

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION NUTRITIVA DE  
LEGUMINOSAS SILVESTRES

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

119

JAIME DIAZ DE SANDI BARRERA  
MARIA GENOVEVA URIBE ALCOCER  
JOSE ADOLFO DE LA VEGA RODRIGUEZ

ASESOR DE TESIS:

M. EN C. ANGELA SOTELO L.

México, D. F.

1976



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

CLAS TEBIS 1976

AÑO M. J.

FECHA 118

RECIBO \_\_\_\_\_

1 \_\_\_\_\_



QUINCE

PRESIDENTE: Ninfa Guerrero de Callejas  
V O C A L : Enrique García Galiano  
SECRETARIO : Angela Sotelo López  
PRIMER SUPLENTE: Alejandro Garduño Torres  
SEGUNDO SUPLENTE: Miguel Hernández Infante

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA:

División de Estudios Superiores, Facultad de Química, U. N. A. M.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DE LOS SUSTENTANTES:

Jaime Díaz de Sandi Barrera Jaime Díaz de Sandi  
María Genoveva Uribe Alcocer M. Genoveva  
José Adolfo de la Vega Rodríguez J. Adolfo

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS:

Angela Sotelo López Angela Sotelo López



CON AGRADECIMIENTO Y CARIÑO A NUESTROS PADRES

JAIME Y MARTHA

MANUEL Y BLANCA

ADOLFO Y MA. DE LOS ANGELES

A NUESTROS HERMANOS

A NUESTROS MAESTROS

A NUESTROS PARIENTES Y AMIGOS

A LA M. EN C. ANGELA SOTELO L.  
Y AL DOCTOR FRANCISCO GIRAL G.  
EN AGRADECIMIENTO POR EL  
INTERES QUE MOSTRARON DURANTE  
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

QUEREMOS EXPRESAR NUESTRO AGRADECIMIENTO  
A LA ORGANIZACION DE ESTADOS AMERICANOS  
BAJO CUYO PATROCINIO SE REALIZO EL PRESENTE  
TRABAJO .

## CAPITULOS

- I. OBJETIVO
- II. INTRODUCCION
- III. GENERALIDADES
  - Aspectos generales
  - Aspectos históricos
  - Cualidades nutricionales y de cultivo
  - Composición de las leguminosas
  - Tóxicos presentes en las leguminosas
  - Producción y consumo
- IV. PARTE EXPERIMENTAL
- V. METODOS
- VI. RESULTADOS
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. REFERENCIAS

## OBJETIVO

Tomando en cuenta la necesidad que se tiene de proveer de mayor cantidad de proteínas de buena calidad a los grupos de población que más lo necesitan, y debido al poco conocimiento que se tiene de la mayoría de las leguminosas en el mundo y específicamente en México, en este trabajo se trata de realizar una investigación sobre las leguminosas silvestres distribuidas en la República Mexicana, en lo relativo a su valor nutritivo y algunos de sus aspectos toxicológicos.

El estudio se ha dividido con este objeto en varias partes:

- 1o. - Analizar la composición de las leguminosas dando prioridad al contenido de proteínas.
- 2o. - Detectar la presencia y cantidad de algunos tóxicos en estas leguminosas, como son: Alcaloides, Inhibidores de tripsina y hemaglutininas.
- 3o. - Dar un tratamiento a las semillas y ver que tan eficiente resultó dicho tratamiento para la destrucción de los tóxicos.
- 4o. - Realizar la evaluación biológica de las leguminosas que por pruebas químicas resulten interesantes como posibles alimentos.

## INTRODUCCION

Los estudios realizados recientemente indican que dos terceras partes de la población mundial no cuentan con una alimentación adecuada. Un análisis más detallado de estos estudios, nos permite concluir que es la población de los países subdesarrollados la que presente dicha deficiencia alimenticia. Esto ha provocado que la población mundial se encuentre dividida en dos grandes grupos:

El de los países en vías de desarrollo o países con deficiencias alimenticias y el grupo formado por los países desarrollados o países que cuentan con suficientes alimentos.

Es interesante señalar que algunos de los países subdesarrollados cuentan con igual o más recursos naturales que los países desarrollados. Desgraciadamente aquellos se ven en la necesidad de exportar algunos de sus recursos naturales con el fin de obtener divisas para equilibrar su economía. Como consecuencia de esto, limitan aún más su consumo de alimentos de buena calidad.

El problema de una alimentación deficiente no se manifiesta aislado, sino que trae consigo otra serie de consecuencias, provocando con esto que el progreso en los países que la presentan se estanque.

Para solucionar este problema uno de los propósitos de la F.A.O. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), es estimular la producción de alimentos y su mejor distribución en el mundo, así como elevar los niveles de nutrición especialmente en los

países pobres.

A pesar de cuanto se ha hecho, el problema del hambre sigue sin resolverse y amenaza con adquirir mayor gravedad, sin embargo es importante señalar que esta gravedad podría disminuir considerablemente si se tomaran las medidas necesarias tanto de los grupos de investigadores sociólogos como científicos.

Una de las posibles soluciones científicas al problema de la malnutrición protéica es la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos protéicos que, suplementados a los alimentos tradicionales como concentrados protéicos mejoren la calidad de la dieta.

Se piensa que una de estas nuevas fuentes de alimentos son las leguminosas por las siguientes razones:

1. - Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se sabe que existen más de 600 géneros y 13,000 especies, de las cuales 4,000 están en América, siendo que de este gran número sólo son de importancia económica de 10 a 12 géneros.
2. - Por su alto nivel protéico que varía de 17 a 26%, con excepción de la soya que tiene 36%.
3. - Porque son un suplemento natural de los cereales con respecto a las proteínas.

4. - Sus precios en el mercado pueden ser accesibles aún para los estratos socioeconómicos más bajos.

5. - Por su facilidad para ser almacenados y secados.

6. - Benefician de manera indirecta a la agricultura ya que en simbiosis con bacterias, enriquecen el suelo donde se encuentran.

No obstante, las leguminosas presentan algunas desventajas nutricionales, como son la presencia de tóxicos (alcaloides, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, etc.), son de difícil digestión, sus proteínas no son de buena calidad. Pero algunas de estas desventajas pueden ser superadas favorablemente por métodos sencillos.



## GENERALIDADES

### Aspectos generales

Las leguminosas, como se ha mencionado en la introducción, constituyen una familia extensa que comprende unos 600 géneros y más de 13,000 especies. Las leguminosas ocupan el segundo lugar en orden de importancia entre las familias de las plantas provistas de semillas (1).

Esta familia, está tal vez, mejor representada que las gramíneas, respecto a la cantidad de plantas útiles al hombre, además es una de las más ricas en especies típicas de los países americanos, aproximadamente 4,000 especies.

Comprenden plantas de los más variados tipos y habitats, como son hierbas, lianas y grandes árboles. Presentan gran adaptabilidad para desarrollarse en todos los climas y altitudes, desde los trópicos hasta las regiones montañosas y subárticas.

El nombre de la familia de las leguminosas, *Leguminosae* se deriva de la palabra "legumbre" que es el nombre que se dá al fruto (vaina) característico de las plantas de esta familia (2), (3). Las leguminosas se dividen en tres subfamilias en base a sus características florales: *Papilionáceas*, *Caesalpináceas* y *Mimosáceas*.

Casi todas las leguminosas utilizadas como alimento, tanto para el hombre como para animales domésticos, pertenecen a la subfamilia de las Papilionáceas; son plantas principalmente herbáceas, anuales, que crecen en todo el mundo. El ser humano solo come en cantidades apreciables - unas 20 especies de esta gran subfamilia que han sido investigadas por - los nutricionistas.

Las otras dos subfamilias son principalmente arbustos y árboles que crecen en los trópicos. Su valor económico está representado por la utilidad que presentan como fuente de obtención de maderas, resinas y taninos.

En general no proporcionan alimentos de consumo humano pero hay dentro de ellas algunas especies que sí son comestibles (4) .

