia leguminosae: Acacia farnesiana, Cercidium microphyllum, Olneya tesota, Parkinsonia aculeata, Mimosa grahamii, Cercidium sonoreae y Prosopis juliflora.

La recolección de las vainas se realizó en bolsas de plástico, de una misma planta y en el mismo lugar por especie, muestreándose de diferentes partes de la planta (superior, inferior y alrededor de ella). Las vainas de las plantas se obtuvieron de diferentes municipios del Estado de Sonora. La Mimosa grahamii y Cercidium sonorae se recolectaron del municipio de Obregón Sonora, en la carretera Esperanza-Tezopaco en el km 103. Las especies de Parkinsonia aculeata, Cercidium microphyllum y Olneya tesota se recolectaron al sur del municipio de Hermosillo Sonora, carretera Guaymas km 257, mientras que las especies de Acacia farnesiana y Prosopis juliflora se obtuvieron al suroeste de Hermosillo, carretera la Colorada km 526.

Separación y extracción

La separación de las semillas de los frutos o vainas se efectuó manualmente. La molienda se llevó a cabo en un molino Wiley utilizando una malla No.20; posteriormente se extrajo la grasa durante 6-8 h con hexano en un equipo Soxhlet, obteniéndose la pasta residual de cada una de las semillas. Tanto la extracción como cada uno de los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis proximal

Proteína. Se llevó a cabo de acuerdo al método estandar microkjeldahl, según la técnica No.960.52 del A.O.A.C.(1990) utilizando 1 mg de muestra seca. Para obtener el porcentaje de proteína cruda se multiplicó el valor de nitrógeno por el factor 6.25. El digestor y destilador corresponden a la marca LABCONCO.

Grasa cruda. El contenido de grasa de las harinas se determinó por extracción con hexano como solvente, durante 8 h utilizando el método intermitente de Soxhlet, según la técnica No.920.39 de A.O.A.C.(1990), con un aparato marca Lab-line multiunit extraction heater.

Fibra cruda. La determinación se realizó de acuerdo a la técnica No.962.09 de A.O.A.C.(1990) empleándose un digestor de fibra cruda LABCONCO.

Cenizas. La fracción inorgánica se determinó según la técnica No.942.05 de A.O.A.C.(1990), en una mufla marca Thermolyne Sybron type 304,000 a 660 grados centigrados durante 5 h.

Carbohidratos. El valor de carbohidratos se obtuvo restando de 100 el valor de los componentes mencionados anteriormente.

Análisis de digestibilidad in vitro

La medición del porcentaje de calidad de proteína in vitro en cada una de las semillas, se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Satterlee et al; (1982). Para esta determinación se empleó harina desgrasada molida en malla No.100. Se resuspendieron 10 mg de proteína proveniente de la muestra problema y/o caseinato de sodio (utilizado como control), se reflujo en 10 ml de agua destilada por 1 hora, y se dejó por 20 min, se ajustó el pH 8. Posteriormente la muestra fue sometida a una digestión con un sistema multienzimático (tripsina de páncreas porcino tipo 1X cristalizada, dializada y liofilizada; alfa-quimotripsina de páncreas bovino tipo 11; peptidasa de mucosa intestinal porcina y una proteasa bacteriana Streptomyces griseus tipo XIV purificada todas estas adquiridas de Sigma Chemical Co. San Louis MO, bajo temperatura controlada en cada incubación de 37 y 55°C. Se utilizó como parámetro de medición el pH, medido a los 20 min de haberse iniciado la reacción. El porcentaje de digestibilidad se calculó mediante la ecuación siguiente:

$\% D = 234.84 - 22.56(X)$, donde X es el valor de pH a los 20 min de reacción.

La actividad de las enzimas fue confirmada mediante el control de caseinato de sodio ANRC liofilizado (Bioserv, INC.), mismo que al ser analizado por esta técnica multienzimática debe dar un valor final de pH 6.5. A cada una de las harinas, se les dió un tratamiento de cocimiento de 75°C por 10 minutos en un baño maría y se les volvió a determinar el porcentaje de digestibilidad.

Índice de eficiencia proteica computarizado (C-PER)

En este trabajo, el C-PER de las semillas se calculó usando el procedimiento descrito por Satterlee *et al*; (1979), a partir de la composición de los aminoácidos indispensables de la proteína de prueba y control (caseína) y su digestibilidad *in vitro*. Los datos fueron computados en base al estándar de aminoácidos esenciales de la FAO/WHO (1973), y el C-PER obtenido para cada semilla fue ajustado al C-PER de la caseína mediante la siguiente ecuación:

$$\text{C-PER (real)} = \frac{2.5}{\text{C-PER caseína}} \times \text{C-PER}$$

Análisis de aminoácidos.

La hidrólisis ácida se llevó a cabo de acuerdo a la técnica reportada por Yensen y Weber (1987). 100 mg de cada muestra de las harinas se colocaron en un matraz balón de 125 ml a los que se les añadió 25 ml de ácido clorhídrico 6M. El matraz se cubrió con vidrio de reloj y las muestras se hidrolizaron en una estufa de presión reducida y de vacío por 16 h a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión. Una vez terminada la hidrólisis se procedió a evaporar el poco ácido restante a 65°C en un rotavapor marca Brinkmann, efectuando posteriormente dos lavados del hidrolizado con agua destilada. Las muestras se concentraron por liofilización y se resuspendieron en agua al momento de ser inyectadas en el analizador de aminoácidos marca LKB 4150, Biochrome alpha plus.

Para la determinación de cisteína, se llevó a cabo la oxidación con ácido perclórico según el método Moore (1963). Se colocaron 100 mg de cada harina en un matraz balón de 125 ml y se adicionó 20 ml del ácido, después de reposar por 12 h se le agregaron 4 ml de ácido bromhídrico. El ácido se evaporó en estufa de vacío a 40°C. El residuo fue lavado con 4 volúmenes de agua y del cual se procedió a hacer la hidrólisis ácida anteriormente descrita.

Hidrólisis alcalina. Se realizó usando la técnica descrita anteriormente (Yensen y Weber, 1987) utilizando hidróxido de sodio 6M

Resultados y Discusión

Análisis proximal de las semillas estudiadas

La concentración de proteínas de las semillas silvestres estudiadas fue de un 19.5 a 30.1 %, obteniéndose el mayor porcentaje en la semilla de gatuña, siguiéndole con 28.7 % de proteína la de mezquite (Tabla 1.1). El mezquite es una semilla actualmente cultivada y usada en la dieta poblacional del Brasil, donde las semillas son molidas y utilizadas como alimento en diferentes productos (Figueiredo, 1990). El porcentaje de proteína fue muy similar en las semillas de brea, palo verde 1, palo verde 2 y en huizache. Al comparar estas proteínas silvestres con otras de leguminosas cultivadas, se observa que el porcentaje de proteína obtenido es muy similar al encontrado en los géneros de garbanzo, frijol y chícharo, con excepción al de soya. Sotelo (1981) reporta 13.45 % de proteína en mezquite, 25.15 % en la semilla de huizache y en frijol 22.8 %. Estos valores fueron obtenidos de una zona tropical y no son muy comparables con los del presente estudio; en cambio en un estudio realizado en una zona árida se obtuvieron concentraciones de proteína para palo

Tabla 1.1 Análisis Químico en Semillas de Plantas Silvestres.

Semilla ^a	Proteína ^b %	Cenizas %	Fibra %	CHO ^c %	Aceite %
<u>C. sonoras</u> (Brea)	22.0	3.6	6.0	52	16.5
<u>C. micrphyllum</u> (P. verde 1)	22.5	3.7	6.0	50	18.2
<u>P. aculeata</u> (P. verde 2)	21.0	3.3	5.0	62	8.5
<u>Q. tesota</u> (P. fierro)	19.5	2.5	6.5	61	10.3
<u>M. grahamii</u> (Gatuna)	30.1	1.3	2.3	43	23.5
<u>A. farnesiana</u> (Huizache)	23.5	5.0	6.3	53	12.0
<u>P. juliflora</u> (Mezquite)	28.7	3.5	5.2	49	14.5
<u>C. arietinum^d</u> (Garbanzo)	20.1	3.5	5.6	71	6.6
<u>G. max^d</u> (Soya)	37.3	5.3	5.8	33	18.7
<u>P. vulgaris^d</u> (Frijol)	20.9	4.3	5.1	68	1.5
<u>P. sativum^d</u> (Chicharo)	19.3	4.0	5.5	68	3.2

a: Base seca, b: N x 6.25 c: por diferencia
d: Hernández y Bourges, 1987.

verde 1 de 22.8 % y en palo verde 2 de 20.1 % (LLano y Gonzalez, 1992), resultados que sí coinciden con los de este estudio. El porcentaje de cenizas (Tabla 1.1), varió de 1.3 a 5.0 %, obteniéndose un valor mínimo en la gatuña y el máximo en la semilla de huizache. Este rango está dentro de los valores encontrados en la literatura lo que coloca a estas leguminosas como buena fuente de minerales, como hierro, potasio, calcio, zinc, magnesio y fósforo (Meiners *et al*, 1976). Las concentraciones son semejantes a las reportadas para leguminosas convencionales (Hernández y Bourges, 1987).

El valor mínimo en fibra cruda fue el de semilla de gatuña (2.3 %) y el máximo (6.5 %) en la semilla de palo fierro, con valores intermedios para brea, palo verde 1 y huizache. El porcentaje de fibra cruda en las leguminosas cultivadas es muy similar al contenido en las semillas de palo verde 2 y del mezquite.

La concentración de carbohidratos asimilables, varió desde 43 % en gatuña hasta 62 % en palo verde 2. Las especies silvestres tienen una mayor concentración de carbohidratos que las especies cultivadas, con excepción de la soya.

El porcentaje de aceite, se encontró en un amplio rango desde una mínima concentración de 8.5 %, en palo verde 2, hasta un 23.5 % en gatuña. Las concentraciones de aceite en las semillas de brea, palo verde 1 y mezquite fueron similares

entre sí y muy semejante al contenido en soya. El porcentaje mayor de aceite fue encontrado en la semilla de gatuña, superando en su contenido al de soya.

Digestibilidad in vitro.

Los resultados de la digestibilidad in vitro y el C-PER obtenidos se presentan en la Tabla 1.2, en la cual los valores de digestibilidad se obtuvieron en un rango de 67 a 84 %. La harina de mezquite presentó el valor mas bajo y la semilla de gatuña el mas alto. En el resto de las harinas (palo verde 1, palo verde 2, palo fierro y huizache) la digestibilidad fue similar. Cabe resaltar que las semillas silvestres tuvieron porcentajes mas altos al compararlos con la digestibilidad in vitro de leguminosas convencionales, como el frijol, garbanzo, chícharos y soya cuyo rango reportado es de 64 a 67 % de digestibilidad (Siddhuraju et al, 1992). El valor mas bajo le corresponde a la harina de soya. Las semillas de mezquite y la del chícharo fueron similares.

Los porcentajes de digestibilidad en las harinas obtenidas de las semillas del presente estudio se elevaron al recibir un tratamiento térmico muy ligero, de 75°C por 5 minutos, lográndose obtener para la proteína de la gatuña una digestibilidad cercana a la del control (caseína). La del mezquite fue igual al porcentaje de digestibilidad reportado

Tabla 1.2 Digestibilidad in vitro en semillas leguminosas

Semillas		Digest. ^a %	Digest. ^b %	C-PER ^c
<u>C. sonorae</u>	(brea)	80	86	1.9
<u>C. microp</u>	(p.verde 1)	76	85	1.8
<u>P. aculeata</u>	(p.verde 2)	76	85	1.8
<u>O. tesota</u>	(p. fierro)	74	79	1.8
<u>M. grahamii</u>	(gatuña)	84	90	2.1
<u>A. farnesiana</u>	(huizache)	73	82	1.9
<u>P. juliflora</u>	(mezquite)	67	76	1.9
<u>P. vulgaris</u>	(frijol)	65	70	2.1
<u>C. arietium</u>	(garbanzo)	65	75	1.9
<u>P. sativum</u>	(chícharo)	67	76	1.9
<u>G. max</u>	(soya)	64	81	2.1
Caseína		92	94	2.5

a: Semillas crudas b: Semillas con tratamiento térmico.
c: Índice de eficiencia proteica computarizado, con relación a digestibilidad y aminoácidos esenciales.

para el chícharo, el cual recibió un tratamiento térmico de 121°C y 15 libras de presión.

Índice de Calidad Proteica Computarizada

Los resultados del C-PER obtenidos se presentan en la Tabla 1.2, en la cual los valores fueron muy similares, para las semillas de brea, palo verde 1, palo verde 2, palo fierro, huizache y mezquite. Encontrándose en estas semillas un C-PER igual al reportado para garbanzo y chícharo. En estas semillas convencionales se reporta un PER para garbanzo de 2.06 y para chícharo de 1.5 in vivo, clasificando a estas proteínas como de buena calidad (Acosta, 1988). El C-PER en la semilla de gatuña presentó el valor más alto y similar a los reportados para el frijol soya y frijol común.

En la Tabla 1.3, se presenta un resumen del contenido de aminoácidos esenciales correspondientes a las proteínas analizadas de cada semilla, y en las Figuras 1.1 hasta 1.6 se presentan los cromatogramas correspondientes al perfil de aminoácidos analizados. La separación de los mismos fue buena, se identificaron los picos contra los estándares. Se presenta para cada semilla un cromatograma individual. En general se encontró que los aminoácidos esenciales presentaron valores más bajos, que los reportados en las leguminosas convencionales ya como éstas son deficientes en aminoácidos azufrados: metionina y cisteína. En cambio se obtuvo lisina

Tabla 1.3 Contenido de Aminoácidos Esenciales en las Semillas Silvestres y Convencionales (g/100 g de proteína).

Semillas	Met	Cis	Lis	Isol	Leu	Fen	Val	Treo	trip
Silvestres									
<u>C. sonorae</u> (Brea)	0.4	1.8	6.0	2.1	6.1	3.6	4.3	3.3	0.5
<u>C. microphy</u> (P. Verde 1)	0.3	1.3	6.9	2.5	6.0	3.4	5.0	3.7	0.6
<u>P. aculeata</u> (P. Verde 2)	0.4	1.0	6.7	2.4	6.2	3.4	5.1	3.9	0.7
<u>O. tesota</u> (P. fierro)	0.2	0.6	7.7	1.9	5.0	3.1	3.0	1.2	0.2
<u>M. grahamii</u> (Gatuña)	0.5	3.3	5.1	1.9	6.3	2.6	2.7	4.7	0.6
<u>A. farnesiana</u> (Huizache)	0.3	1.6	7.0	2.3	6.0	3.7	5.0	3.1	0.8
<u>P. juliflora</u> ^a (Mezquite)	0.6	1.2	2.9	2.0	6.3	2.3	2.8	3.0	0.4
Convencionales ^b									
<u>C. arrietium</u> (Garbanzo)	1.2	0.8	6.5	5.5	9.9	5.2	4.7	3.5	0.7
<u>P. vulgaris</u> (Frijol)	1.0	1.6	7.4	5.5	8.4	5.4	5.8	4.2	0.9
<u>P. sativum</u> (Chícharo)	0.3	0.6	5.7	7.0	9.8	4.9	4.9	3.9	1.1
<u>G. max</u> (Soya)	1.2	0.5	6.5	5.1	7.8	4.8	5.2	3.9	1.3
FAO, 1970	2.2	2.0	5.5	4.0	7.0	2.8	5.0	4.0	1.0

a: Sotelo, 1981; b: Hernández y Bourges, 1987.

y fenilalanina en alta concentración al ser comparadas ambas fuentes (convencional y silvestres) con el patrón de la FAO.