#### Aspectos históricos.

Las leguminosas han sido uno de los primeros cultivos comestibles practicados por el hombre, su historia como plantas cultivadas se remonta a los tiempos neolíticos, en la época en que el hombre pasaba de la fase de la caza y recolección de frutos espontáneos a la producción de alimentos mediante el trabajo humano, y adoptaba un nuevo medio de vida basado en comunidades agrícolas aldeanas, que a su vez condujo a la civilización urbana.

En Halicar Turquía, se han encontrado restos de trigo y lentejas, con molinillos de mano, metates y hoces. Utilizando el carbono 14 pudo determinarse que databan de 5500 años A.C. En las excavaciones realizadas en -

Jarno Turquestán, se han encontrado legumbres de los campos carbonizados, lentejas y una leguminosa denominada por los arqueólogos Almorta o Guija azulada, que quizá sean anteriores al material hallado en Halicar, se puede decir, por lo tanto, que las leguminosas han constituido un alimento de los seres humanos durante 8000 años, poco más o menos.

En la Roma antigua, las leguminosas eran un alimento habitual pero bastante despreciado. Hasta tiempos relativamente recientes se comía a las leguminosas principalmente en forma seca, las leguminosas verdes en fresco no se popularizaron hasta el Siglo XVIII (2).

Las leguminosas aparecen también pronto, en la evolución de la agricultura del Nuevo Mundo. En las cuevas de Ocampo, en México, se han encontrado restos de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) a los que mediante el carbono radioactivo se han atribuido una antigüedad de 4000 años A.C. o quizá más.

Los primitivos habitantes de América descubrieron y cultivaron beneficiando al mundo entero, otra leguminosa quizá más importante que los frijoles, a saber: el cacahuete.

Los primeros testimonios de que el cacahuete llegase a Europa fueron de los conquistadores españoles que generalmente lo llamaron Maní, que lo habían encontrado cultivado en México, América Central y en las Islas del Caribe, así como en América del Sur.

No se sabe cuando se cultivó por primera vez en China la Soya (*Glycine max*), una leguminosa extraordinaria. Esta rivaliza en antigüedad con la lenteja y el frijol (2).

La soya contiene aproximadamente 36% de proteínas y 18% de grasas, características que han ejercido influencia en su historia. Los antiguos chinos desarrollaron métodos para hacer con ella preparados de un alto contenido proteico (requesón, queso, salsa, etc.), que utilizaron para condimentar y enriquecer su alimentación básica de cereales.

En la actualidad las leguminosas se siguen consumiendo. No obstante, el incremento significativo que tuvieron los cereales en su producción a partir de 1964, que vino a desplazar la producción de las leguminosas durante la llamada Revolución Verde.

El desarrollo de nuevas tecnologías, el rendimiento de los cultivos y la calidad de los cereales ha provocado que los agricultores prefieran sembrar ahora cereales, como trigo, arroz y maíz en terrenos en los que antes se cultivaban leguminosas y oleaginosas. (6).

Esto ha traído consigo algunos problemas como son: que la rotación de cultivos ya no se practique, ocasionando esto el agotamiento de los suelos; y que no se cuente con los atributos nutritivos que aportan las leguminosas, que son necesarios para mantener un equilibrio nutricional.

#### Cualidades nutricionales y de cultivo.

El cultivo de las leguminosas beneficia de manera indirecta a la agricultura ya que éstas en simbiosis con bacterias *Rhizobium* enriquecen el suelo donde se encuentran.

Las bacterias que viven en simbiosis en la mayoría de las raíces de estas plantas originan la formación de nódulos. Las bacterias de estos nódulos toman el nitrógeno libre del aire y lo fijan en el tejido de la raíz de la leguminosa en forma de compuestos nitrogenados que además de enriquecer el suelo, le sirven a la planta para su crecimiento. Como consecuencia del enriquecimiento del suelo se aumenta el rendimiento de las cosechas de las leguminosas y cereales en rotación, reduciéndose también las enfermedades de las plantas y plagas de insectos (4).

La importancia de las leguminosas desde el punto de vista de la nutrición es su alto contenido de proteínas que varía de 17 a 26%, siendo este valor aproximadamente el doble que el de los cereales.

La mala salud y las enfermedades debidas principalmente a una deficiencia de proteínas en la alimentación, unida con frecuencia a una falta de calorías son corrientes en los niños pequeños en toda la zona tropical y subtropical. El reconocimiento de este hecho ha servido de acicate para que se realice una intensa investigación sobre la malnutrición protéica y los modos de evitarla. Este mal no se produce en países donde existen suministros abundantes de leche y de otros alimentos de origen animal, y se ha comprobado que la leche de vaca suministrada en diversas formas constituye un remedio eficaz para evitar y corregir la malnutrición protéica.

Pero en la mayoría de los países donde se presenta este problema, se produce poca leche, y escasas proteínas de fuente animal, lo que ha motivado

que se centre la atención en los alimentos de origen vegetal ricos en proteínas que puedan satisfacer o ayudar a satisfacer las necesidades proteícas. Entre estos alimentos, revisten especial importancia las leguminosas (2).

#### Composición de las leguminosas.

Las proteínas que constituyen a las leguminosas son principalmente globulinas, pero se pueden encontrar albúminas en algunas especies. Estas proteínas consideradas aisladamente tienen un valor algo inferior al de la mayor parte de las demás clases de proteínas, sin embargo contribuyen en un modo importante a satisfacer las necesidades proteícas cuando se combinan con las proteínas de otros alimentos en una dieta. Por ejemplo en la suplementación leguminosa-cereal, la deficiencia en aminoácidos azufrados que presentan las leguminosas es cubierta por los cereales, y a su vez, las deficiencias que presentan algunos cereales en triptófano y lisina son superadas con esta combinación.

Además de su alto contenido de proteínas, las leguminosas presentan un alto porcentaje de carbohidratos, alrededor del 60%, que son una buena fuente de energía y que generalmente se absorben y utilizan bien. Sin embargo algunas contienen galactanos, pentosas y hemicelulosas que se aprovechan escasamente.

El contenido de grasa de la mayoría de las leguminosas oscila entre el 1 y el 2%, excepto el cacahuete y la soya que son fuentes importantes de éstas. La mayoría de las leguminosas, en general son ricas en ácidos grasos esenciales. (2).

La mayoría de las especies de leguminosas contienen pequeñas cantidades de carotenos. No obstante existen diferencias entre las especies y dentro de ellas, según el color y la variedad. Los valores de muchas leguminosas son del orden de 50 a 300 unidades internacionales de vitamina A por 100 gramos.

El contenido de tiamina de las leguminosas como grupo es más o menos equivalente o excede ligeramente al del conjunto de los cereales, los valores varían de 0.3 a 1.0 mg. por 100 g. También con respecto a esta vitamina aparecen variaciones considerables entre las especies y dentro de ellas.

Las leguminosas contienen poca riboflavina; sus valores oscilan entre 0.1 y 0.4  $\mu$ g. por 100 g. Sin embargo, constituyen una fuente importante de niacina, conteniendo un promedio de 2 mg. por cada 100 g.

Las leguminosas secas como se consumen, están casi desprovistas de ácido ascórbico.

Las leguminosas son considerablemente más ricas en calcio que los cereales y contienen alrededor de 100 mg. por 100 g.

Con lo que respecta al hierro, las leguminosas son buena fuente de este elemento, conteniendo aproximadamente 20 mg. por cada 100 g.

Haciendo una mención de algunos otros elementos nutritivos, las leguminosas sin descortezar contienen vitamina E ( tocoferol ) en cantidades

algo mayores que las de los cereales. En lo que se refiere al ácido pantoténico sucede lo contrario.

En comparación con la mayoría de los alimentos comestibles, las leguminosas constituyen una buena fuente de ácido fólico (2).

#### Tóxicos presentes en las leguminosas.

A pesar de sus cualidades nutritivas, las leguminosas presentan algunos factores tóxicos que limitan el consumo de algunas de ellas como son: Inhibidores de tripsina, hemaglutininas o lectinas, saponinas, alcaloides, glucósidos cianogénicos, aminoácidos tóxicos, factores bociogénicos, factores antivitaminicos, factores que producen flatulencia, favismo y latirismo. Es importante señalar que gran parte de estos tóxicos son eliminados mediante tratamientos tradicionales para su consumo (cocción, germinación, fermentación y remojo).

De estos inhibidores nutricionales los más estudiados son:

Inhibidores de tripsina y hemaglutininas.

Los inhibidores de tripsina son compuestos de naturaleza protéica que actúan inhibiendo los grupos activos de la tripsina, que es una enzima proteolítica pancreática. Provocando efectos fisiológicos como hipertrofia pancreática y además en algunos animales monogástricos como son ratas y pollos limita su crecimiento si se incluyen en forma cruda en su dieta normal (6).



Las hemaglutininas son proteínas que tienen la interesante propiedad de aglutinar las células rojas de la sangre por medio de una acción similar a la de los anticuerpos (5). Se encuentran presentes en la mayoría de las leguminosas. Además de parecerse a los anticuerpos, muestran una marcada especificidad, ya que pueden actuar a una alta dilución sobre unos eritrocitos y no actuar o hacerlo débilmente sobre otros.

Entre los factores menos estudiados se encuentran: Glucósidos cianogénicos. Estos compuestos están formados por azúcares que contienen el radical CN (cianuro), el cual al hidrolizarse forma el ácido cianhídrico; durante la cocción, gran parte del ácido cianhídrico se volatiliza, disminuyéndose su toxicidad (5). Estos compuestos no están presentes en todas las leguminosas.

Factores antivitaminicos. - Aunque estos factores no se han estudiado profundamente, se sabe que algunas leguminosas contienen factores antivitaminicos na D<sub>3</sub> y antivitaminica E, que pueden producir raquitismo en pollos, distrofia muscular y necrosis del hígado en ratas.

La identidad de los factores antivitaminicos es desconocida en la actualidad (5).

Aminoácidos tóxicos. En algunas leguminosas como *Leucaena glauca*, que se utiliza como forraje se ha observado que produce frecuentemente una pérdida del cabello, este efecto tóxico se le atribuye a un aminoácido parecido a la tirosina llamado Mimosina, que actúa como antagonista de la tirosina.

Además de la Mimosina se pueden encontrar algunos otros aminoácidos tóxicos en las leguminosas que actúan en forma antagonista de los aminoácidos normales (6) .

Latirismo. Es una enfermedad producida por algunas leguminosas del género *Lathyrus*, que poseen una neurotoxina que ocasiona lesiones en la neurona motora superior con repercusión sobre los músculos piramidales, ocasionando parálisis y debilidad en los músculos de las piernas, en casos extremos produce la muerte (neurolatirismo) (6) .

Favismo. El favismo es una enfermedad ocasionada por la ingestión de habas comunes (*Vicia faba*), o por aspirar el polen de la flor. Sus manifestaciones clínicas principales son anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia, acompañadas con frecuencia de una fiebre alta. Por lo general la enfermedad se presenta repentinamente. Esta enfermedad se haya limitada casi por completo a personas de origen mediterráneo y se piensa que se debe a factores de origen genético (2), (7) . La estructura de la sustancia responsable se cree que sea del tipo de las pirimidinas (6) .

Flatulencia. La flatulencia es la inflamación del intestino ocasionada por la formación de gases que son el producto de una fermentación microbiana. Este fenómeno se atribuye a la acción de algunos microorganismos anaeróbicos sobre los hidratos de carbono de bajo peso molecular contenidos en algunas leguminosas (8) .

Saponinas. Son sustancias constituidas por una aglucona que es una saponina y una molécula de azúcar que puede ser una glucosa, galactosa, pentosa o una metil pentosa. Producen una irritación en la mucosa intestinal; sin embargo no son muy tóxicas para el hombre si se ingieren oralmente, pero actúan como un agente altamente hemolítico cuando se inyecta en las venas ( 9 ), ( 10 ) .

Factores bociogénicos. Estos factores se encuentran comúnmente en plantas como la col y otras hortalizas, pero también son frecuentes en la soya y cacahuates. Causan un crecimiento irregular en las glándulas tiroides por lo que se les relaciona con el bocio, principalmente en animales y niños. Sus efectos se pueden contrarrestar administrando yodo o eliminando el factor tóxico mediante calor. El factor tóxico es actualmente desconocido, pero se cree que sea un glucósido fenólico ( 6 ) .

Alcaloides. Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de las bases nitrogenadas vegetales, con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales. Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, la mayoría de ellos se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. Algunos se encuentran en forma de glucósidos de la rhamnosa, galactosa y glucosa. Otros se hallan en forma de ésteres en ácidos orgánicos de complejidad variable.

Se han hecho estudios tratando de conocer la función de los alcaloides en las plantas, se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, también se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos. En lo que concierne a su distribución en la planta, en ocasiones se hallan restringidos a cierto órgano o a ciertas partes de la planta; a veces se les encuentra en toda la planta.

Hay casos en los cuales sólo aparecen en alguna etapa de crecimiento o época del año, o en determinadas condiciones ecológicas (9).

#### Digestibilidad de las Leguminosas.

Es de gran importancia señalar que los métodos para elaborar y guisar las leguminosas, las cantidades que se consumen, las distintas variedades y el estado del aparato digestivo afectan la digestibilidad de las mismas.

La digestibilidad de las leguminosas ha sido objeto de mucha atención. Ya en 1907 se afirmaba que se absorbía el 80% de las proteínas y el 97% de los hidratos de carbono de las leguminosas (2).

En estudios recientes se ha encontrado que la baja digestibilidad de las leguminosas se debe al paso tan rápido de sus proteínas por el intestino y por la resistencia que presentan dichas proteínas a la hidrólisis de las enzimas gastrointestinales (6).

### Producción y Consumo .

La importancia de las diferentes clases de leguminosas como alimento para el hombre varía ampliamente. Algunas se producen y consumen en muchas partes del mundo, mientras que otras tienen un ámbito y utilización mucho más reducida. Por ejemplo en el Medio Oriente son más populares que otras leguminosas, Pisum, Vicia y Lens esculenta. En América Phaseolus es más común. Considerando el Lejano Oriente y Africa, las especies de Phaseolus, Dolichos, Vigna y Cajanus son las más comunes. En Asia la leguminosa que más se consume es Glycine Max ( 2 ) .

Esta importancia que tienen unas variedades sobre otras están en relación con la adaptabilidad, rendimiento agrícola, facilidad y tiempo para su preparación y su aprovechamiento.

La cantidad de leguminosas consumida como alimento está tabulada en la siguiente tabla para todos los países asociados a la FAO.

TABLA I

#### Ingestión de leguminosas en 63 países del mundo .

No. de países	Granos de leguminosas ingeridos gm /cápita /día.
33	2 a 13
10	14 a 24
15	25 a 35
1	36 a 46
4	47 a 57

( Reporte del balance de alimentos de la FAO, 1966 ) .

El consumo en 63 países fue agrupado tomando en cuenta la ingestión de toda la leguminosa consumida como alimento por persona por día; estas cifras - son los resultados de las estadísticas sobre producción o encuestas sobre las dietas aplicadas a toda la población, por lo tanto, ésta podría interpretarse - erróneamente. Es por ello de importancia señalar que se deben tomar con - reserva estos datos (6).

#### Consumo en México.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*), constituye la leguminosa que se cultiva principalmente en México, dándose diversas variedades de ella, de las que el frijol negro constituye la más extensamente cultivada con gran diferencia sobre las demás.

Las leguminosas del viejo mundo entre ellas las lentejas, los garbanzos - (*Cicer arietinum*), y habas comunes (*Vicia faba*), se han introducido en Mé- xico desde hace mucho tiempo, igual que en América Central y del Sur, pe- ro en general ocupan un lugar de importancia secundaria en la agricultura y en el régimen alimenticio. No obstante el haba común se cultiva ampliamen- te en las regiones montañosas elevadas y frías y se han identificado plenamen- te como alimento de los habitantes de dichos parajes. El cacahuate se siem- bra como cultivo comercial en algunas partes del país, pero se come sólo en cantidades pequeñas, como comida ligera (2).

Al frijol de soya (Glycine Max) se le ha dado últimamente una gran importancia ya que con él se han realizado investigaciones para el desarrollo de productos de bajo costo y alto valor nutritivo (11).