Los resultados obtenidos en la concentración de estos aminoácidos concuerdan con los ya establecidos en leguminosas tradicionales, por lo que se podría considerar a estas semillas provenientes de fuente no convencional como de buena calidad, su proteína puede ser suplementada con la de cereales que tienen una considerable proporción de los aminoácidos deficientes y que también requieren de la lisina de las leguminosas.

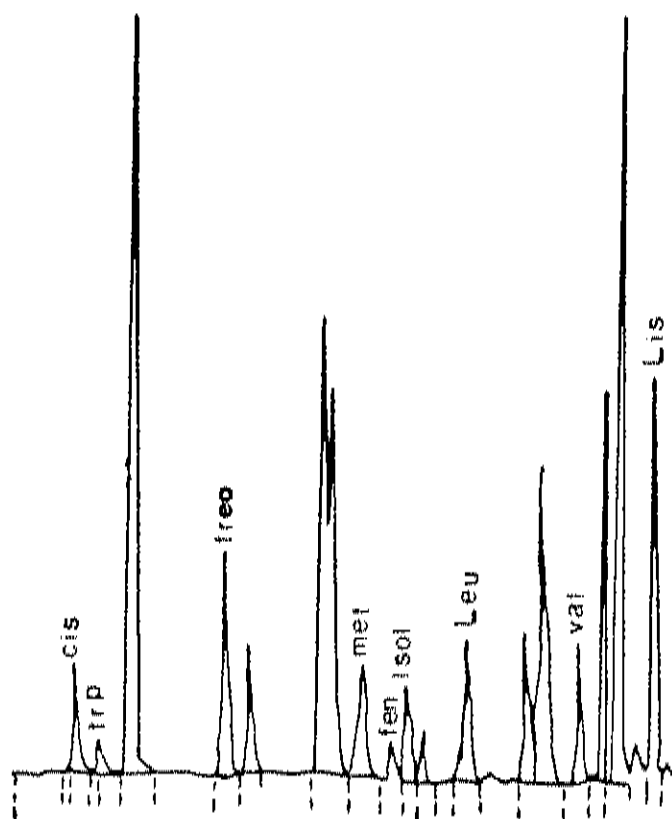


Figura 1.1 Perfil de aminoácidos de la semilla de Gatuña

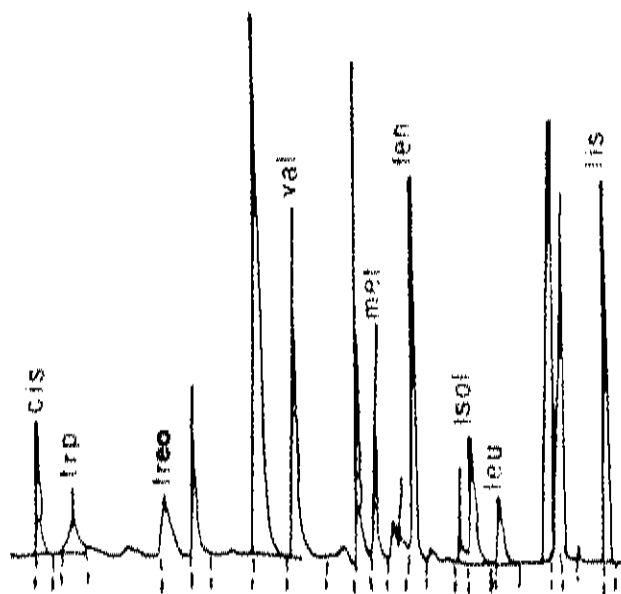


Figura 1.2 Perfil de aminoácidos de la semilla de Huizache

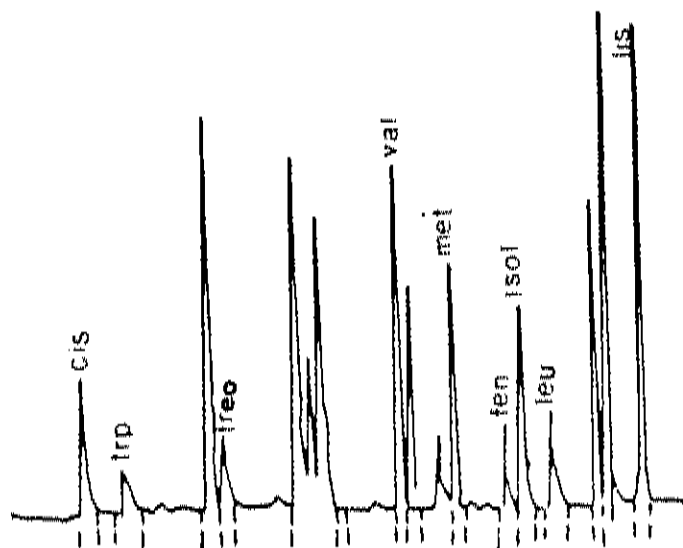


Figura 1.3 Perfil de aminoácidos
de la semilla de Palo verde 1

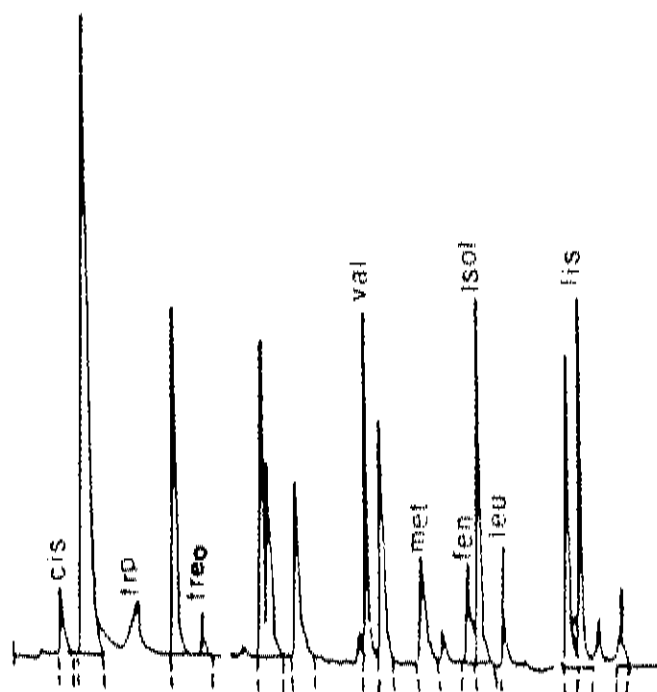


Figura 1.4 Perfil de aminoácidos
de la semilla de Palo verde 2

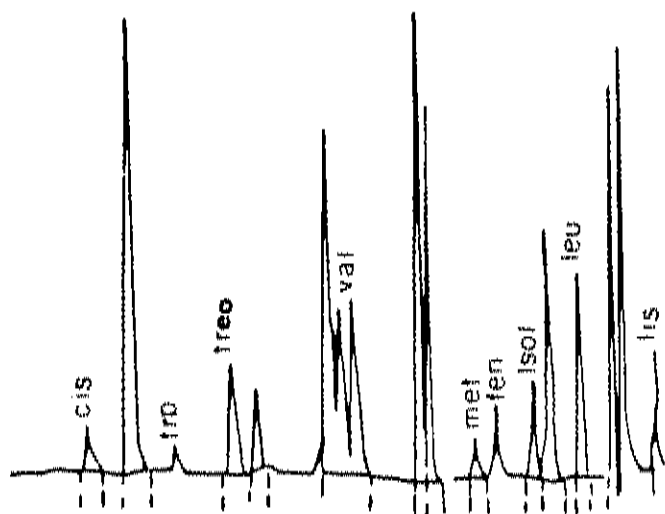


Figura 1.5 Perfil de aminoácidos de la semilla de Brea

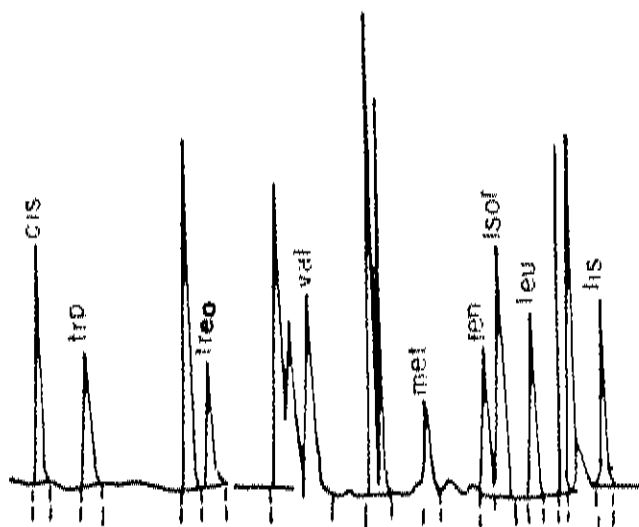


Figura 1.6 Perfil de aminoácidos de la semilla de Palo fierro

CAPITULO 2

FACTORES ANTINUTRICIONALES EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS SILVESTRES DEL DESIERTO SONORENSE

Introducción

En las leguminosas existen en menor o mayor proporción ciertos compuestos que afectan la utilización de la proteína así como a su digestibilidad. También se tiene conocimiento de otros componentes que producen efectos adversos sobre el organismo. Los bajos niveles de digestibilidad de las proteínas presentes en las leguminosas pueden ser causados por varios factores como por ejemplo la presencia de factores antinutricionales como los inhibidores de proteasas principalmente tripsina, lectinas y proteínas conjugadas (Antunes y Sgarbieri, 1980). Así como la presencia de compuestos fenólicos o taninos, alcaloides y saponinas.

Estos factores afectan la función de las enzimas del tracto digestivo o la absorción intestinal. Por otro lado, las leguminosas se pueden ver alteradas en su digestibilidad por los efectos de la preparación y cocimiento que reciben antes de ser consumidas (Aykroyd *et al*, 1964).

Inhibidores de proteasas

Inhibidores de tripsina. Son proteínas que tienen la propiedad de inhibir la actividad de enzimas proteolíticas

(Wogan, 1977). Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal sobre todo en aquellas plantas que constituyen una fuente de proteína en la dieta. Los inhibidores de tripsina son probablemente los factores antinutricionales de mayor distribución en la naturaleza. Se les ha encontrado en fuentes animales y vegetales, sin embargo se les considera característicos de la familia leguminosae (Whitaker y Feeney, 1973). La fuente más frecuente de inhibidores de proteasas son las semillas de las plantas, pero su localización no necesariamente se restringe a esta parte. En el frijol Faba vulgaris y frijol Dolichos lablab se ha reportado que el inhibidor puede estar presente en la semillas, hojas, tallos y raíces de la planta. En el frijol Phaseolus aureus y habas Vicia faba han sido encontrados altos niveles en las hojas. No obstante, se ha reportado que en el frijol soya los inhibidores de proteasas han sido encontrados exclusivamente en la semillas, independientemente del estado de maduración, lo que sugiere que el inhibidor es sintetizado en la semillas con el comienzo de la formación de la misma y no es trasladada de otras partes hacia ésta.

La ubicación de los inhibidores de proteasas dentro de las semillas es principalmente en el cotiledón. Por ejemplo, en el frijol soya el 83 % total de inhibidor se encuentra en dicha parte, pero en el caso de las semillas de habas existe más concentración en la cubierta de la semillas que en el

cotiledón. Existe también diversidad en cuanto a la concentración de acuerdo al tiempo de cosecha, así los cultivos de invierno de chicharo presentan una doble actividad inhibitoria con respecto a los cultivos de primavera (Kakade, 1980; Sgarbieri 1982). Los factores antinutricionales comunmente encontrados en las semillas de leguminosas convencionales, incluyen varias clases de proteínas las cuales al ser ingeridas, actúan a nivel enzimático restringiendo la utilización de la proteína. Entre ellos están los inhibidores más comunes (Kunitz y de Browman). El inhibidor de Browman es de los denominados de doble cabeza, ya que puede inhibir tripsina y quimotripsina en dos sitios reactivos distintos. El primero de ellos es para inhibir tripsina y depende del residuo de lisina (lisina 16- serina 17) y el segundo es específico para inhibir quimotripsina y depende del residuo de leucina (leucina 43-serina 44). Este inhibidor de Browman es una pequeña subunidad de peso molecular de 8000. En sus moléculas, las proporciones de aspartato, serina y cisteína son altas. Los residuos de cisteína son todos combinados en puentes disulfuro, formando un total de siete de ellos y 71 aminoácidos en total (Liener y Kakade, 1980).

El inhibidor de Kunitz de peso molecular de 20,000, tiene un sitio reactivo que envuelve un residuo de arginina, localizado en la posición 63, consta de cuatro residuos de cisteína formando dos puentes disulfuros dentro de la molécula

(posición 39-86 y 136-145), la cual comprende un total de 181 aminoácidos (Wider, 1981; Kakade, 1980). Se ha considerado que los inhibidores de proteasas realizan tres posibles funciones en la planta: como proteínas almacenadas que favorecen el catabolismo de éstas y de otros compuestos, como reguladores de enzimas proteolíticas endógenas o bien como defensores de larvas de insectos o microorganismos patógenos hacia la planta. Los efectos biológicos se manifiestan cuando éstos son ingeridos y se enlazan con las enzimas inactivándolas a nivel intestinal, de esta forma se disminuye así la digestibilidad de la proteína de las leguminosas en su estado crudo (Antunes y Sgarbieri, 1980). Además, se incrementan los requerimientos de aminoácidos azúfrados, ocurre agrandamiento del páncreas, reducción de la energía metabolizable e inhibición de la proteólisis (Badui, 1984). Nutricionalmente causan retraso en el crecimiento o un índice de eficiencia proteica (PER) bajo. El inhibidor al ser inactivado comunmente por un tratamiento térmico hace que el PER o la digestibilidad de la proteína aumente.

La inactivación de los inhibidores de tripsina en las leguminosas, se basa esencialmente en tratamientos térmicos (Liener y Kakade, 1980); sin embargo dichos tratamientos no inactivan completamente a los inhibidores presentes, por lo que la calidad de la proteína de las leguminosas en cierta

forma podría ser deteriorada al destruir nutrientes lábiles, por sobre exposición al calor (Lowgren y Liener, 1986).

Lectinas

Los vegetales contienen otro factor antifisiológico, como son las lectinas que pueden afectar la digestión y la absorción de las proteínas a nivel gastrointestinal. Las lectinas son proteínas ó glucoproteínas cuyo origen no es inmunológico y tienen la característica de enlazar carbohidratos específicamente, ya sea libres o formando parte de la membrana celular, por lo que se inducen la aglutinación celular y en esto se basa su detección. Las lectinas están ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal, particularmente entre las leguminosas. En las plantas las semillas tienen mayor concentración de lectinas aunque se presentan en otros tejidos como: raíces, hojas y cortezas (Sharon y Lis, 1972). La proporción de proteínas de la semilla dada por las lectinas varía de acuerdo a la especie y fuente. Se ha sugerido que las lectinas se encuentran en las plantas formando parte del sistema de protección, combatiendo el ataque de microorganismos especialmente hongos, y de algunos insectos (Jaffe, 1980).