Las leguminosas son consumidas en las diferentes partes del mundo de varias maneras. Pero el método más común en la preparación de ellas es por medio de una cocción en agua, con la adición de condimentos o sin ellos.

Dentro de los otros métodos de elaboración se encuentran: remojo, descortezado, tostado, germinación y fermentación.

## PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental consistió en la evaluación nutritiva de leguminosas silvestres colectadas en diversos estados de la República Mexicana.

Este trabajo se dividió en las siguientes partes:

1. - Recolección y clasificación del material de estudio
2. - Análisis bromatológico de las muestras recolectadas.
3. - Determinación de triptófano en las muestras estudiadas.
4. - Determinación de inhibidores nutricionales.
5. - Pruebas biológicas para confirmar la calidad protéica de las muestras seleccionadas.

1. Recolección y clasificación del material en estudio.

Esta parte del trabajo fue realizado por botánicos especializados.

La selección se hizo considerando como factor primordial el hecho de que el material debería ser leguminosa silvestre y que el material estuviera disponible en cantidad suficiente para el estudio completo.



En algunas de las leguminosas estudiadas se conocía que en ciertas regiones eran utilizadas eventualmente como alimento. A continuación se presenta un cuadro en el que se indica el nombre común, el nombre científico y el lugar de origen de las semillas estudiadas.

## 2.- Análisis bromatológico.

El análisis bromatológico llamado también análisis aproximado del alimento, consta de las siguientes determinaciones:

- a) Humedad
- b) Cenizas
- c) Proteína cruda
- d) Grasa cruda
- e) Fibra cruda
- f) Carbohidratos asimilables (por diferencia).

A las plantas recolectadas para poder realizar su análisis bromatológico hubo necesidad de: Secar al sol, para facilitar la separación de la vaina y las semillas. Posteriormente se procedió a moler las semillas y en algunos casos, el fruto completo para realizar las determinaciones mencionadas anteriormente.

Se hace notar que algunas de las plantas presentaron cierta dificultad para separar la vaina de la semilla, por lo que se decidió analizarlas también en forma completa, éstas fueron: Palo fierro, algarrobo, guinolo, palo de gusano. Además se observó que las semillas de alampepe, ojo de águila y parota presentan una corteza muy dura que se elimina fácilmente, por

<u>Nombre(s) común(es)</u> (12) (13)	<u>Nombre científico</u>	<u>Lugar de origen</u>
Acacia	<i>Delonix regia</i>	Veracruz y Morelos
Acacia siria	<i>Albizzia lebbec</i>	Quintana Roo
Alampepe, Haba de la costa	<i>Entada scandens</i>	Oaxaca
Alberjón	<i>Canavalia oxyphylla</i>	Veracruz
Algarrobo	<i>Acacia pennatula</i>	Sinaloa
Bejuco de agua	<i>Entada polystachia</i>	Oaxaca
Caracol	<i>Phaseolus caracalla</i>	Veracruz
Conchín, Candelillo	<i>Cassia spectabilis</i>	Veracruz
Cornezuelo	<i>Acacia cornígera</i>	Veracruz
Frijol castellano	<i>Phaseolus vignasinensis</i>	Sinaloa
Frijol del monte	<i>Phaseolus lunatus</i>	Sinaloa
Frijolillo	<i>Swartzia guatemalinois</i>	Veracruz
Guajillo	<i>Caesalpinia veiluda</i>	Oaxaca
Guinolo	<i>Acacia coellicantha</i>	Sinaloa
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i>	Veracruz
Mechudilla	<i>Caesalpinia sp.</i>	Sinaloa
Mezquitillo, Habilla prieta	<i>Cassia occidentalis</i>	Veracruz
Mucuna	<i>Stizolobium cinerium</i>	Sinaloa
Ojo de águila	<i>Caesalpinia crista</i>	Oaxaca
Parota, guanacastle	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Veracruz
Palo de fierro	<i>Phacellobium undulatum</i>	Sinaloa
Palo de gusano	*	Sinaloa
Tepeguaje	<i>Lysiloma acapulensis</i>	Sinaloa
* *	<i>Cassia fruticosa</i>	Veracruz
* *	<i>Crotolaria vitellina</i>	Veracruz
* *	<i>Lysiloma dahamensis</i>	Quintana Roo
Guinolo-algarrobo	Híbrido: <i>A. coellicantha</i> <i>A. pennatula</i>	Sinaloa

\* Se desconoce su nombre científico

\*\* Se desconoce su nombre común.

tal razón se eliminó pensándose que se incrementaría con ello su valor nutritivo y su digestibilidad.

En la semilla de acacia se observó que aparte de la corteza, presenta otras dos fracciones que a simple vista despertaron un especial interés ya que una de las fracciones parecía ser un mucilago, por lo que se pensó que en alguna de las otras dos fracciones tendría el mayor contenido de proteínas.

Una vez realizado el análisis bromatológico, tomando como base éste y la cantidad de muestra existente de cada semilla, se seleccionaron algunas para efectuar la determinación de triptófano, las pruebas toxicológicas y de valor biológico.

La determinación de triptófano se realizó en las semillas seleccionadas. Esta medición se hizo tomando en cuenta que el triptófano es un a.a. , que se encuentra escasamente en el reino vegetal. La determinación se hizo por método químico.

Además, a cada una de las semillas seleccionadas se les hicieron tres determinaciones toxicológicas:

- 3.1 Determinación de alcaloides. Esta prueba sólo se realizó en forma cualitativa.
- 3.2 Determinación de inhibidores de tripsina
- 3.3 Determinación de hemaglutinina.

## METODOS

El análisis bromatológico se realizó conforme a los métodos señalados en el A. O. A. C. (14) .

### H u m e d a d :

#### Fundamento:

La humedad se obtiene por diferencia de peso al someter la muestra a una temperatura alta, liberando el contenido de agua.

#### Material:

Estufa de vacío

Pesafiltro

Balanza analítica

Desecador

#### Técnica:

Se ponen a secar los pesafiltros a una temperatura de 60°C en una estufa de vacío hasta peso constante, durante más o menos una hora.

En el pesafiltro puesto a peso constante, se pesan aproximadamente, 5 g. de muestra, molida y homogénea. Se lleva a una estufa de vacío a 60-62°C de temperatura por cinco horas. Al término de las cinco horas, se colocan los pesafiltros en un desecador, se dejan enfriar a temperatura ambiente y después se pesan tan rápido como sea posible.

Cálculos

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(A - B) 100}{C}$$

A = Peso del pesafiltro más muestra húmeda

B = Peso del pesafiltro más muestra seca

C = Peso de la muestra.

C e n i z a s .Fundamento:

La muestra es incinerada para destruir toda la materia orgánica, y se debe evitar elevar la temperatura por arriba de 550°C, para que no se volatilicen los cloruros.

Material:

Balanza analítica.

Mechero Bunsen

Crisoles de porcelana

Desecador

Mufla

Técnica:

Pesar aproximadamente de 3 a 5 g. de muestra en los crisoles de porcelana. Los crisoles con la muestra se ponen en un tripié con triángulo de porcelana, calentando poco a poco con un mechero, para lograr la carbonización completa de la muestra, luego se lleva a la mufla a una temperatura de 550°C, por dos horas o más hasta que se obtengan cenizas blancas o grises homogéneas.

Se dejan enfriar los crisoles y se colocan en un desecador. A continuación se pesan los crisoles y se colocan en un desecador. A continuación se pesan los crisoles y la diferencia entre el peso del crisol vacío y el peso final (con las cenizas) indica contenido de cenizas.

Se calcula el peso de las cenizas como porcentaje en relación a la muestra.