Las lectinas representan del 2 al 10 % del total de las proteínas en las semillas de leguminosas, lo cual sugiere que tienen un papel importante en la fisiología de la planta

(Murray, 1984). Se han formulado muchas hipótesis acerca de las funciones que podrían desempeñar. La amplia distribución de las lectinas en las plantas y su habilidad de distinguir diferentes tipos de células, podría ser indicativo de que sirven para combatir las invasiones de organismos patógenos en las etapas de desarrollo en que la planta es más susceptible al ataque, esto es durante la germinación y estado de plántula (Pusztai, 1989). Las lectinas pueden servir también como sitios receptores para elicitores de fitoalexinas, y por lo tanto contribuir a la defensa de la planta contra patógenos (Vidhyasekaran, 1988). También actúan como anticuerpos para reconocer las bacterias nocivas del suelo e inhiben la formación de quitina en las hifas de los hongos fitopatógenos, inhibiendo también las polisacaridas de los mismos (Lis y Sharon, 1981). Algunos autores sugieren que las lectinas protegen a las plantas de animales depredadores ya que se encontró que las larvas del gorgojo Callosobruchus maculatus morían al agregar lectinas de frijol negro en su dieta (Janzen y Liener, 1976).

La importancia nutricional de las lectinas dietarias

Este tipo de proteínas pueden causar efectos adversos cuando son ingeridas con la dieta, dándose estos efectos principalmente en el intestino delgado. Se ha demostrado que la ingesta de lectinas produce: retardo del crecimiento y

pérdida de peso (Liener, 1981). Se tiene conocimiento que algunas lectinas pueden disminuir la eficiencia de conversión de los alimentos en el tracto digestivo, debido a sus efectos antinutricionales directos. También es común que las lectinas actúen como moléculas de señales metabólicas extrañas, las cuales pueden producir daños o cambios en el metabolismo con pérdida substancial de componentes corporales esenciales, ya que las lectinas reaccionan con células epiteliales y con las bacterias presentes en el lumen del intestino delgado (Pusztai *et al*, 1991). La efectividad fisiológica de las lectinas, es su resistencia a la proteólisis que se representa en el tracto alimentario y las lectinas que sobreviven se pueden enlazar al borde de cepillo del intestino delgado. Se ha demostrado por técnicas inmunoquímicas, que este enlace se lleva a cabo principalmente en la sección yeyunal y que la capacidad de enlace al borde de cepillo difiere entre lectinas. Se ha observado después de una administración intragástrica, que algunas lectinas se enlazan fuertemente desde el inicio de la exposición, mientras que otras logran enlazarse después de varios días en contacto (Pusztai *et al*; 1991).

Una de las principales características de las lectinas es que pueden ser absorbidas sistémicamente del intestino delgado y algunas se han encontrado en sangre y en la mayoría de los órganos periféricos del cuerpo. Otro efecto de las lectinas en el intestino delgado es que la población bacteriana puede

cambiar en su presencia. Algunas pueden ser tóxicas en presencia de bacterias y no tóxicas en su ausencia. Las razones de tal toxicidad no son claras, lo que se sabe es que algunas lectinas de los alimentos tienen especificidades similares a la de las adhesinas de las bacterias por lo que pueden bloquear efectivamente la unión de microorganismos a la mucosa. Sin embargo, cuando las lectinas y adhesinas se enlazan a diferentes receptores en la misma célula, el daño a la membrana puede ser aditivo o sinérgico (Pusztai et al 1991) . Así, los alimentos que contienen lectina son una fuente de señales metabólicas para la célula tanto del tracto intestinal como de las bacterias, y dependiendo de la cantidad y especificidad de las lectinas dietarias, inducirán cambios en el epitelio del intestino delgado y en la población bacteriana (Pusztai et al; 1991).

Fenoles

Los fenoles pertenecientes al grupo de taninos o polifenoles, se han reconocido como uno de los factores antinutricionales presentes en leguminosas. Especialmente aquellos que son denominados como taninos (Singletón, 1973). Los taninos son sustancias fenólicas que poseen un peso molecular mayor de 500. Su grupo funcional es el anillo bencénico con uno ó dos grupos hidroxilos unidos a carbonos en diferentes patrones. En los alimentos se encuentran de muchas

formas desde pequeños ácidos fenólicos monoméricos, hasta grandes polifenoles condensados (Brune *et al.*, 1991). Los fenoles pueden ser clasificados como hidrolizables, aquéllos que son degradados por enzimas para producir residuos de azúcar y ácidos fenilcarboxílicos, y taninos condensados, los cuales son polímeros de flavonoides (Singlenton, 1973; Badui, 1984). Los taninos o fenoles son localizados predominantemente en las cubiertas de las semillas, encontrándose en baja concentración en el cotiledón. En las semillas de frijol común, el color de la cubierta y el contenido de taninos se correlaciona con el efecto de la digestibilidad de la proteína (Phillips, 1981). La mayoría de estos compuestos fenólicos han sido identificados como potentes inhibidores de la absorción del fierro, debido a la formación de un complejo insoluble con iones de fierro en el lumen gastrointestinal y por lo tanto hacen al fierro incapaz de ser absorbido (Brune *et al.*; 1991). El efecto depresivo de los fenoles en el crecimiento de animales se debe, a la afección de la proteína en su digestibilidad. El efecto está relacionado con el hecho de que los fenoles forman un complejo con las enzimas digestivas (tripsina y alfa amilasa) o bien, que interactúan con la proteína de la dieta para hacerla indigerible (Haslam, 1974). Cerca de la mitad de los inhibidores de crecimiento responsables de la pobre utilización del frijol Vicia faba, se ha atribuido a la

presencia de fenoles condensados localizados en las testas de las semillas (Liener, 1980). Se ha encontrado que la adición del agua de cocimiento del frijol común a dietas experimentales provoca una disminución considerable del rango de eficiencia protéica (PER) y que se le ha atribuido al alto contenido de fenoles que posee el caldo de frijol cocido. Dicha premisa es reforzada por el hecho de que la reducción en el crecimiento fue más significativa con el agua de cocimiento de frijol con color mas oscuro (Elias et al; 1979).

Alcaloides

Son compuestos o metabolitos secundarios de origen vegetal que tienen propiedades alcalinas (básicas) y su estructura se origina por la presencia de nitrógeno aminico fisiológicamente activo. Estos compuestos se encuentran en hojas, tallos, raices y semillas, están universalmente distribuidos en grandes grupos vegetales (Gros et al; 1985). La mayoría de los alcaloides se encuentran en los vegetales como sales de ácidos orgánicos, con frecuencia en forma de glicósidos de la galactosa, rahanosa y glucosa. A los alcaloides en las plantas, se les considera como un producto terminal del metabolismo del nitrógeno, se les asocia con la protección de la planta en contra de insectos. También parece que intervienen en el crecimiento vegetal, ya sea por su

capacidad de formar quelatos o por intervenir en fenómenos de óxido-reducción (Harbone, 1984).

Saponinas

Son glucósidos amargos, que poseen propiedades espumantes y causan hemólisis de eritrocitos. Son sustancias polares muy termorresistentes, su hidrólisis genera carbohidratos (hexosas y pentosas) y una aglicona que recibe el nombre de sapogenina. Se dividen químicamente en esteroidales y triterpenoides. Entre las plantas que contienen saponinas están la alfalfa y la soya. Las saponinas biológicamente activas en la alfalfa están compuestas de carbohidratos unidos principalmente a la sapogenina denominado ácido medicagenico, con pequeñas cantidades de las sapogeninas, hederagenina y ácido lucérnico presentes (Livingston et al; 1984).

Las saponinas en el tracto gastrointestinal actúan como inhibidores inespecíficos de las enzimas quimotripsina y colinesterasa. Estos tóxicos pasan al intestino sin modificarse y la flora intestinal los descompone al aglucón.

Las saponinas pueden formar complejos con proteínas y esteroides afectando la disponibilidad de la proteína y de otros nutrientes (Harbone, 1984; Domínguez, 1973).

En la actualidad se cuenta con pocos trabajos realizados con factores antinutricionales en plantas o semillas

provenientes de fuente no convencional. Por la importancia nutricional que tienen estos factores se procedió en el segundo apartado de este trabajo, a detectar y cuantificar la concentración de inhibidores de tripsina, fenoles, alcaloides, saponinas y a caracterizar parcialmente a las lectinas de las semillas de palo fierro y palo verde, debido a que éstas tuvieron la mayor actividad hemaglutinante en el extracto crudo.

Materiales y Métodos

Extracción

Cada una de las semillas fueron separadas manualmente de la vaina, se molieron en malla No 100 y posteriormente fueron totalmente desgrasadas con hexano quedando listas para efectuar los análisis. Estos se realizaron por duplicado o triplicado de acuerdo a la variabilidad de la técnica ya estandarizada.

Métodos

Inhibidor de tripsina. La determinación de inhibidores de tripsina se llevó a cabo de acuerdo a la técnica establecida por Hamerstrand *et al*; (1981), la cual consistió en disolver 1 g de muestra (de cada harina), en 50 ml de NaOH 0.01 N con agitación constante por 3 h en tubos de ensayo. Se adicionaron 0.0, 0.6 ml, 1.0 ml, 1.4 ml, 1.8 ml, y 2.0 ml de extracto a

analizar, los cuales se ajustaron con agua destilada a un volumen total de 2 ml. A cada tubo se le agregó 2 ml de solución de tripsina (100 mg de tripsina+100 ml de HCL 0.001 N). Esta solución fué incubada a 37°C por 10 min en baño maría y se le agregó 5 ml de solución BAPA (tris hidroximetil, aminometano en dimetilsulfóxido). Después de los 10 min fue detenida la reacción agregando 1 ml de ácido acético al 30 %. A cada tubo se le registró su absorbancia a 410 nm y se calculo la concentración interpolándose en la curva y en base a la intensidad del color que es proporcional a la inhibición de la enzima tripsina, la cual se usó como estándar.

Fenoles. Para obtener la cuantificación de fenoles totales, se usaron dos solventes, metanol al 100 % (para taninos condensados), y metanol- agua al 50 % (para taninos hidrolizables y taninos condensados), siguiendo la técnica propuesta por Goldstein y Swain (1965). Cada una de las harinas fueron extraídas con metanol concentrado por 6 h con agitación constante, posteriormente se filtraron obteniéndose un filtrado 1. El remanente fue extraído con metanol al 50 % por 6 h con agitación constante, del cual se obtuvo el filtrado 2, correspondiente a (lignina+celulosa). Los filtrados obtenidos (1 y 2) fueron cuantificados colorimétricamente a una absorbancia de 760 nm.

Curva de calibración. Se tomaron alicuotas de solución ácido tánico (100 mg/ml), se colocaron en matraces volumétricos de 100 ml, los cuales contenían 75 ml de agua destilada, se les agregó 5 ml de reactivo Folin Denis, se aforó a 100 ml. Después del reposo por 25 min se determinó la absorbancia a 760 nm. junto con las muestras problema, se obtuvo la concentración de fenoles, interpolándose los resultados en la curva de calibración (Goldstein y Swain 1965).

Alcaloides. Se utilizó la técnica de Harbone (1984). 25 g de cada una de las harinas, se extrajeron por 6 h en Soxhlet con metanol, posteriormente se destiló a presión reducida obteniéndose un extracto resinoso al cual se le adicionó ácido fosfórico en relación (1:1). Posteriormente se filtró y al remante se extrajo con cloroformo por 6 hr el cual fue recuperado en rotavapor y, a el remanente se le agregaron gotas de ácido clorhídrico al 1 %. Al precipitado blanco obtenido se le efectuó la prueba de alcaloides por medio de los reactivos de Mayer y Dragendroff característicos para la presencia ó ausencia de alcaloides.

Saponinas. Las saponinas son compuestos muy solubles en soluciones polares. Para su detección, se llevó a cabo la técnica de Dominguez (1973). Esta consiste en extraer en Soxhlet con metanol acuoso (1:1), 5 g de muestra problema por

6 h. Posteriormente la micela fue redestilada en rotavapor y el residuo fué lavado con eter etílico para separar los lípidos. Al material insoluble se le homogenizó con etanol al 80 %. Se midieron las saponinas por medio de la prueba de la espuma y de la hemólisis con digitonina.

Lectinas. Se utilizó la harina de palo verde y la de palo fierro desgrasadas para esta determinación, las cuales fueron molidas en malla No 20 y extraídas con solución salina (NaCl 0.9 %, 1:1 p/v) de acuerdo a estudios previos realizados por Calderón de la barca y Vázquez-Moreno (1988). Después de la separación por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4 grados centígrados y finalmente los extractos salinos fueron liofilizados.

Actividad hemaglutinante y especificidad química. Las muestras de los extractos liofilizados se resuspendieron en agua (0.1 g/200 microlitros). A estas soluciones se les determinó el título de hemaglutinación con eritrocitos humanos tripsinizados por el método de la doble dilución seriada (Turner y Liener, 1975).

Se hicieron pruebas de inhibición de la actividad hemaglutinante con fucosa, lactosa, manosa, mucina, fetuina, N-acetil galactosamina, Acido N-acetilneuramínico y N-acetil

glucosamina, todos en concentración 0.1 M (Lis y Sharon, 1986).

Cromatografía de afinidad. En base a las pruebas de inhibición, se seleccionó fetuína y N-acetil galactosamina para acoplarlas a agarosa (Mini-Leak) y usarlas como matriz en la purificación de las lectinas de palo verde y palo fierro del extracto salino. El método de acoplamiento fué el indicado por el proveedor Kem-En-Tec (Hellerup, Dinamarca). La purificación y caracterización parcial de las lectinas se realizaron de la forma en que se usa para trigo y soya (Ramos, 1989; Robles, 1989). En resumen, las columnas fueron equilibradas con buffer de fosfato salino, ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M., NaCl 0.9 % a pH 7.2-7.4). A cada columna se le cargó 1 g de extracto liofilizado y disuelto en 30 ml de buffer de fosfato salino. Posteriormente la columna con el mismo buffer de equilibrio y la elución con glicina-HCL 0.1 M pH 2.5, seguida de buffer fosfato salino pH 7.25 en todos los casos. Las fracciones de elución se dializaron y liofilizaron. Tanto a las fracciones de elución como a las de lavado, se les determinó actividad hemaglutinante con la técnica ya descrita y concentración de proteína se determinó por el método de Lowry et al; (1951), para calcular rendimientos y niveles de lectina en estas semillas silvestres.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Para el análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de las lectinas y la determinación del peso molecular de sus subunidades se usó electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a corriente constante a 8 MA y a 80 v, durante 2.5 h en una cámara modelo SE200 (Hoeffer, San Fco. Ca.), con fuente de poder. Después el gel fue sacado y teñido por 12 h en solución azul de comassie blue R250 al 2 %, destiñiéndose en solución de 50 % metanol-10 % ácido acético y almacenadas en solución de 7 % ácido acético- 5 % metanol (Clements, 1990). Los pesos moleculares se determinaron por su relación con estándares conocidos: Miosina 205 kDa de PM, B-galactosidasa 116 kDa, B-fosforilasa 97 kDa, Albúmina bovina 66 kDa, Albúmina de huevo 45 kDa, Gliceraldehido 3 fosfato 36 kDa, Anhidrasa carbónica 29 kDa, Tripsinógeno 24 kDa, Inhibidor de tripsina 20 kDa y Lacto albúmina 14 kDa respectivamente.

Resultados y Discusión

Los índices de los factores antinutricionales obtenidos en las semillas analizadas, se presentan en la Tabla 2.1 donde se aprecia un rango de inhibidores de tripsina de 50 a 70 UTI por g de muestra. El menor contenido se presentó en la

semilla de gatuña cuyo valor está dentro de los rangos aceptables (40-60 UTI) del método oficial para leguminosa como el frijol soya (Kakade et al; 1979). En las demás semillas se obtuvieron valores ligeramente más altos, por lo que se podría decir que la digestibilidad de éstas proteínas podría estar afectada. Al comparar estos resultados obtenidos con los de leguminosas tradicionales como: frijol Phaseolus vulgaris que tiene 79 UTI, la soya Glycine max 85 UTI, chícharo rojo Cajanus cajan 59 UTI y en lenteja Lente culinaris 62 UTI, se puede observar que las semillas del presente estudio tienen menos inhibidores de tripsina las cuales además al ser procesadas tienden a disminuir en un 50 % este inhibidor (Linier, 1980). Por otro lado, se observó que las semillas en este estudio, al recibir un tratamiento se aumentó la digestibilidad in vitro (Tabla 1.2). Lo que nos indica que este inhibidor debió ser inactivado.

Los fenoles se encontraron en un rango de 3.0 a 13.1 % (Tabla 2.1). Dentro del límite aceptado está la semilla de gatuña y en todas las demás semillas en concentración relativamente altas, esto es del 6 % en leguminosas, como el frijol común. El frijol tépari de testa café presenta valores de 6 % y 9.2 % el frijol negro (Elías et al; 1979). Los valores son comparables con los resultados obtenidos, con excepción de la semilla de huizache en la cual se obtuvo el valor más alto y cuya semilla es de color negro, siguiéndole

Tabla 2.1 Factores Antifisiológicos en Semillas de Plantas Silvestres del Desierto de Sonora.

Semilla	UTI/g	Fencles &	Alcaloides	Saponinas	TH
<i>C. sonorae</i> (Brea)	63	7.8	+	-	2
<i>C. microphyllum</i> (P. verde 1)	67	8.3	+	-	4
<i>P. aculeata</i> (P. verde 2)	65	7.2	+	-	8
<i>O. tesota</i> (P. fierro)	70	9.6	+	+	8
<i>M. grahammii</i> (Gatuña)	50	3.0	-	-	0
<i>A. farnesiana</i> (Huizache)	67	13.1	+	-	4
<i>P. juliflora</i> (mezquite)	60	5.4	+	-	2

UTI: unidades internacionales de inhibidores de tripsina
 TH: título de hemaglutinación
 + detectado
 - no detectado

la semilla del palo fierro con un color café oscuro y la semilla de gatuña que es de color café claro.

Los alcaloides no se detectaron en la semilla de gatuña, mientras que en el resto de las semillas analizadas si hubo presencia de este metabolito tóxico.

Las saponinas solo se detectaron en las semillas de huizache y palo fierro. Es importante mencionar que las saponinas, alcaloides y los fenoles son compuestos polares y por lo tanto muy solubles en soluciones salinas y acuosas y al ser cocinados se eliminarían en los caldos de preparación.

En todos los extractos crudos salinos se encontró actividad hemaglutinante, con excepción de el de semilla de gatuña. Los títulos mas altos fueron para palo verde y palo fierro con valor de 8, huizache de 4, palo verde 4, en brea y mezquite de 2. En extractos crudos de semillas de leguminosas comunes se presentan títulos de hemaglutinación mucho mayores como por ejemplo 128 en frijol soya, lentejas 64, chícharo 32 y en frijol común 64. Los títulos pueden diferir dependiendo del origen de los eritrocitos, al ser tratados por diferentes células ya sea (animal y/o humano). Y en caso de que se requiera estas lectinas pueden ser eliminadas de manera similar a los tratamientos térmicos aplicados a las leguminosas comunes como en el caso de la soya que es inactivada cuando se somete a calor seco (100°C por 30 min), o cuando se trata con calor húmedo (121°C, 15 psi por 30 min),

su actividad biológica se destruye completamente (Muelenare, 1964).

En este estudio se procedió a caracterizar parcialmente las lectinas de las semillas que presentaron una mayor actividad hemaglutinante en el extracto crudo salino: la de palo verde 2 (Parkinsonia aculeta) y palo fierro (Olneya tesota).

La especificidad química de las lectinas se presenta en la Tabla 2.2, encontrándose una mayor inhibición por el azúcar N-acetil galactosamina, galactosa y por el carbohidrato de la glicoproteína fetuina, en ambos extractos crudos salinos provenientes de estas dos fuentes silvestres.

La lectina de palo verde fue parcialmente inhibida por fucosa, glucosa y mucina, y la de palo fierro por lactosa y manosa. Las lectinas del frijol soya, frijol Dolichos biflorus, frijol Vicia villosa también son inhibidas por N-acetil galactosamina (Sharon y Lis, 1972).

Purificación de las lectinas por cromatografía de afinidad

El proceso para purificar a ambas lectinas de los extractos salinos de palo verde y de palo fierro, se basó en la habilidad que tienen las lectinas de interactuar con los azúcares de fetuina y con N-acetil galactosamina. Las Figuras 2.1 y 2.2 presentan los cromatogramas de la purificación, donde una gran proporción de las proteínas presentes en el

Tabla 2.2 Especificidad química de las lectinas de palo verde y palo fierro.

Inhibidor	Título de hemaglutinación ^a	
	PVS	PFS
Ninguno	8	8
Nac.Glucosamina	8	8
Fucosa	4	8
Nac.Galactosamina	2	2
NacNeu	8	8
Fetuína	2	2
Lactosa	8	4
Mucina	4	8
Manosa	8	4
Glucosa	4	8
Galactosa	2	2

a: Eritrocitos tipo B tripsinizados.

PVS: Extracto salino de semillas de palo verde.

PFS: Extracto salino de semillas de palo fierro.

extracto crudo, no se unen a la fetuína de la matriz cromatográfica, mientras que las fracciones (b) y (c) si se unieron. Estas proteínas fueron eluidas con facilidad al bajar el pH a 2.5 con glicina ácido 0.2 M, y luego al subir el pH a 7.2 con buffer fosfato salino 0.1 M. En ambas fracciones se obtuvieron títulos de hemaglutinación.

Cuando la purificación se realizó en la columna que contenía ligada N-acetil galactosamina (Figura 2.3) el cromatograma fue similar a los presentados con fetuína.

En las Tablas 2.3 y 2.4 se presentan los resultados en el contenido de proteína, título de hemaglutinación, actividad específica, factor de purificación y % de lectina. El extracto crudo de palo verde (a) cargado a la columna de fetuína tenía una concentración de 10.12 mg/ml de proteína, con un título de hemaglutinación de 8; mientras que en la fracción no enlazada a la columna y correspondiente al lavado se obtuvo una concentración de 1.41 mg/ml de proteína la cual no presentó actividad hemaglutinante, por lo que se puede decir que toda la lectina se ligo a la columna. La fracción (b) enlazada a la columna (Figura 2.1) presentó una concentración de 0.950 mg/ml, con un título de 16; otra fracción enlazada fue la (c) con una concentración de 0.375 mg/ml, con actividad hemaglutinante de 8, lo cual implicó actividad específica de 0.7905, 16.84 y 21.33 unidades y los factores de purificación fueron de 21.3 y 27 veces.

Columna: Minileak- fetuina
palo verde salino

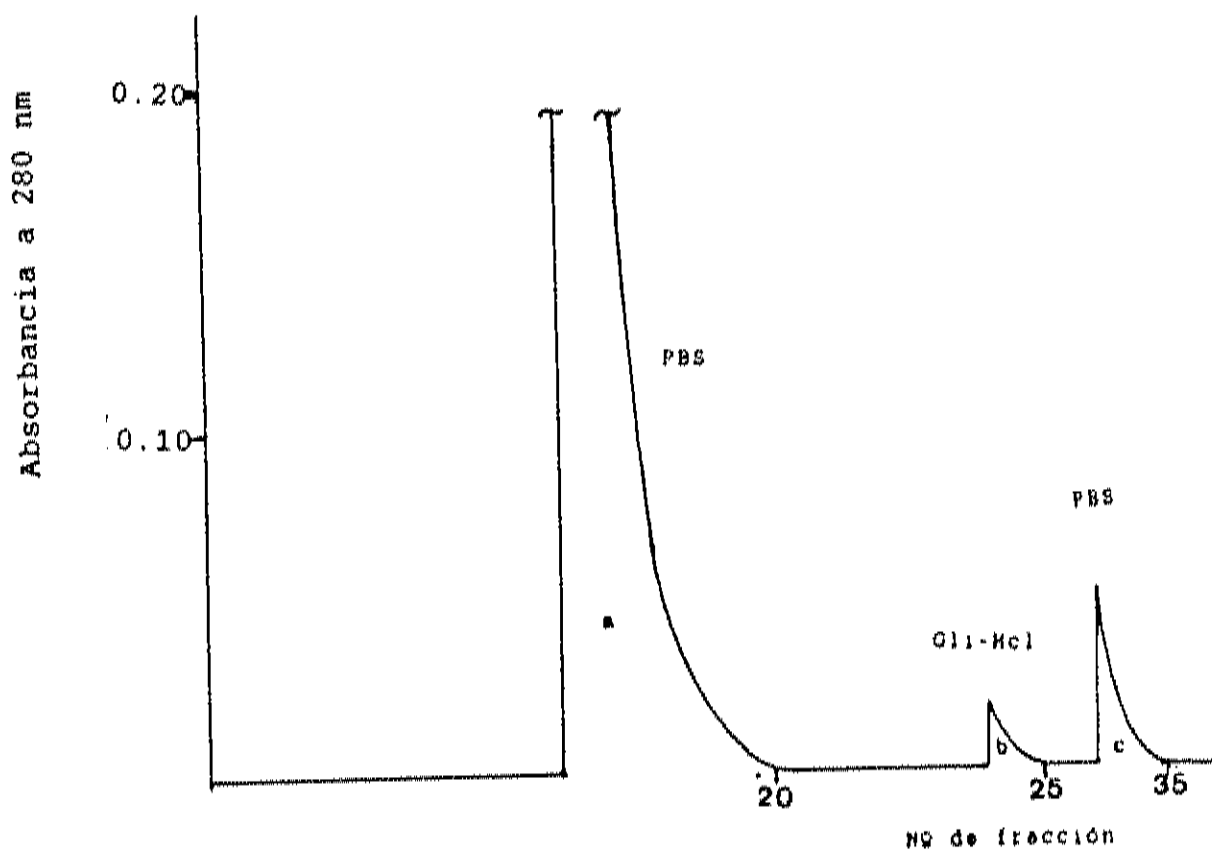


Figura 2.1 Cromatograma de purificación de las lectinas de *Parkinsonia aculeata* (palo verde), por cromatografía de afinidad en Minileak-Fetuina. a) Fracción de proteína no enlazada, b) lectina eluida a pH 2.5, c) lectina eluida a pH 7.2.

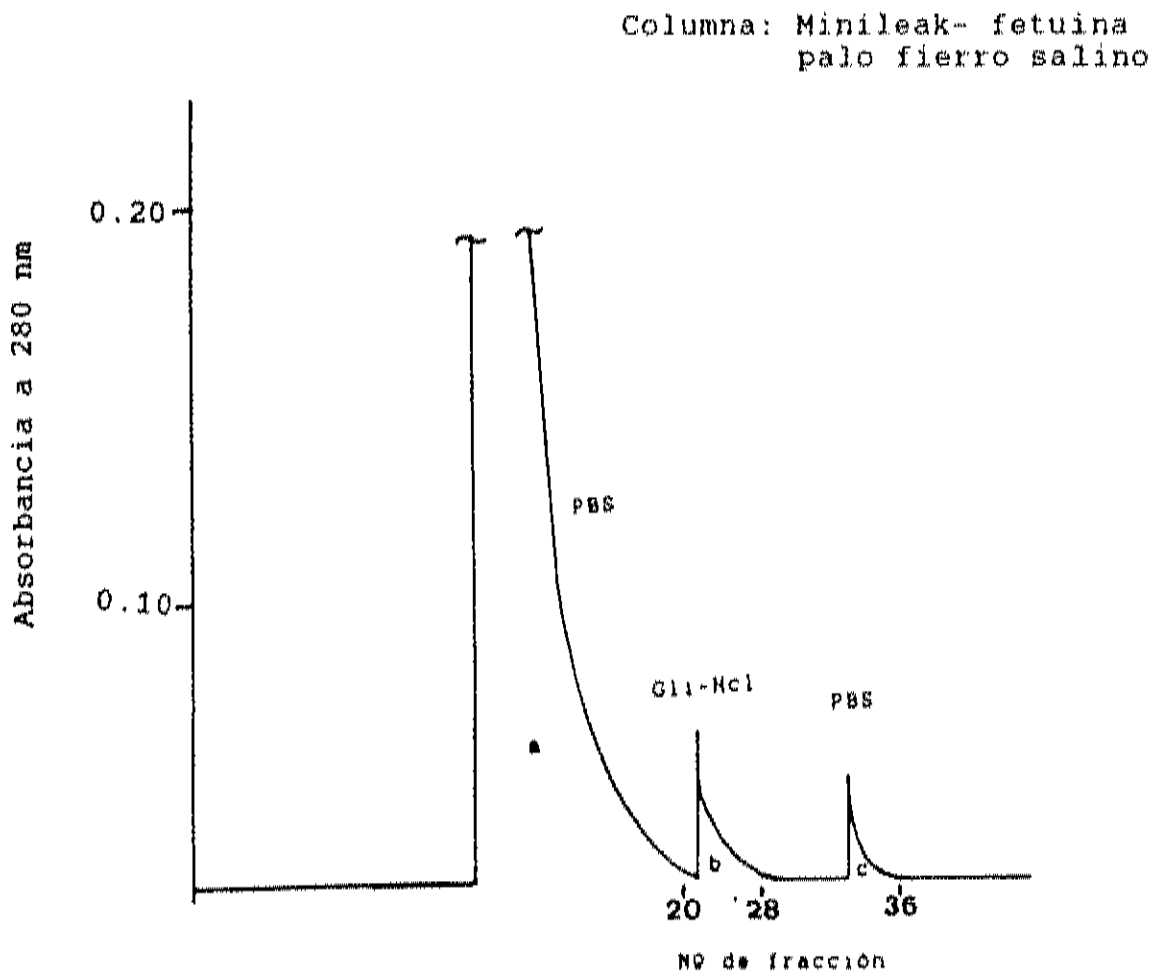


Figura 2.2 Cromatograma de purificación de las lectinas de Olneya tesota (palo fierro), por cromatografía de afinidad en Minileak-Fetuina. a) Fracción de proteína no enlazada, b) lectina eluida a pH 2.5, c) lectina eluida a pH 7.2.

Tabla 2.3 Extracción y purificación de las lectinas de Palo verde y Palo fierro en Minileak-fetuina.

Fracción	Proteína (mg/ml)	TH ^a	A.E ^b	F.p ^c	Lectina %
EPVS ^d	10.12	8	0.790	1	
Lavado	1.41	0	0	0	
Fracción Gli-HCl	0.950	16	16.84	21.3	1.7
Fracción PBS	0.375	8	21.33	27.0	0.67
EPFS ^e	12.37	8	0.646	1	
Lavado	2.34	0	0	0	
Fracción Gli-HCl	1.35	16	11.85	18.3	2.4
Fracción PBS	0.33	8	24.24	37.5	0.59

a: actividad hemaglutinante, b: actividad específica,
c: factor de purificación, d: Extracto crudo salino de Palo verde y e: Extracto crudo salino de Palo fierro.