### Cálculos

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(P - R) 100}{M}$$

P = Peso del crisol más muestra calcinada

R = Peso del crisol

M = Peso de la muestra

### Proteína Cruda

#### Fundamento:

Método de Kjeldahl. - La mezcla digestiva ( $H_2SO_4$ ;  $H_3 PO_4$  y  $Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ ) oxida la materia orgánica convirtiendo el nitrógeno a sulfato ácido de amonio ( $NH_4HSO_4$ ), que corresponde a la Digestión, mientras que en la destilación, lo que se trata es de liberar el amoníaco de dicha sal, con una solución concentrada de hidróxido de sodio, reicibiéndose en ácido bórico, con el que forma el borato de amonio, el cual se titula con una solución valorada de ácido clorhídrico. De esta forma se obtiene el porcentaje de nitrógeno de la muestra, la cual al multiplicarla por el factor de 6.25 se convierte en porcentaje de Proteína Cruda.

Material:

Balanza analítica

Digestor y Destilador de Micro-Kjeldahl

Matraces Kjeldahl de 30 y 100 ml.

Piedras para ebullición (lavadas)

Oxido de mercurio

Solución de HCl 0.01 N

Solución de NaOH al 60%

Solución de ácido bórico \*

Mezcla digestiva \*

(\*) Solución de ácido bórico con indicadores: Pesar 10 g. de ácido bórico y colocarlos en un matraz de 2000 ml.; se adiciona agua destilada hasta disolverlo, a continuación se agregan 70 ml. de indicador A (100 mg. de fenofraleína aforados a 100 ml. con alcohol etílico) y 20 ml. de indicador B (33 mg. de verde de bromocresol y 66 mg. de rojo de metilo aforados a 100 ml. con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o base según se requiera, se afora a 2,000 ml.

(\*\*) Mezcla digestiva: Se mezclan durante aproximadamente 30 minutos los siguientes reactivos en la siguiente proporción: 3g. de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 300 ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc.) y, 100 ml. de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Técnica:

Pesar de 15-30 mg. de muestra y colocarlos en un matraz de Micro-Kjeldahl, se agregan 3 mg. de óxido de mercurio, 1-2 ml. de mezcla digestiva y 2 -

piedras para ebullición. Se coloca el matraz en el digestor, y se calienta hasta que la digestión sea completa, aproximadamente 1 hora.

Una vez efectuada la digestión se deja enfriar el matraz y se procede a la destilación, para la cual se agrega al matraz agua destilada (aproximadamente 10 ml.) y a continuación se vacía por la copa de adición al microdestilador, enjuagando ésta y el matraz con 1-2 ml. de agua destilada varias veces. Después se añade al aparato de destilación por medio de la copa de adición, lenta pero en forma continua, 5 ml. de NaOH al 60% se inicia el calentamiento. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer que contenga 10 ml. de la solución de ácido bórico. Se continúa la destilación hasta completar un volumen de 50 ml. aproximadamente. Al irse recibiendo el nitrógeno amoniacal sobre el ácido bórico, el indicador que éste contiene vira del café rojizo al verde esmeralda. Finalmente el complejo nitrogenado formado se titula con el HCl 0.01 N, hasta el vire del indicador, del verde esmeralda a rosa claro.

#### Cálculos:

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

$$\% \text{ de Proteína cruda} = \% N_2 \times 6.25$$

P = ml. del problema

B = ml. del blanco

Meq = miliequivalente del nitrógeno

N = Normalidad de la solución de HCl

M = Peso de la muestra



Grasa cruda:Fundamento:

El éter anhidro al calentarse se volatiliza y al hacer contacto con una superficie fría se condensa, pasando a través de la muestra y acarreando consigo las sustancias solubles en el éter.

Este proceso es repetido en forma continúa hasta que no queden residuos de lo extraíble. El éter es destilado y colectado en otro recipiente y el material soluble en éter queda como residuo.

Material:

Aparato Goldfish

Estufa de vacío

Eter etílico anhidro

Dedales de celulosa

Técnica:

Se colocan los vasos de borde esmerilado en una estufa de vacío a  $60-62^{\circ}\text{C}$  durante dos horas hasta obtener peso constante. Se transfieren los vasos a un desecador dejándose enfriar antes de pesarlos.

Pesar aproximadamente 2g. de muestra seca, la cual se coloca en el cartucho de celulosa, y éste a su vez en el extractor de Goldfish. Se colocan de 30-35 ml. de éter anhidro en el vaso esmerilado puesto a peso constante, el cual se inserta perfectamente al condensador con un anillo de rosca, para evitar cualquier escape de éter.

A continuación se hace funcionar el aparato durante 4 a 5 horas (hasta que se observa que ya no se extrae grasa).

A los vasos con la grasa cruda se les evapora el éter y se llenan a la estufa de vacío a una temperatura de 60-62°C por 2 horas y después se mantiene en el desecador hasta que se enfríen a la temperatura ambiente.

Después se pesan los vasos y se calcula el peso de la grasa cruda obteniéndose ésta por diferencia y expresándose como porcentaje de la muestra seca.

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{(I - F)}{M} \times 100$$

I = Peso del vaso con grasa

F = Peso constante del vaso

M = Peso de la muestra

### Fibra cruda

#### Fundamento:

La muestra es hidrolizada con una solución ácida y después con una solución alcalina y como se usa una muestra desengrasada, el residuo de dicha hidrólisis serán los carbohidratos no degradables en dichas condiciones de hidrólisis.

#### Material

Parrilla eléctrica con agitador magnético	Mufla
Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.	Solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1.25%
Matraz Kitasato	Solución de NaOH al 1.25%
Embudo Buchner	Asbesto preparado (digerido y calcinado)
Paño de lino o filtro No. 40	Alcohol etílico
Estufa de vacío	

Técnica:

Se pesan de 2-3 g. de muestra desengrasada, la cual se coloca en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml., se le adicionan 0.5 g. de asbesto. A continuación se le agregan 200 ml. de la solución de ácido que esté hirviendo, y la ebullición se mantiene por espacio de 30 minutos. Inmediatamente después de este tiempo, se vacía el contenido del matraz sobre un paño de lino, ajustando a un filtro de succión.

Se lava el residuo con agua destilada hirviendo hasta eliminar el ácido. Una vez terminado el lavado, se transfiere el residuo al matraz y se le adicionan 200 ml. de la solución de NaOH hirviendo y se mantiene la ebullición 30 minutos, después de lo cual se vuelve a filtrar y lavar como antes se indica.

Después de neutralizado el residuo, se lava con 25 ml. de alcohol etílico al 95%. Pasar la muestra a un crisol previamente puesto a peso constante, el cual se seca a 60-62°C, durante 2 horas en vacío. A continuación se pesa.

Después de pesado, la muestra se coloca en la mufla para calcinar el residuo, lo cual se logra a una temperatura de 900°C; al cabo de 3 horas se saca, se enfría y se pesa.

Cálculos:

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{(A - B)}{M} \times 100$$

A ■ Peso del crisol después de secado

B ■ Peso del crisol después de calcinado

M ■ Peso de la muestra

### Carbohidratos asimilables (por diferencia)

Esta determinación es absolutamente teórica, ya que para obtener este dato se procede de la forma siguiente: Se suman los porcentajes de Humedad, Cenizas, Grasa Cruda, Proteína Cruda y Fibra Cruda y se le restan a 100, reportándose la diferencia como el % de carbohidratos asimilables en la muestra.

### Determinación de Triptófano. Método de Lombard y Lange (15).

#### Fundamento:

La determinación de triptófano en proteínas, se lleva a cabo en las siguientes etapas:

1. La hidrólisis enzimática de la muestra con papaína.
2. La extracción de la proteína hidrolizada con una mezcla de hidróxido de potasio y tetracloruro de carbono.
3. La combinación del triptófano con p-dimetil amino benzaldehido y HCl para formar un producto de condensación.
4. Desarrollo del color azul por oxidación con nitrito de sodio que es proporcional a la cantidad de triptófano presente en la muestra.

#### Material:

Matraces aforados de 100 ml.

Pipetas de 10 ml., 5 ml.

Probetas

Balanza analítica

Estufa

Centrífuga

Fotocolorímetro

Reactivos:

Solución enzimática de papaína al 2%

Buffer de fosfatos 0.4M de pH 7.95

Cloruro de sodio al 5%

Hidróxido de potasio 0.1N

Tetracloruro de carbono

Solución estándar de triptófano con concentración de 1 mg/ml. (estándar interno).

Solución estándar de triptófano con concentración de 100 Ug/ml. (curva estándar).