Obteniéndose mayor lectina (1.7 %) en la fracción enlazada (b), y eluída con glicina ácido. En el proceso de purificación de la lectina a partir del extracto crudo de palo fierro, el cual al pasarlo por la columna de fetuína presentó una concentración de 12.37 mg/ml de proteína con un título de hemaglutinación de 8, mientras que la fracción no ligada a la columna, obtenida en el lavado no presentó actividad hemaglutinante, y en la fracción (b) enlazada a la columna (Figura 2.2), se obtuvo una concentración de 1.35 mg/ml de proteína y un título de hemaglutinación de 16, y en la fracción (c), presentó 0.33 mg/ml de proteína con un título de hemaglutinación de 8, las cuales mostraron una actividad específica de 0.646, 11.85, 24.24 y los factores de purificación correspondientes fueron de 18.3 y 37.5 veces. En la fracción eluída con glicina ácido se tuvo mayor concentración de lectina (2.4 %).

El extracto crudo de palo verde pasado por la columna de N-acetil galactosamina presentó una concentración similar a la pasada por fetuína, con el mismo título de hemaglutinación, obteniéndose en la fracción (b) enlazada a la columna (Figura 2.3), 0.90 mg/ml de proteína, y un título de hemaglutinación de 32, con una actividad específica de 35.55. En esta fracción se obtuvo 1.6 % de lectina, mientras que la fracción (c) presentó 0.64 % de lectina, como se presenta en la Tabla 2.4.

Columna: Minileak- N acetil galactosamina
palo verde salino

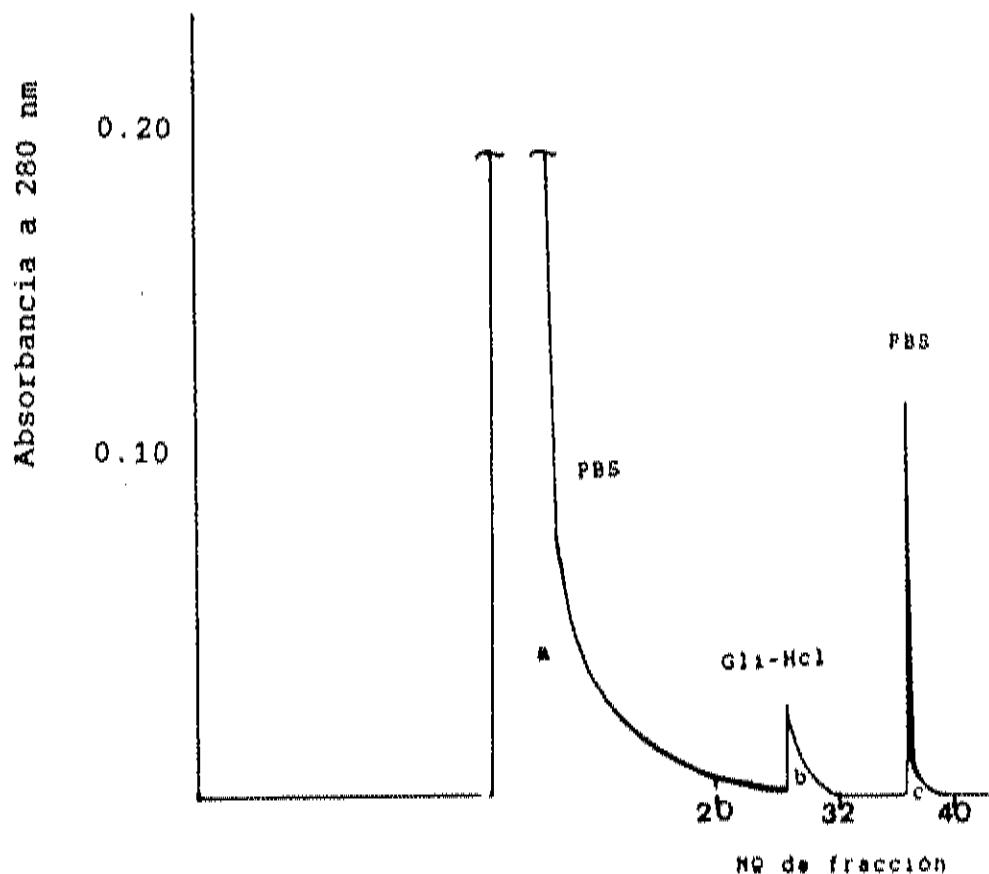


Figura 2.3 Cromatograma de purificación de las lectinas de *Parkinsonia aculeata* (palo verde), por cromatografía de afinidad en Minileak-NacGalactosamina. a) Fracción de proteína no enlazada, b) lectina eluida a pH 2.5, c) lectina eluida a pH 7.2.

Tabla 2.4 Extracción y purificación de la lectina de palo verde en N-acetil galactosamina.

Fracción	Proteína (mg/ml)	TH ^a	A.E ^b	F.P ^c	Lectina %
EPVS ^d	10.81	8	0.740	1	
Lavado	1.24	0	0	0	
Fracción Gli-Hcl	0.90	32	35.55	48.0	1.6
Fracción PBS	0.36	8	22.22	30.0	0.64

a: actividad hemaglutinante, b: actividad específica,
 c: factor de purificación, d: Extracto crudo de palo verde salino.

La Figura 2.4 presenta el gel de electroforesis en poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) del extracto crudo (B) y las fracciones de la cromatografía (C, D y E) de afinidad; las fracciones D y E presentaron dos bandas, correspondiente a una lectina con dos subunidades una de 66 kDa, y otra de 45 kDa, obtenidas durante la purificación en Minileak-fetuína del extracto crudo salino de la semilla de palo verde, las cuales se pueden apreciar en el extracto crudo (B), pero no aparecen en la fracción de lavado (C) o no ligadas a la columna indicando la eficiencia del proceso de purificación, en (A y F) se presentan los estándares de pesos moleculares.

En la Figura 2.5 correspondiente al gel de electroforesis en poliacrilamida con SDS, del extracto crudo salino de la semilla de Palo verde, las fracciones (D) y (E) presentaron afinidad por Nac galactosamina, la fracción D) mostró una banda a 66 kDa, y la fracción E) presento dos bandas de pesos moleculares de 66 y 45 kDa, muy similares a las obtenidas en el gel proveniente de la purificación con fetuína.

El extracto crudo salino de palo fierro presentó afinidad por fetuína, encontrándose en la fracción D) una banda de peso molecular de 97 kDa y otra de 66 kDa correspondiente a la fracción E), como se muestra en la Figura 2.6.

La semilla de palo verde presentó una lectina con dos subunidades mientras que Palo fierro mostró dos lectinas

distintas, las cuales son muy diferentes con las encontradas en otras especies de leguminosas, como la reportada por (Lotan et al, 1975) donde indican 31 kDa para lectina de soya en condiciones desnaturalizantes. En el estudio de Hankins et al, (1988) se reportó en la semilla de la leguminosa silvestre Sphora japonica, pesos moleculares de 30 y 33 kDa. Tambien en una linea de frijol tepari silvestre se encontraron pesos moleculares de 115 y 120 kDa. (Gonzalez, 1990).

Purificación por Cromatografía de Afinidad en
Minileak - Petuina

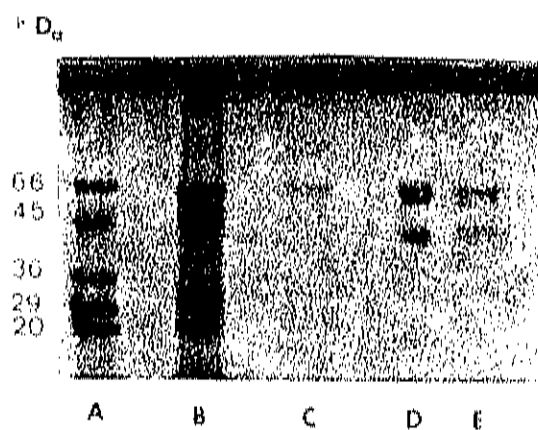


Figura 2.4. Patrón electroforético de las lectinas de palo verde salino en condiciones desnaturalizantes y reductoras. a) estándares de pesos moleculares, b) extracto crudo, c) lavado con PBS, d y e) lectinas eluidas con solución glicina ácido y buffer fosfato salino.

Purificación por Cromatografía de Afinidad en
Minileak-Nacetil Galactosamina

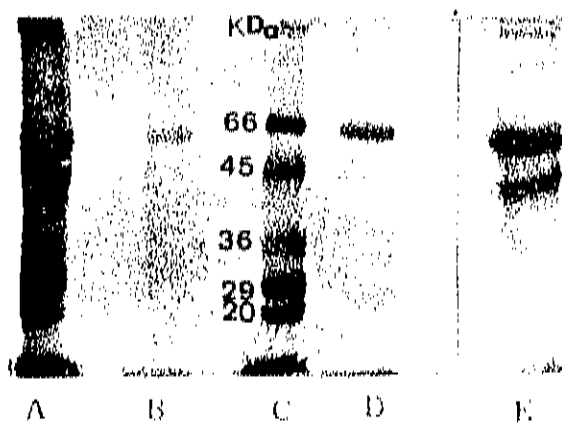


Figura 2.5. Patrón electroforético de las lectinas de palo verde salino en condiciones desnaturalizantes y reductoras. a) extracto crudo salino, b) lavado con buffer fosfato salino, c) estándar de pesos moleculares, d y e) lectinas eluidas con solución glicina-ácido y buffer fosfato salino.

Purificación por Cromatografía de Afinidad en
Minileak - Fetuina

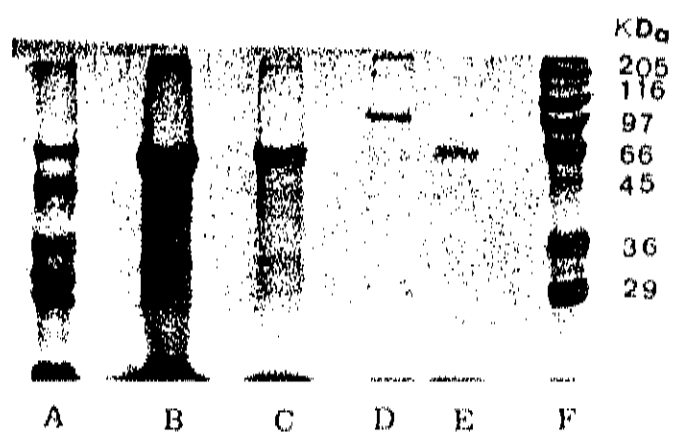


Figura 2.6. Patrón electroforético de las lectinas de palo fierro salino en condiciones desnaturalizantes y reductoras. a) estándar de pesos moleculares, b) extracto crudo salino, c) lavado con buffer fosfato salino, d y e) lectinas eluidas con glicina ácido y buffer fosfato salino, f) estándar de pesos moleculares.

CAPITULO 3

CARACTERIZACION DE LOS ACEITES DE SEMILLAS LEGUMINOSAS DEL DESIERTO SONORENSE

Introducción

Dentro de los compuestos clasificados como lípidos, existen una gran variedad de sustancias que presentan poca similitud en su estructura química, pero todas tienen la particularidad de que son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Los aceites normalmente provienen de fuente de origen vegetal como la soya, algodón, cártamo, ajonjolí, maíz y canola, entre otros. Las grasas y los aceites son nutrimentos fundamentales de la dieta, ya que representan la forma más concentrada de calorías en los alimentos (Benson, 1979).

Tanto las grasas como los aceites están constituidos por ésteres de glicerol y ácidos grasos. Estos ésteres se forman por la combinación de ácidos carboxílicos y alcoholes con pérdida de agua, puesto que la glicerina (glicerol) es un alcohol trioxhidrílico, requiriéndose tres moléculas de ácidos grasos para formar un triglicérido. La mayoría de los ácidos grasos en los alimentos son liniales monocarboxilados, varían en la longitud de la cadena y en el grado de insaturación, conteniendo un número par de átomos de carbonos ya que su metabolismo y aprovechamiento biológico se lleva a cabo

através de moléculas de carbono pares, como es la acetil CoA, cuya función, es regular la oxidación y esterificación del ácido graso, dentro de la célula lipídica (Swern, 1964). Sin embargo, también existen ácidos grasos con número impar de átomos de carbono, pero se encuentran en concentraciones muy bajas en grasas de fuente vegetal como son en las leguminosas convencionales (Bernardini, 1981).

Los ácidos grasos insaturados tienen mayor reactividad química debido a las dobles ligaduras, predominan sobre los saturados, especialmente en los aceites vegetales, y en grasas de origen marino. El ácido monoinsaturado más distribuido es el oléico, encontrándose del 30 al 50 % del total de los ácidos grasos. Dentro de los ácidos poliinsaturados más importantes se encuentran el linoléico, linolénico y araquidónico y de menor importancia en la nutrición es el linolénico (David et al; 1982).

Importancia nutricional. Además de su inegable papel como fuente de ácidos grasos esenciales, los lípidos juegan un papel importante en la nutrición por sus altas aportaciones energéticas. También es ampliamente conocido su papel en el transporte de vitaminas liposolubles (A,D,E y K). Las grasas poliinsaturadas tienden a bajar el nivel de colesterol plasmático, por lo que una dieta a base de lípidos de esta clase (alta relación de ácido graso insaturado/saturado) evita problemas de arteriosclerosis (Davidson, 1975).

Los lípidos alimenticios, constituidos especialmente por triglicéridos, deben sufrir dos tipos de transformaciones para poder ser absorbidos: una emulsificación, conseguida por las sales biliares que conduce a una micro-emulsión y una hidrólisis, aseguradas por las lipasas pancreática e intestinal, las cuales tienen una cierta especificidad de acción: hidrolizar los ácidos grasos en posición externa de las moléculas de triglicéridos. Entonces la absorción se hace bajo la forma de ácidos grasos libres y monoglicéridos, en las primeras zonas del intestino . Los ácidos grasos de cadena corta son absorbidos directamente vía sanguínea; los ácidos grasos largos se modifican en la célula intestinal y reesterifican: los triglicéridos así formados constituyen entonces , los quilomicrones, partículas lipoproteicas muy ricas en lípidos, que entran en el medio interior por la vía linfática. La digestibilidad de lípidos depende de los ácidos grasos que forman los triglicéridos, la cual es mas baja a medida que los ácidos grasos son más largos y que el grado de saturación es más elevado, lo que corresponde a puntos de fusión mas altos. La digestibilidad media de los lípidos en el hombre es del orden del 95 % para las grasas animales y aceites vegetales y del 90 % para los lípidos constituyentes de los cereales y leguminosas (Cheftel et al; 1986; Bernandini, 1981; Anderson et al, 1986).

En las leguminosas de uso común, el contenido de lípidos se encuentra en un rango de (2-47 %) variando según la especie. Las hay ricas en vitamina E y en ácidos grasos poliinsaturados (Arnol, 1983). En algunos casos el contenido de lípidos es bajo en las leguminosas comunes, como las diferentes variedades de frijoles cuyo contenido de grasa es de (0.5-5 %), variando según la especie (Nabhan y Weber, 1985; Bressani y Elias, 1978).