Acido clorhídrico concentrado

Solución de p-dimetil amino benzaldehido al 5% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%

Nitrito de sodio 0.2%

Técnica:

Se pesan 1.2 g. de la muestra, por duplicado en matraces aforados de 100ml.

A uno de los matraces se le adiciona 4 ml. de la solución estándar de triptófano de concentración 1 mg/ml. (estándar interno). Posteriormente a cada uno de los matraces se les agrega 10 ml. de solución enzimática de papaína al 2%, 60 ml. de solución buffer de fosfatos 0.4M de pH 7.95 y 0.50 ml. de NaCN al 5%. Se agitan, al mismo tiempo se prepara un blanco de papaína para determinar el triptófano contenido en la solución enzimática y restarlo del que se determina en la muestra.

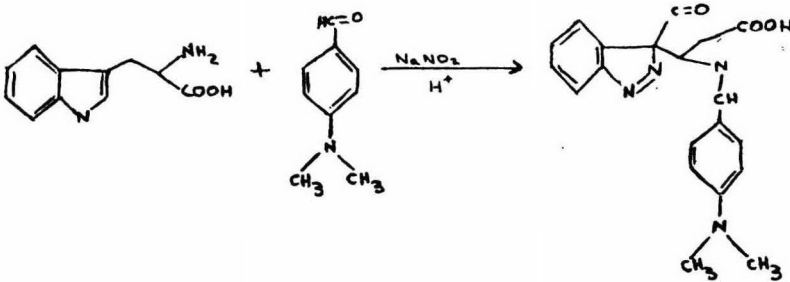
Se colocan los matraces en una estufa a  $58^{\circ}\text{C}$ , de 18 a 20 horas; después de que se han enfriado se aforan a 100 ml. con agua destilada, se agitan y se filtran o centrifugan. Del filtrado o sobrenadante se toma un alícuota de 5 ml., se le adiciona 5 ml. de KOH 0.1N y 3 ml. de tetracloruro de carbono; se agita y centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos (para muestras claras no es necesario).

Se preparan tres tubos de ensaye y en cada uno de ellos se colocan un ml. del sobrenadante claro. Dos de los tubos se marcan con una P (prueba) y uno con una B (blanco), se adicionan los siguientes reactivos 1 ml. de PDAB al 5% a los tubos P y 1 ml. de agua destilada al tubo B, seguidos de 5 ml. de HCl concentrado, en los tres tubos: se agitan y dejan reposar en la obscuridad durante 15 minutos; se agregan 0.4 ml. de  $\text{NaNO}_2$  al 0.2%. Agitar y dejar reposar en la obscuridad 15 minutos para desarrollar un color azul. La intensidad del color es leída a 590 mU en el fotocolorímetro después de ajustar a 100 o/o T con el blanco. El color es estable cerca de una hora. Se corre, al mismo tiempo, una curva estándar de triptófano con concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . y se prepara un blanco con agua destilada para ajustar el fotocolorímetro a 100% de T.

#### Cálculos:

El % de transmitancia se convierte a D.O. La D.O. del blanco de la solución enzimática se resta de la del problema. Este valor se extrapola en la curva estándar de triptófano y se obtiene así la cantidad de aminoácido en la muestra en  $\mu\text{g}$ . de triptófano/ml. de muestra a partir del cual se calculan los gm. triptófano/100 gm. proteína.

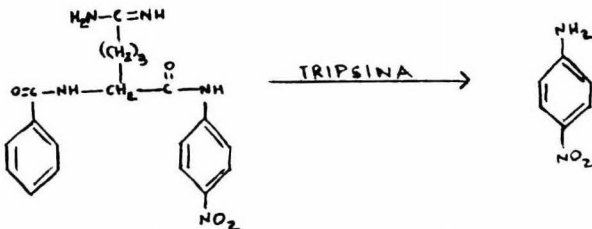
$$\text{Gm. triptóf. /100gm. proteína} = \frac{(\mu\text{g. triptóf. muestra} - \mu\text{g. triptóf. blanco papaina})(2)}{(\text{peso muestra})(\% \text{ proteína muestra})}$$



### Inhibidores de Tripsina. Método de Kakade y Col. (16).

#### Fundamento:

En esta determinación una cantidad conocida de tripsina se pone en contacto con un extracto de la muestra durante un lapso corto de tiempo, después del cual se hace reaccionar la tripsina que aún quede libre con benzoil arginina p-nitro anilida para obtener un compuesto colorido proporcional a la tripsina no inhibida.



Material:

Balanza analítica

Potenciómetro

Centrífuga

Baño María termoregurable

Cronómetro

Matraces aforados de 50 ml.

Pipetas volumétricas de 1 ml. y 5 ml.

Pipetas graduadas de 2 ml., 5 ml. y 10 ml.

Agitador Bortex

Espectrofotómetro Coleman

Reactivos:

Buffer tris de hidroxil amino metano 0.05 M y pH 8.2 ( - )

Solución BAPNA (Benzoil arginina p-nitro anilida) 3 mM ( - - )  
Dimetil sulfóxido

Solución estándar de tripsina de 40 Ug/ml. ( - - - )

Acido clorhídrico 0.001 M

Acido acético al 30%

( - ) El buffer tris (0.05 M, pH 8.2) se prepara pesando 6.05 g. de tris - hidroximetil aminometano y 2.94 g. de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y se disuelven en 900 ml. de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se lleva a un volumen de 1000 ml. con agua destilada.

( - - ) BAPNA 3 mM. - Se prepara una solución 0.04M en dimetil sulfóxido y en esta forma se puede conservar en refrigeración. Pesar 0.870 g. de BAPNA (PM = 435 ) y disolverlas en 50 ml. de dimetil sulfóxido.



Para preparar la solución 3mM se hace a partir de la solución 0,04M. Se toman 3,75 ml. y se aforan a 100 ml. con tris buffer pH 8,2.

(- - -) Solución Estándar de Tripsina. Se pesan exactamente 4 mg. de tripsina y se disuelven en 100 ml. de HCl 0,001 M. Esta solución puede guardarse en refrigeración por 2 o 3 semanas sin pérdida de actividad.

#### Técnica:

Se pesa 1,0 g. de muestra y se le adicionan 45 ml. de NaOH 0,01N. Se ajusta el pH a 9,6 y se afora a 50 ml. Agitar durante una hora, centrifugar y tomar 5 ml. del sobrenadante y llevarlo a 50 ml. con agua destilada. Este extracto es el que se emplea para hacer las determinaciones. Se preparan tres tubos de ensayo de los cuales, dos servirán para hacer la determinación (P) y uno para preparar el blanco (B). En los tres tubos se coloca 1 ml. de la solución estándar de tripsina y 1 ml. de la muestra. Al blanco (B) se le adiciona 1 ml. de ácido acético al 30% para inhibir la reacción. Se dejan reaccionar durante 5 minutos a 37°C, e inmediatamente se les adiciona 2 ml. de la solución de BAPNA 3 mM y nuevamente se dejan en el baño a 37°C durante 15 minutos para que el BAPNA reaccione con la tripsina que quedó libre, dando un compuesto amarillo. Después de este tiempo la reacción de los dos tubos de prueba (P) se inhibe con 1 ml. de ácido acético. La intensidad del color es leída a 420 nm en el espectrofotómetro.

Al mismo tiempo se hace una curva estándar, con un blanco para ajustar el aparato a 100% de transmitancia. El blanco se hace colocando en un tubo de

ensayo 1 ml. de la solución estándar de tripsina, 1 ml. de agua, 1 ml. de ácido acético, se deja en un baño a 37<sup>o</sup>C durante 5 minutos, se adiciona 2ml. de BAPNA y se dejan en el baño nuevamente durante 15 minutos más.

### Cálculos:

Los resultados se reportan como mg. de tripsina inhibida por gm. de muestra o como unidades de tripsina inhibida. Los datos de % de transmitancia deben convertirse a D. O. mg. T. I. /g. muestra =  $(A - B) ( 0.5 )$ .

donde A = concentración inicial de tripsina (40  $\mu$ g)

B = concentración de tripsina no inhibida (se obtiene extrapolando el dato de D.O. del problema en la curva estándar.

$$UTI = \frac{(D.O. de 40 \mu g. - D.OP)}{0.20}$$

T.I. = Tripsina inhibida

U.T.I. = Unidades de tripsina inhibida.

### Hemaglutininas. Técnica de Jaffé y Col. (17).

#### Fundamento:

Esta es una prueba semicuantitativa que consiste en hacer reaccionar eritrocitos de diferentes animales con un extracto de la muestra para medir el grado de aglutinación.

Material:

Balanza analítica

Agitador automático

Centrífuga

Placa de vidrio

Pipetas Pasteur

Palillos de madera

Cronómetro

Solución de NaCl al 1%

Solución salina al 0.9%

Solución salina de tripsina al 0.1%

Eritrocitos de sangre de vaca tratada con tripsina ( - )

Eritrocitos de sangre de conejo tratada con tripsina

Eritrocitos de sangre humana tratada con tripsina

( - ) Preparación de la sangre tratada con tripsina. - A 5 ml. de sangre se le agregan 10 ml. de solución salina de tripsina al 0.1%, se coloca en un baño a 37°C durante 30 minutos. Se centrifuga para eliminar el sobrenadante y se lava tres veces con solución salina al 0.9% y se suspende en 10 ml. de ella para hacer las pruebas de hemaglutininas ( 17 ) .

Técnica:

Se pesa 1 g. de muestra y se extrae con 10 ml. de NaCl al 1%, por agitación durante 2 horas a temperatura ambiente; terminada la agitación se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante se separa para hacer las pruebas de aglutinación.

En una placa de vidrio se coloca una gota del extracto y una de la sangre tratada con tripsina, se mezclan con un palillo, se mueve la placa constante y suavemente durante 10 minutos y se observa si después de este período de tiempo hay aglutinación. Si así sucede se diluye el extracto que contiene a las fitohemaglutininas y se vuelve a hacer la prueba. Esto se hace hasta que no se presente aglutinación. Se debe preparar un blanco con una gota de solución salina y sangre.

#### Resultados:

En esta prueba se reporta la dilución más alta a la que el extracto aglutina los eritrocitos.

#### Prueba presuntiva de alcaloides con el reactivo de Dragendorff ( 9 ) .

##### Fundamento:

Esta identificación de alcaloides se lleva a cabo en los siguientes pasos:

1. La extracción de los alcaloides con alcohol en un medio alcalino.
2. La formación de las sales de los mismos, mediante la adición de un ácido.
3. La precipitación de algunos de ellos con el reactivo de Dragendorff.

Esta reacción puede ser causada por proteínas, purinas, betaínas, cumarinas y algunos polifenoles. Como la ausencia de precipitado es indicativa de que no hay alcaloides, se usa esta determinación como prueba presuntiva de su presencia.

##### Material:

Tubos de ensaye

Embudos

Vasos de precipitado de 40 ml.

Pipetas graduadas de 1 ml.

Goteros.

Reactivos:

Alcohol de 96<sup>o</sup>,

Amoníaco

Acido acético al 5%

Técnica:

Se colocan 2 g. de muestra en polvo, en un tubo de ensayo y se agrega alcohol de 96<sup>o</sup> hasta tajar la muestra, se agregan unas gotas de amoníaco, se tapa el tubo y se deja 1 día en reposo.

Filtrar en un embudo, con algodón, recibiendo el filtrado en un vaso de precipitado. Evaporar a baño María. Sobre el residuo seco agregar 1/2 ml. de ácido acético al 5% y remover con un agitador. Se toma una gota de la solución así obtenida sobre un cuadro de papel filtro Whatman No. 1 y colocar una gota del Reactivo de Dragendorff.

La formación de un precipitado de color rojo ladrillo señala la posible presencia de alcaloides.

Preparación del reactivo de Dragendorff. Se disuelven 8.0 g. de Nitrato de Bismuto Pentahidratado ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 20 ml. de  $\text{HNO}_3$  (dens. 1.18) y 27.2g. de KI en 50 ml. de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100 ml.

Pruebas Biológicas (Índice de Eficiencia Proteica) .

Fundamento:

Esta prueba relaciona la ganancia de peso del animal en prueba con la proteína consumida, asumiendo que el incremento en peso es exclusivo del nitrógeno corporal. Su determinación es la siguiente:

$$R E P = \frac{\text{ganancia en peso}}{\text{proteína consumida}}$$

Material:

Balanza granataria

Balanza granataria para ratas

Jaulas

Pomadernas

Bebederos

Ratas Sprage-Dowley

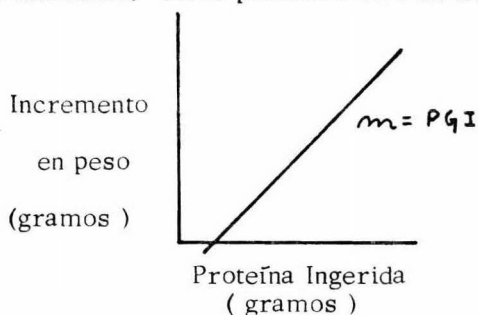
Componentes de las dietas

Técnica:

Se colocan las ratas recién destetadas (21-23 días) en jaulas individuales - marcadas convenientemente y mantenidas siempre con agua y alimento.

El primer día se pesan las ratas con el fin de distribuirlas de la mejor manera para formar los lotes lo más parejo posible, y además debe dejárseles en ayunas para que los datos obtenidos sean lo más reales posibles. Pesar diariamente el alimento consumido y pesar los animales por períodos de - 48 horas. El estudio se realiza aproximadamente durante tres semanas - cuando menos (18) .

Indice de crecimiento proteico (PGI): Al graficar los datos de peso ganado (o incremento de peso) vs proteína ingerida, obtenemos una curva que se asemeja a una recta. De la porción lineal se obtiene una pendiente que es el PGI .



Componentes de las dietas:

Sacarosa

Glucosa

Dextrina (Glucosa S. A. )

Manteca vegetal (Inca)

Aceite vegetal ( Mazola )

Mezcla de Sales Roger Harper (Nutritional Biochemical)

Mezcla de Vitaminas (Nutritional Biochemical)

Celulosa en polvo (Nutritional Biochemical)

Para el estudio se preparó 1 Kg. de cada una de las dietas. Las semillas con las que se realizaron las pruebas biológicas fueron tratadas en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1,5 \text{ Kg./cm}^2$  de presión durante 30 minutos:

La composición en porciento de cada una de ellas es la siguiente:

## DIETA DE ACACIA

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Acacia	52.32
Sacarosa	3.00
Glucosa	20.00
Dextrina	0.00
Manteca vegetal	12.13
Mezcla de sales	2.55
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 9g. por 100g. de dieta y de 418.6 calorías/100g. de dieta.

## DIETA DE ACACIA "fracción C"

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Fracción "C"	18.34
Sacarosa	20.10
Glucosa	20.00
Dextrina	23.22
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	4.14
Mezcla de sales	2.87
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	1.33

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g por 100 g. de dieta y de 422.4 calorías/100 g. de dieta.



## DIETA DE PAROTA

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Parota	36.29
Sacarosa	20.1
Glucosa	20.0
Dextrina	4.09
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	4.82
Mezcla de sales	3.11
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	1.59

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 422.4 calorías por 100 g. de dieta.

## DIETA DE ALBERJON

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Alberjón	34.61
Sacarosa	20.10
Glucosa	19.00
Dextrina	9.23
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	5.29
Mezcla de sales	2.93
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 422.4 calorías por 100g. de dieta.

## DIETA DE CORNEZUELO

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Cornezuelo	49.62
Sacarosa	10.10
Glucosa	19.00
Dextrina	3.68
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	6.02
Mezcla de sales	2.06
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 427.4 calorías por 100g. de dieta.

## DIETA DE HUIZACHE

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Huizache	41.37
Sacarosa	20.10
Glucosa	19.00
Dextrina	5.35
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	4.69
Mezcla de sales	2.46
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 422.4 calorías por 100g. de dieta.