En especies de Acaccia de origen silvestre el contenido de lípido fue desde (1.7-15.7 %), encontrándose, un 3.3 % de grasa para Acacia farnesiana (Sotelo, 1981). La FAO indicó que en diferentes especies de leguminosas, como las lentejas hay un contenido de grasa que varía desde 1.1 a 3.1 % y en las especies de Glycine sp. (soya) su porcentaje de grasa es desde 18 a 23 % (Bressani y Elias, 1978). En las 4 diferentes especies de frijol, de fuente silvestre encontraron valores desde 2.5 a 5.5 % de grasa, y 4.5 % en la semilla de garbanzo; y en las semillas de chicharo el contenido de grasa fue de 3.2 % (Siddhuraju et al; 1992).

Earle y Jones (1960), reportan un contenido de 6.8 % de grasa para Parkinsonia aculeata palo verde; y 6.9 % de grasa para la semilla de Prosopis juliflora mezquite; El estudio realizado por Llano y González (1992) en especies silvestres, en el cual reportan valores de grasa para semillas del mezquite de 15.5 % correspondiente a la especie P. glandulosa,

en la semilla de palo verde Cercidium microphyllum 18.1 %, y para Parkinsonia aculeata palo verde 8.9 % de grasa respectivamente. Mientras que Thorn, et al, (1983) reportan para la especie de palo verde 15.75 % de grasa.

Observando la diversificación del contenido de grasa en especies de fuente leguminosa tanto tradicionales como de origen silvestre, así como la necesidad de buscar nuevas alternativas de alimentación, en este apartado del estudio, se tuvo como objetivo caracterizar fisicoquímicamente los aceites provenientes de las semillas silvestres (brea, palo verde, palo fierro, huizache, palo verde, gatuña y mezquite).

Materiales y Métodos

Cada una de las harinas correspondientes a las semillas de: brea, palo verde 1, palo fierro, gatuña, palo verde 2, huizache y mezquite provenientes de fuente no convencional fueron extraídas con hexano, durante 8 h, de acuerdo al método intermitente soxhlet, según la técnica No 920.39 del A.O.A.C. (1990), en un aparato marca Lab-Line Multi-Unit Extraction Heater. De la micela obtenida posteriormente se separó el aceite a presión reducida a 55°C, mediante un rotavapor marca Bausch-Lomb, el aceite obtenido fue puesto a secar en estufa a 37°C por 2h para eliminar totalmente el poco hexano residual.

Al aceite recuperado de cada una de las semillas se le efectuaron los siguientes índices tanto físicos como químicos. Los análisis fueron realizados por duplicado.

Punto de fusión. Se realizó de acuerdo al método Cc 1-25 del AOCS (1989) mediante el uso de tubos capilares en el aparato Termhal Line point USA.

Índice de refracción. Fue determinado utilizando un refractómetro de Bausch & Lomb Abbe modelo 31. El aceite se aplicó directamente y se calibró con el aceite de inmersión de colores, siguiendo la técnica Cc 7-25 del AOCS (1989).

Índice de Iodo. Se obtuvo de acuerdo al método de Hanus, el cual consiste en colocar el aceite filtrado en un matraz, agregar cloroformo para disolver y posteriormente se le agrega la solución de Hanus. Después de una hora se le agregó ioduro de potasio y agua hervida. Esta reacción es valorada con solución de tiosulfato de sodio 0.1 N. A la vez se realizó una prueba en blanco en las mismas condiciones. El índice de iodo se obtiene de los ml gastados en la muestra al valorarla y los ml gastados en el blanco, los cuales se reportan como mg KI/g. Esta determinación es muy importante ya que nos predice el grado de insaturaciones presentes en el aceite.

Índice de Acidez. Para valorar el grado de oxidación de los aceites se utilizaron 20 g de muestra de aceite, se le agregó una mezcla de solventes (alcohol isopropílico y tolueno, relación 1:1). Se agitó y se le adicionó fenoftaleína para valorar con KOH 0.1 N. El valor del índice se obtuvo al restar los ml gastados al valorar el blanco con los gastados en la muestra que es multiplicado por la normalidad de KOH usada (método Cd 3a- 63 del AOCS, 1989).

Índice de Saponificación. Método Cd 3-25 del AOCS, (1989). Consiste en saponificar el aceite con una solución de NaOH alcohólica, hervir por 30 min hasta saponificación completa, enfriar y valorar con HCl 0.5 N. Se usó fenoftaleína como indicador, se corrió un blanco en las mismas condiciones que la muestra. El valor de saponificación se obtuvo, restando los ml de la muestra y el blanco y dividiéndose entre el peso de la muestra utilizada.

Índice de Peróxido. Para esta determinación se utilizó el método Cd 8-53 del AOCS(1989), el cual consistió en agregar al aceite una solución de ácido acético, Ioduro de potasio y cloroformo dejándose reaccionar por 1 h con agitación ocasional, posteriormente se le agregó agua destilada, la reacción fue valorada con tiosulfato de sodio 0.1 N.

Acidos grasos libres. Para esta determinación se utilizaron 56 g de aceite, los que se homogenizaron con alcohol etílico al 95 %, calentándose por 15 min. Se le agregaron 2 ml de fenoftaleína, para ser valorado con KOH 0.1 N. En la mayoría de los aceites el % de ácidos grasos libres, es calculado como ácido oléico.

Determinación de ácidos grasos. Para la cuantificación de los ácidos grasos se llevó a cabo una saponificación y metilación de los ácidos grasos, con hidróxido de sodio y metanol, de acuerdo al método Ce-27 AOCS, (1970).

La cuantificación de los ácidos grasos se efectuó por cromatografía de gases utilizándose un cromatógrafo Perkin Elmer, modelo 8410, equipado con un detector de ionización de flama y a una sensibilidad de 2×10^{-10} AFS. La columna empleada fue de acero inoxidable de 4 pies de largo X 0.5 plg. de diámetro con empaque DEGS 10% sobre un soporte de 80/100 chromosorb W-HP, usándose el nitrógeno como gas acarreador a una velocidad de flujo de 15 ml/min. La temperatura del detector y del inyector fue de 200°C. Los datos fueron procesados en un integrador del cromatógrafo. Todos los aceites se analizaron por duplicado.

Resultados y Discusión

El porcentaje de aceite obtenido (Tabla 1.1), para cada una de las semillas en este estudio fue de 8.5 % en la semilla de palo verde 2, 10.3 % en la semilla de palo fierro, encontrándose en la semilla de huizache 12 %, en brea 16.5 %, palo verde 1 18.2 %, en el mezquite 14.5 % y en gatuña 23.5 % de aceite. La mayor concentración de aceite se encontró en la semilla de gatuña, siguiéndole palo verde 1, brea y mezquite y el contenido mas bajo se presentó en las semillas de huizache, palo verde 2 y palo fierro. Estos contenidos al ser comparados con fuentes oleaginosas tradicionales, se encontró a la semilla de palo verde 1 con un porcentaje de aceite igual al reportado para la soya 18.7 %; el porcentaje de aceite de gatuña se obtuvo cercano al del ajonjolí 27 %. Esta semilla presentó mayor contenido que la soya y el maíz (4.5 %). En general se puede considerar que los porcentajes en estas especies son comparables con la mayoría de las fuentes de uso tradicional.

Los aceites analizados, mostraron un alto grado de insaturación el cual se vió reflejado en el Índice de Iodo. En la Tabla 3.1 se aprecian índices de iodo, desde un 101 a 147. El aceite de gatuña (con 147) está por arriba de las fuentes tradicionales usadas para comparación en este estudio. El índice de iodo correspondiente al aceite de las semillas de

Tabla 3.1 Análisis Fisicoquímicos de los Aceites

Bonilla	P.F. °C	I.R. 25°C	I.J. mg KI/g	I.A. mg KOH/g	I.B. mg NaOH	I.P. mg/g	AGL %
<i>C. Bonoraa</i> (Brea)	-13 a 10	1.4725	131	0.7012	81	3.7	0.710
<i>C. Microphyllum</i> (Palo verde 1)	-10 a 7	1.4815	136	0.5618	79	3.6	0.516
<i>O. Teocle</i> (Palo fierro)	-13 a -8	1.4735	101	0.5225	78	5.6	0.603
<i>N. grahamii</i> (Gatufa)	-13 a 10	1.4525	147	0.4207	100	4.3	0.327
<i>P. aculeata</i> (Palo verde)	-10 a -8	1.4735	134	0.6013	82	3.8	0.700
<i>A. farneziana</i> (Huizache)	-13 a -10	1.4825	136	0.5863	80	3.5	0.610
<i>P. suliflora</i> (mezquite)	-10 a -7	1.4515	130	0.6325	76	2.8	0.721
<i>G. max</i> (Soya) ^a	-13 a -10	1.4740	130	1.2000	192	7.3	0.501
<i>H. arbut</i> (Girasol) ^b	-10 a -9	1.4732	130	0.6714	191	6.2	0.631
<i>Z. mays</i> (Maiz) ^a	-11 a -8	1.4721	115	0.5125	98	3.5	1.301
<i>B. napia</i> (colza) ^b	-10 a -7	1.4734	108	1.0000	170	3.2	0.5631
<i>P. parviflora</i> (uña de gato) ^c	-13 a -9	1.4741	110	0.5610	157	5.3	0.6131

^a Bayles, 1979; ^b Bernardini, 1960 ^c Ortega, 1989.

brea y mezquite, es similar al de soya y girasol. A excepción del aceite de palo fierro, todos los provenientes de semillas silvestres están por arriba de los índices reportados para maíz, colza, coya, girasol y uña de gato.

Por otro lado, tenemos que los índices de acidez (I.A), peróxidos (I.P) y el contenido de ácidos grasos libres (A.G.L), fueron bajos. Los aceites de colza y soya, cuyo índice de acidez es relativamente alto, deben ser refinados antes de ser procesados para bajar esta índice y otros como el contenido ácidos grasos libres, y de peróxidos. Es importante mencionar que los aceites del presente estudio, fueron analizados en su estado crudo sin ser refinados o neutralizados, resultando de muy buena calidad. Los valores de los puntos de fusión y de los índice de refracción fueron similares en todos los analizados, así como en los aceites de fuentes comparativas. Todos están dentro de lo normal ó establecido por las normas del A.O.C.S. (Asociación Americana Química de Aceites).

Los resultados obtenidos en la composición de ácidos grasos, de los aceites de las semillas estudiadas se presenta en la Tabla 3.2 y en las Figuras (3.1-3.7), se presentan los cromatogramas individuales para cada aceite. El porcentaje total de ácidos grasos insaturados es muy alto, 86 %, obtenido de la suma de los ácidos grasos como el oléico (18:1), linoléico (18:2), linolénico (18:3), palmitoléico (16:1),

Tabla 3.2 Composición de Ácidos Grasos de los Aceites de Semillas Silvestres

Semilla	Palmitico %	Palmitoleico %	Estearico %	Oléico %	Linoléico %	Arquidónico %	Linoléico %	Arquidónico %	Eúicoico %
C. <u>Sonchifera</u> (Breal)	8.3963	0.2388	4.1846	36.5554	47.0836	1.0018	0.5517	1.5628	0.4246
C. <u>microphyllum</u> (Palo Verde 1)	12.6208	0.6872	9.0468	51.8643	21.1928	1.7160	0.6368	1.5842	0.7091
E. <u>aculeata</u> (Palo Verde 2)	7.6430	0.1867	4.6915	35.7082	47.6176	1.6519	0.5639	1.6273	0.3096
O. <u>leucota</u> P. Palo Hierro	8.2478	0.2153	4.5459	35.5429	49.9526	0.9959	0.5708	0.7564	0.2096
M. <u>strobilifera</u> (Gallina)	8.0560	0.2287	3.8829	35.0280	50.1079	0.9290	0.5680	0.9805	0.2185
A. <u>(arnesiana)</u> (Huizache)	7.5351	0.2092	5.0745	17.9145	67.3458	0.4378	0.8516	0.331	-
P. <u>multiflora</u> (Merquite)	7.8940	0.2087	4.1031	34.4999	50.6024	1.0317	0.5978	0.8434	0.2224
G. <u>max</u> (Soya)*	11.000	0.5202	4.3621	28.1231	50.1002	1.0281	8.1203	0.5432	1.5421
H. <u>annua</u> (Girasol)*	3.600	0.2871	2.9012	34.0123	57.1201	1.2264	0.8712	1.1864	2.3651
Z. <u>maiz</u> (Maiz)*	7.800	0.2031	3.6100	46.1002	41.0000	0.4352	0.7653	0.8542	2.3219
P. <u>parviflora</u> * (uma de gato)	8.1400	0.4532	3.7210	34.3421	52.1100	-	0.4332	0.2143	1.1234

* Baileys, 1979.

araquidónico (20:4) y erúcico (22:1). Estos porcentajes son muy similares a los presentados por las semillas comerciales como se observa en la Tabla 3.3. Lo que concuerda con los índices reportados en la Tabla 3.1. Dentro de los ácidos grasos insaturados predominó el linoléico, a excepción de la semilla de palo verde 1 que tiene mayor contenido de oléico (Figura 3.4). El porcentaje total de ácidos grasos saturados fue relativamente bajo (14 %), obtenido de la suma de los ácidos grasos como el palmítico (16:0), esteárico (18:0) y araquídico (20:0). Predominando el ácido palmítico, como se aprecia en las (Figuras 3.2, 3.5 y 3.6).

La concentración del ácido oléico fue de 17 a 51 %, encontrándose la menor proporción en el aceite de huizache y la mayor en el aceite de palo verde 1. Sin embargo el contenido de oléico en el aceite de huizache (17.9%) es mayor que el reportado para el aceite de cártamo (15.7%). En sí el porcentaje de oléico en todos los aceites silvestres fue mayor que el reportado para el aceite de soya y girasol, mas aún en el aceite de gatuña el porcentaje de oléico obtenido es mayor que, el contenido en todos los aceites comestibles.

El contenido del ácido linoléico es 21.19 al 67.34 %, el mayor porcentaje es en el aceite de huizache, el cual es similar al reportado en cártamo, en gatuña y mezquite, los cuales se encuentran en una concentración (50 % de linoléico), que es igual al porcentaje del aceite de soya, y de los

aceites de brea, palo fierro y palo verde 2, y fue mayor al aceite proveniente del maíz .

En cuánto al ácido graso linolénico se obtuvo en todos los aceites silvestres en concentraciones muy similares a las reportadas en girasol, maíz y cártamo. El ácido erúcico se obtuvo en concentraciones menores al 0.7 % menor a lo reportado en fuentes comestibles. El ácido erúcico es considerado tóxico en niveles mayores al 5 %, Las fuentes comestibles, como la de colza ó canola, reciben un tratamiento industrial para reducirlo (Christie, 1972).

Tabla 3.3 Composición total de ácidos grasos saturados e insaturados de los aceites de semillas silvestres.

Aceites	Insaturados %	Insaturados %
<i>C sonorae</i> (Brea)	86	14
<i>C microph</i> (Palo verde 1)	76	23
<i>P aculeata</i> (Palo verde 2)	86	14
<i>O tesota</i> (Palo fierro)	86	14
<i>M grahamii</i> (Gatuña)	87	13
<i>A farnesiana</i> (Huizache)	87	14
<i>P juliflora</i> (Mezquite)	87	14
<i>G max</i> (Soya) ^a	89	16
<i>H anum</i> (Girasol) ^a	96	8
<i>Z may</i> (Maiz) ^a	90	12
<i>P parviflo</i> (Uña de gato) ^b	87	12

a: Baileys, 1979; b: Ortega, 1989.

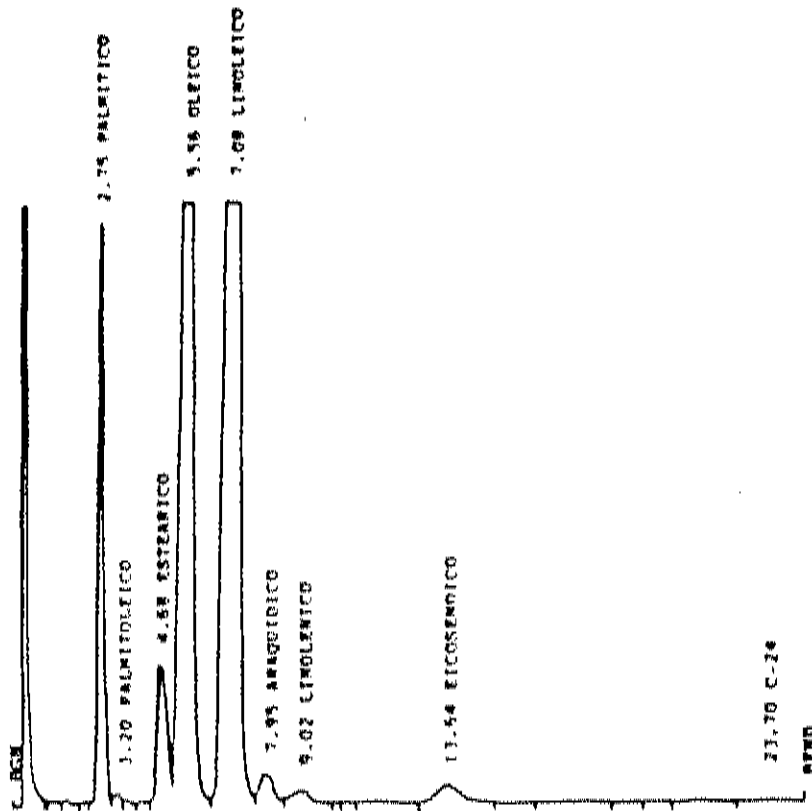


Figura 3.1 Cromatograma del aceite de Gatuña Mimosa grahamii.

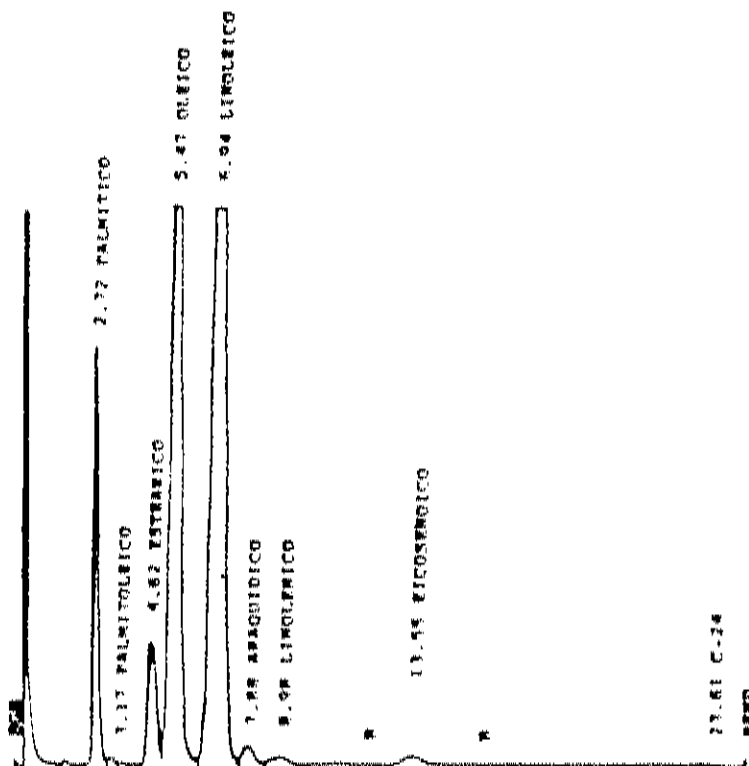


Figura 3.2 Cromatograma del aceite de Palo fierro Oleya tesota.

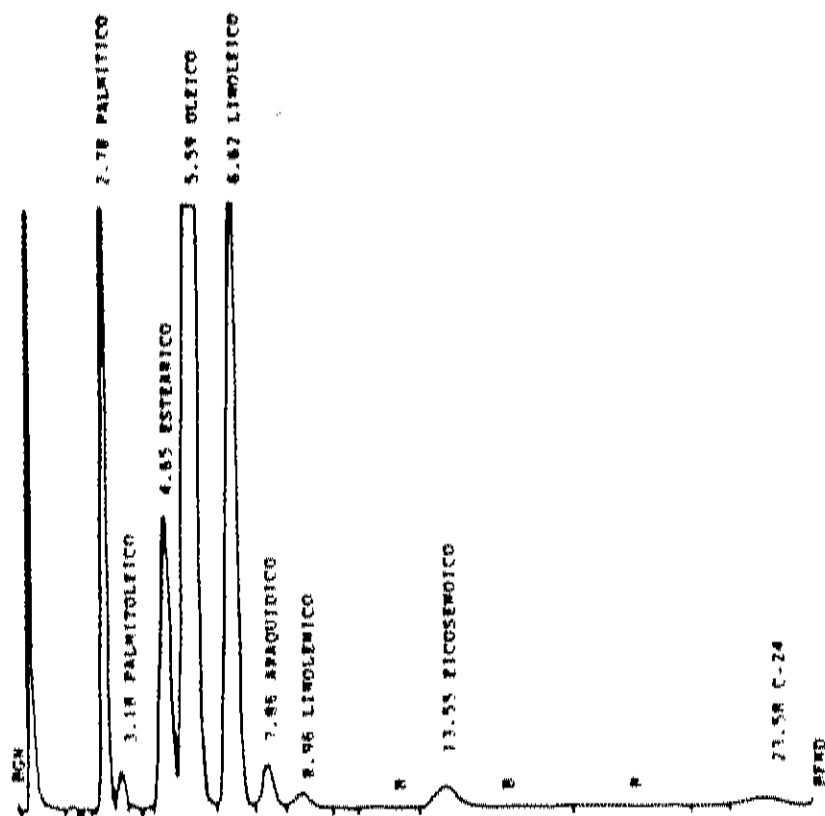


Figura 3.3 Cromatograma del aceite de Palo verde 1 *Cercidium microphyllum*.

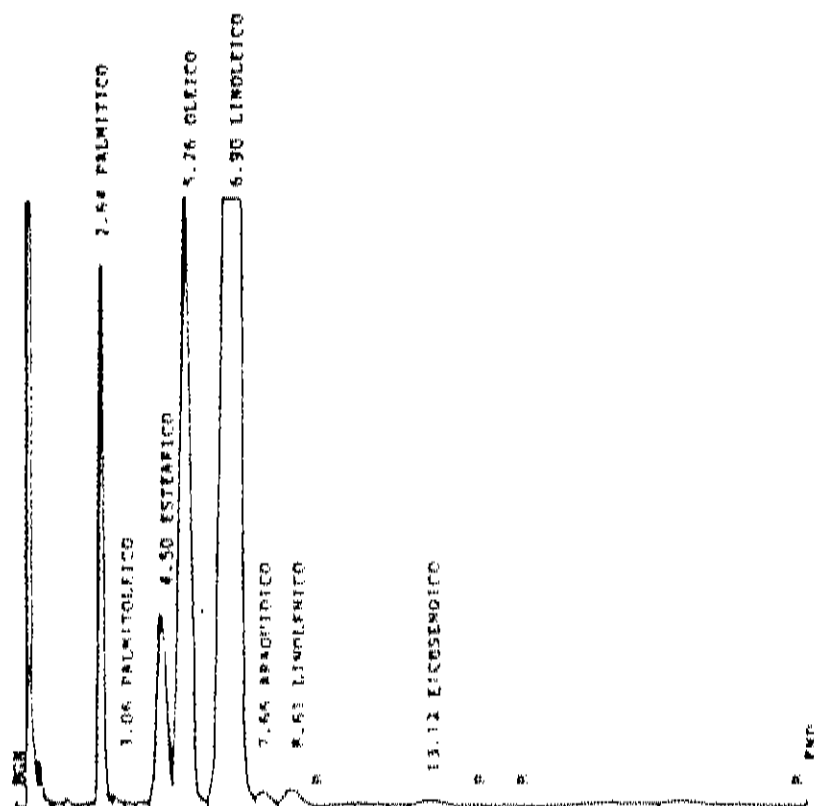


Figura 3.4 Cromatograma del aceite de Huizache *Acacia farnesiana*.

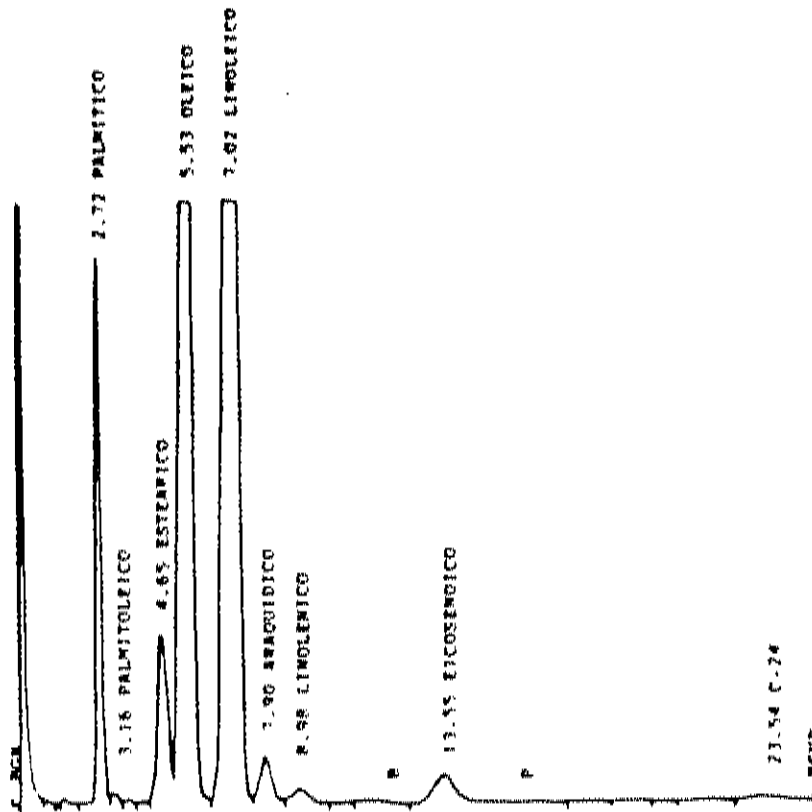


Figura 3.5 Cromatograma del aceite de Palo verde 2 *Parkinsonia aculeata*.

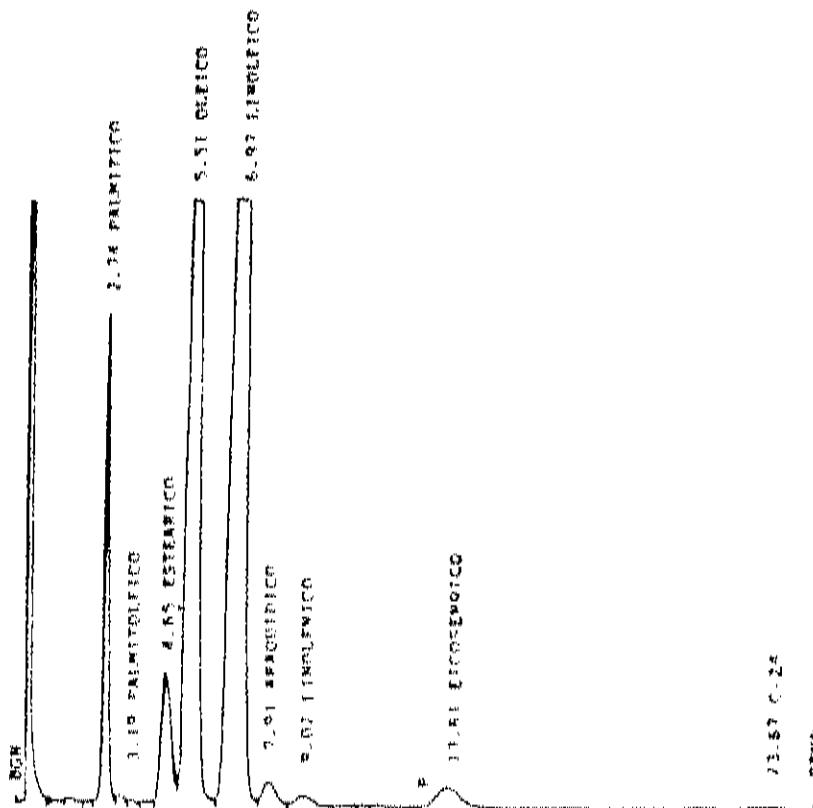


Figura 3.6 Cromatograma del aceite de Brea *Cercidium sonchae*.

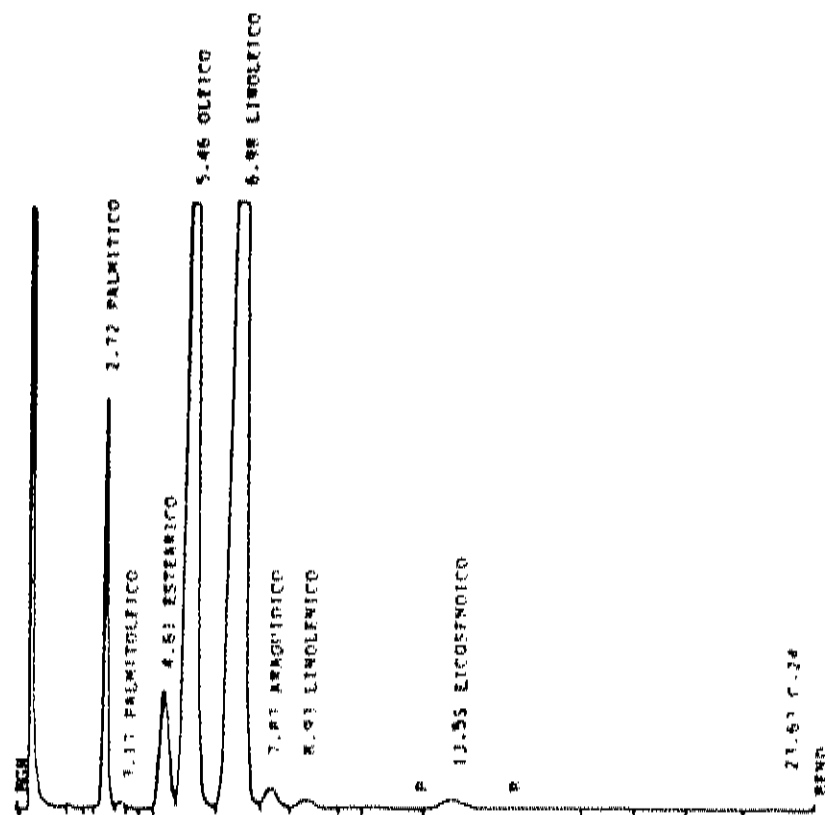


Figura 3.7 Cromatograma del aceite de Mezquite *Prosopis juliflora*.

CONCLUSIONES

El contenido de proteína de las semillas provenientes de fuente silvestre se encontró en concentraciones mayores al reportado para las leguminosas tradicionales como: garbanzo, frijol común y chícharo. Al evaluar la calidad de la proteína, la mayoría de las semillas silvestres tuvieron valores de digestibilidad ligeramente más altos que los reportados para las convencionales. Solo la semilla del mezquite tuvo una digestibilidad más baja, comparable a la del chícharo. Las digestibilidades in vitro aumentaron al someter las harinas a un tratamiento térmico, lográndose para la semilla de gatuña una digestibilidad muy cercana a la de la caseína. Como en todas las leguminosas, en estas fuentes silvestres sus proteínas presentaron deficiencia en aminoácidos azufrados, pero a la vez son altas en lisina y fenilalanina. Los valores del C-PER indican que la calidad de las proteínas es buena, por lo que las harinas, podrían en la producción de alimentos fortificados tales como tortillas, pastas y galletas. Tal es el caso del uso que se está dando a la harina de mezquite, en Brasil y México.

Con excepción de la semilla de gatuña, todas las demás presentaron niveles bajos de algunos factores antifisiológicos como: inhibidores de tripsina, fenoles, saponinas, alcaloides y lectinas. Se purificaron y caracterizaron parcialmente las

lectinas de palo verde 2 y de palo fierro. La lectina del palo verde 2 presenta dos subunidades con pesos moleculares distintos (66 y 45 kDa) y de la semilla de palo fierro se aislaron dos lectinas distintas, una de 97 y otra de 66 kDa. Los pesos moleculares encontrados en estas dos especies son muy diferentes a los reportados en otras leguminosas.

La calidad y el contenido de aceites de las semillas analizadas fue igual y en algunos casos superior al de los comestible como el de soya, girasol y maíz; por lo que podrían servir como alternativa a estos.

De las semillas estudiadas, la de Mimosa grahamii (gatuña) presenta el mayor potencial para ser explotada como fuente alimentaria tanto de proteína como de aceite.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, I. E. (1988). Evaluación de la Calidad Proteica en Granos de Leguminosas por Métodos in vivo. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. México.
- Almeida, N.G. (1988). Elaboración, Evaluación, Empacado y Estudio de Anaqueil de Botanas con Proteína de Alta Calidad. TESIS MAETRIA. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. México.
- Aman, P. (1977). Carbohydrate in raw and Germinated Seeds from Mung Bean and Chickpea. J.Food Sci. Agric. 30:869-875.
- Antunez, P.L. and Sgarbieri, V. (1980). Effect of Heat Treatment on the Toxicity And Nutritive Value Of Dry Bean Phaseolus vulgaris Var. Roshira, Proteins. J. Agric. Food Chem. 28, 935.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemist. (1984). Official Methods of Analysis. 14th. Ed. Sidney Williams. Ed. Arlington. Virginia. USA.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th. edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- AOCS. American Oil Chemists Society. (1989). Official and Recommended Practices of the Amer. Oil Chem. Soc. Champaign, IL.
- Aykroyd, W. R. and Doughty, B.G. (1964). Legumes in Human Nutrition. FAO. Food and Nutrition Seris. No. 12. Roma.
- Badui, D. S. (1984). Química de los alimentos. 2da Edición, Editorial Alhambra Universidad. pp.420-418.
- Baileys, A. E. (1979). Aceites y Grasas Industriales. ed. Reverte, Argentina. S.C.A. Vol.II, PP. 432-501.
- Barclay, A.S. and Earle, F.R. (1974). Chemical Analyses of Seeds III, Oil and Protein Content of 1253 Species. Economic Botany 28: 178-236.

- Barrón, J.M. (1984). Textural, Nutritional Toxicological Quality of Pinto Bean (Phaseolus vulgaris L. UI-111). D. pH. Tesis. Queen Elizabeth College. Londres, Inglaterra.
- Benson, L. (1979). Trees and Shrubs of the Southwestern Desert. 3rd. ed. the University of Arizona Press, Tucson, Arizona. p.416.
- Bernardini, E., y Franco, J.B. (1981). Tecnología de Aceites y Grasas. Ira. ed. Editorial Alhambra. Madrid España.
- Bidwell, R.G.S. (1987). Fisiología Vegetal. Ia. Edición, AGT Editor, pag. 206 y 208.
- Bourges, H. (1987). Las Leguminosas en la Alimentación Humana en: Cuadernos de Nutrición. Publicación del Instituto Nacional de la Nutrición, Conasupo y sus Empresas Industriales. 10: 17, 32.
- Bourges, H., Valencia, M. (1987). Análisis de la Composición de los Alimentos en México. Antecedentes, Situación Actual y Perspectivas. Archivo Latinoamer. Nutr. XXXVII (4):785.
- Bressani, R. and Elias, L. (1974). Legumes Foods. In New Protein Foods. Altschul, A.M. (ed). Academic Press, New York. Vol.1, pp. 230-297.
- Bressani, R. (1975). Addition of amino acids to foods. In: Nutritional Evaluation of Food Processing. Second edition. The AVI Publishing company, Inc. U.S.A. pp. 579-590.
- Bressani, R. and Elias, L. (1978). Nutritional Value of Legume Crops for Human and Animal. INCAP, p. 30-40.
- Bressani, R. , Elias, L.G. (1979). The Nutritional Role of Poliphenols in Beans. Proc. Symp. Polyphenols in Cereals and Legumes. IFT, St. Louis, Mo.
- Brune, M., Hallberg, L. and Skanberg, A. (1991). Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. Journal of Food Science Vol. 56:128-131.
- Calderón de la Barca A.M. and Vázquez Moreno L. (1988). Amaranthus cruentus Lectin: Purification, Stability, and Biochemical Properties. J. Food. Biochem. 12, 117-126.

- Cannet, B., and Valenzuela, M. (1984). Efecto de los Tratamientos Térmicos Sobre la Calidad Nutricional del Frijol Pinto Phaseolus vulgaris. tesis UNISON.
- Cohen, S.A., Tarvin, T.L., and Bidlingmeyer, B. (1984). Analysis of Amino Acids Using Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. Science Vol 32. PP 225-230
- Christie, W. (1972). Topics in Lipid Chemistry, Vol.3. Edited by Logos Press, London, England, pp. 171-83.
- Davidson, S.R., Passmore, J.F. and Truswell, A. (1975). Human Nutrition and Dietetics. Churchill Livingstone LTD. New York. pp. 73-90, 142-150.
- Del Valle, F.R., Escobedo, M., Muñoz, M., Ortega, R. and Bourges, H. (1983). Chemical and Nutritional Studies on Mezquite Beans (Prosopis juliflora). J. of Food Sci. Vol. 48:914.
- Dominguez, J. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica, Cap. 11, pp.159- 183. Editorial Limusa.
- Duffus, C. y Slaughter, C. (1985). Las Semillas y sus Usos. Ira. ed. AGT. México, D.F. PAG. 31-33.
- Earle, F. R. and Jones, Q. (1960). Analyses of Seed Samples from 113 Plant Families. Economic Botany. Vol. 16 pp 221-226.
- Elias, L.G., y Bressani, R. (1976). Composición Química y Valor Nutritivo de Algunas Leguminosas de Grano Turrialba. INCAP. 26 (4) :375
- Eliás, L.G., Fernández, D.G. and Bressani, R. (1979). Possible effects of Seed coat Polyphenolics on the Nutritional Quality of Bean protein. J. of Food Sci. 44 (2): 523.
- Erickson, D.R. (1990). Elaboración de Mantecas y Margarinas a partir del aceite de Soya. American Soybean Association. St. Louis, Missouri. Cap.2. pp.1-68.
- FAO: (1970). Contenido en Aminoácidos de los Alimentos y Datos Biológicos sobre las Proteínas, Estudios sobre Nutrición No. 24, FAO, Roma.

- Felger, S.R. and Nabhan, G.P. (1978). Agroecosystem: A Model from the Sonoran Desert. In: Social and Technological Management in Dry Lands. Past and Present, In degenous and imposed, ed. AAAS, selected Symposium, No. 10, p 129-148.
- Felger, R.S and Nabhan, G.P. (1976). Deceptive barrenes Ceres. FAO Rev. and Revel. 50:34.
- Figueiredo, A.A. (1990). Mezquite: History Composition, and Food Uses. Food Technology. Vol. 44 (11): 118-128.
- Goldstein, J. and Swain, T. (1965). The Inhibition of Enzymes by tannis. Phytochemistry 4:185-189.
- González, A.M., y Serna, S.O. (1988). Effect of Deffated Soybean and Soybean Isolate Fortification on the Nutritional, Physical, Chemical and Sensory Properties of Wheat Flour Tortillas. J. Food Sci. 53(3): 579.
- Gros, E., Pomilio, D. y Burton, G. (1985). Alkaloids: Isolation and Purification. J. of Chemical Education. Vol. 68 pp 701-703.
- Hamerstrand, G., Black, E. and Glober, J, (1981). Trypsin Inhibitors in Soy Products: Modification of the standard analytical procedure. Cereal Chem. 58, 19:42-45.
- Harbone, J.B. (1984). Phytochemical Methods, 2da. Edition, Chapman y Hill. pp. 271-280.
- Haslam, E. (1974). Polyphenols-Protein Interaction, J. Biochemistry. 139: 285-288.
- Hegsted, D.M. (1965). Protein Utilization in Growing Rats. I. relative Growth Index as a Biossay Procedure. J. Nutr. 85 (2):159
- Hernández, M. y Bourges, H. (1983). Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico. Publicación L-12 de la División de Nutrición. Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", México, D,F.
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L. and Miller, G. (1977). A Multienzime Technique for Estimating Protein Digestibility. J. Food Sci. 42: 1229-1232.

- Hsu, H.W., Sutton, N.E., Satterlee, L. and Kendrick, J. (1978). The C-PER and PER. Assays for Protein Quality. Food Technol. 32 (12): 69-72.
- Jaffe, W. (1980). Hemagglutinins (Lectins). In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, 2da. Irvin E. Liener. Academic Press Inc. New York. pp. 103-136.
- Janzen, G. , Liener, D. (1976). Nutritional Evaluation of Soy Flour Produced by Dry Heat Roasting. J. of Food Sci. 43:1350-1352.
- Kakade, M., Rackis, J. and Pusky (1979). Determination of Tripsin Inhibitor Activity of Soybean Products. A collaborative analysis of and improved procedure. Cereal Chem. 31-37.
- Kumar, R., and Singh, M. (1954). Tannins. Their Adverse Role in Ruminant. J. Agric. Food Chem. 32-44.
- Langford, A.R. (1969). Uses of Mezquite. In: Literature on the Mezquite of North America and annotated bibliography International Center for arid and semiarid studies. J. L. Shuster ed. University Lubbock, Texas. pp. 20-32.
- Liener, I.E. and Kakade, M. (1980). Protease Inhibitors. Toxic Constituents of Plants Foodstuffs. Academic Press. New York.
- Liener, I.E. (1981). The Nutritional Significance of the Plants Lectins. In: Antinutrients and Natural Toxicants in Foods, Robert Ory editor. Food Nutrition Press. Inc. pp. 143-153.
- Lis, H. and Sharon, N. (1986). Biological Properties of Lectin In: Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Liener, I.E., and Goldstein, J. Academic press, pp. 265-291.
- Livingston, A., Teuber, R., Hesterman, O. and Tsai, L. (1984). Minimizing the Saponin Content of Alfalfa and Leaf Protein Concentrates. In: Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety. Plenum Press. New York. pp. 254-265.
- Lowgren, M. and Liener, I.E. (1986). The Effect of Slow-Cooking on the Inhibitor and Hemagglutinating Activities and In vitro digestibility of brown beans *Phaseolus vulgaris* In plants food human nutrition. 36:147-154.

- Lowry, D. H., Rosebrough, N.I., Farr, L. and Randal, R. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- LLano, J.M. y Gonzalez R. (1992). Análisis Químico Próximo y Contenido Calórico en Semillas de Diferentes Especies de Leguminosas del Desierto Sonorense. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Mc Parlane, J.A. (1975). Legumbres Secas en el Manejo de los Alimentos In: Jamienson y Jher Editor. Vol.II. Pax-Mex. pp. 217-221.
- Meiners, C.R., Derise, N.L., and Berry, J.W. (1976). The Content of Nine Mineral Elements in Raw, Cooked Mature Dry Legume. *J. Food Chem.* Vol.24, 6:1126-131.
- Moore, S., and Stein, W. (1972). Histochemical Characterization Glycoproteins Presents in Jejunal and Colonic Globet and Colonic Globet Cell of Pig on Different Diets. *Histochemistry*, 87: 189-194.
- Nabhan, G.P., Weber, C., and Berry, J.W. (1985). Variation in Composition of Hopi Indian Beans. *Ecology of Food and Nutrition*. Vol. 16: 135-152.
- Penella, J.E. (1978). Algunos Cambios en la Dieta del Mexicano. *Cuadernos de Nutrición*. 11(2):33-37.
- Phillips, D.E., Thompson, A. and Boulter, D. (1981). Protein quality in Seed meals of *Phaseolus vulgaris*. *J. Sci. Food Agric.* 32:423-432.
- Pomeranz and Bechtel, (1978). Structure of Cereal Grains as Related to the end use Properties. In: *Cereals, Better Nutrition for the Worlds Millions*. ed. Pomeranz. y American Association of Cereal Chemist, Inc.USA.
- Pusztai, A. (1989). Lectins. In: *Toxicity of Plants Origin* Vol. 111. CRC press. pp.29.
- Pusztai, A., Ewen, S., Grant, G., Peumans, J., Van Dame, E., and Rubio, A. (1991). Plant (food) Lectins a Signal Molecules: Effects on the Morphology and Bacterial Ecology of Small Intestine. *Lectin Reviews*, Vol.1 pp. 1-15.

- SARH. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (1992). Planeación Agrícola. Información Personal. Hermosillo, Sonora, México.
- Satterlee, L.D., Kendrick, J.G., and Marshall, H. (1982). In vitro Assay for Predicting Protein Efficiency Ratio as Measured by Rat Bioassay. J. Assoc. of Anal. Chem. 65, 798-808.
- Satterlee, L.D. (1984). The C-PER a Rapid Assay for Protein Nutritional Quality. J. Food. Qual. 6(3):153.
- Sgarber, V., and Whitaker, J. (1982). Physical, Chemical and Nutritional Properties of Common Bean Proteins. In: Advances in Food Research, Vol 28, 93-114.
- Sharon, N. and Lis, H. (1972). Lectins: Cell-Agglutinating and sugar specific proteins. Science. 177:949-959.
- Shreve, F. and Wiggins, I.L. (1986a). Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford University Press, EUA, Vol. 1, P. 143-176.
- Shreve, F. and Wiggins, I.L. (1986 b). Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford University Press, EUA, Vol.11. p. 1231-1265.
- Singleton, V. (1973). Plant Phenolics. In: Toxicants Occurring Naturally in Foods. National Academy of Sciences. 2da. ed. pp. 309-346.
- Sotelo, A. (1981). Leguminosas Silvestres, Reserva de Proteínas para la Alimentación del Futuro. Información Científica y Tecnológica, Vol. 3, 54:28.