## DIETA DE MECHUDILLA

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Mechudilla	64.43
Sacarosa	4.34
Glucosa	11.00
Dextrina	0.00
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	9.31
Mezcla de sales	1.20
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 413.33 calorías por 100g. de dieta.

## DIETA DE MUCUNA

<u>Componente</u>	<u>%</u>
Mucuna	39.16
Sacarosa	20.10
Glucosa	19.00
Dextrina	5.55
Manteca vegetal	8.00
Aceite vegetal	4.77
Mezcla de sales	1.85
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	0.00

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 422.4 calorías por 100g. de dieta.

## DIETA DE OJO DE AGUILA

<u>Componentes</u>	<u>%</u>
Ojo de Aguila	42.49
Sacarosa	5.80
Glucosa	19.00
Dextrina	0.00
Manteca vegetal*	4.64
Aceite vegetal	0.00
Mezcla de sales	1.84
Mezcla de vitaminas	2.00
Celulosa	24.83

En esta dieta el nivel de proteínas es de 10g. por 100g. de dieta y de 410.24 calorías/100g. de dieta.

## RESULTADOS:

### 1. Análisis Bromatológico

Los resultados obtenidos en el análisis bromatológico se presentan en el Cuadro I. Se encuentran ordenados conforme al nombre común de la semilla. Los resultados se reportan en base seca.

En el cuadro del análisis bromatológico se denomina Acacia fracción "A" a la corteza de la semilla, fracción "B" a la parte intermedia y fracción "C" a la parte central que contiene el germen.

Como se puede observar el contenido de cenizas de la mayor parte de las semillas, varía entre un 3 y 5%, lo que es normal en las leguminosas. El cuadro muestra el alto contenido de proteínas que presentan las semillas estudiadas, de éstas sobresalen: Acacia fracción "C", palo fierro, lysiloma bahamensis; parota, tepeguaje, acacia siria y alverjón. El contenido de proteínas se presenta en la gráfica No. 1.

El contenido de la grasa de la mayoría de las leguminosas estudiadas es bajo. Sin embargo, algunas tienen un contenido apreciable como son: - Ojo de Aguila, bejuco de agua, guajillo, alampepe, tepeguaje, cassia - fruticosa, acacia fracción "C" y cornezuelo.

La proporción de fibra cruda es muy variable para todas las semillas estudiadas, siendo más alto en las que se analizó el fruto completo.

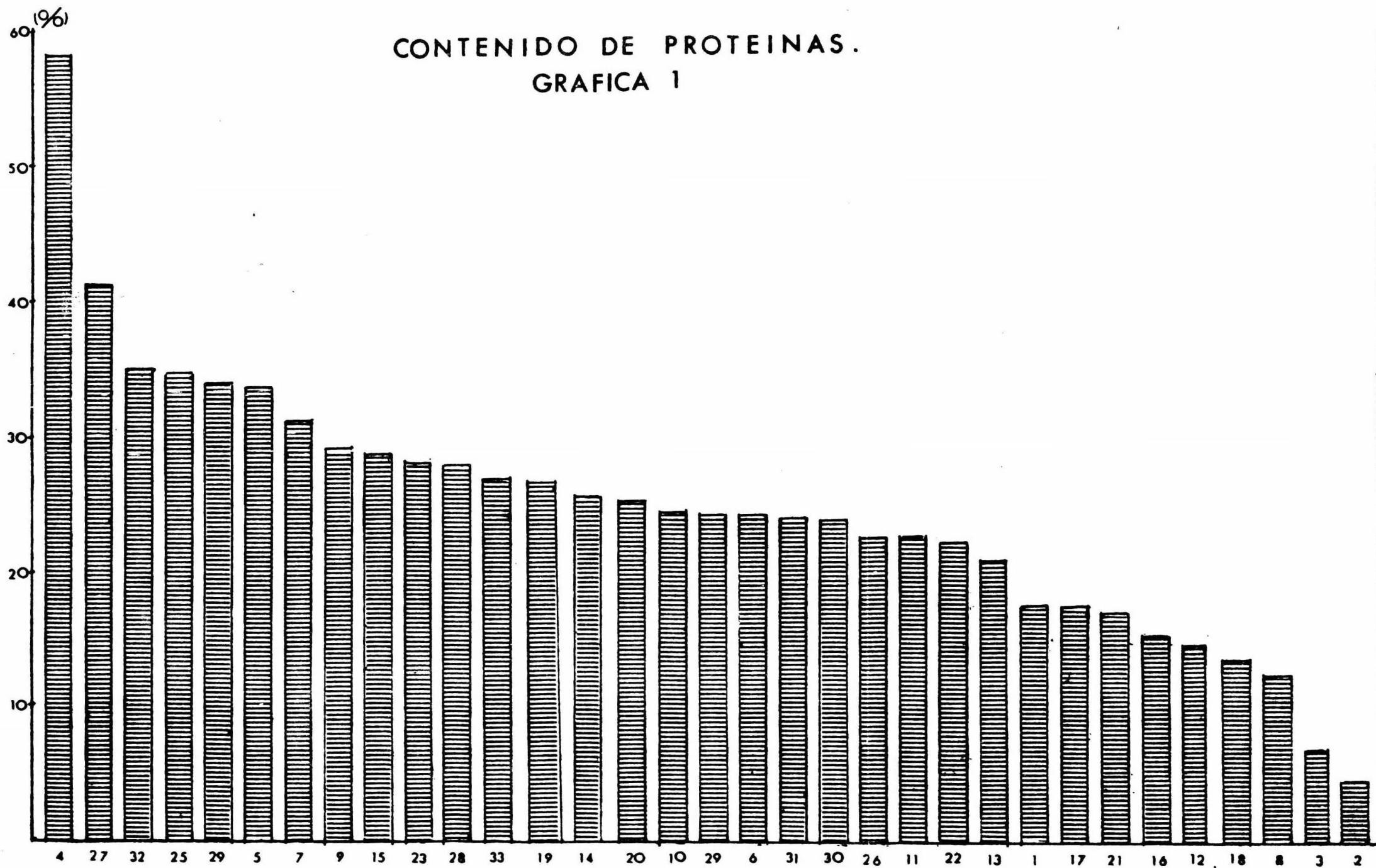
El contenido de carbohidratos es variable y depende de la cantidad de los demás componentes.

CUADRO I

Resultados del Análisis Bromatológico

No.	MUESTRA	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Grasa Cruda (%)	Fibra Cruda (%)	Carbohidratos (%)
1	Acacia	7.64	3.84	17.87	2.27	27.03	49.99
2	Acacia fracción "A"	13.41	7.50	4.72	0.77	53.93	33.07
3	Acacia fracción "B"	7.88	2.07	7.32	1.05	4.76	84.78
4	Acacia fracción "C"	6.28	6.60	58.16	10.86	3.99	20.39
5	Acacia siria	9.47	3.57	33.60	3.13	13.17	35.30
6	Alampepe	6.36	3.23	24.39	13.81	1.99	56.58
7	Alverjón	7.27	3.34	31.15	2.22	14.12	49.17
8	Algarrobo completo	9.52	5.11	12.57	0.85	50.47	41.00
9	Algarrobo semilla	8.49	4.85	29.11	4.18	18.40	43.49
10	Bejuco de agua	2.06	3.32	24.72	21.43	15.85	34.68
11	Caracol	8.90	5.96	22.86	2.37	30.99	37.82
12	Conchin	10.07	5.00	14.60	1.17	51.44	27.79
13	Cornezuelo	3.92	4.06	20.97	10.44	19.77	44.76
14	Frijol castellano	9.79	3.92	25.52	1.14	8.83	60.59
15	Frijol del monte	9.00	3.89	28.96	1.64	10.98	45.53
16	Frijolillo	10.92	1.79	15.03	0.75	9.27	73.16
17	Guajillo	0.44	3.14	17.70	16.21	18.07	44.88
18	Guinolo completo	7.11	5.26	13.70	1.13	31.60	48.31
19	Guinolo semilla	5.76	4.37	26.78	2.58	19.77	46.50
20	Huizache	3.82	3.88	25.12	3.30	18.28	49.42
21	Mechudilla	9.70	3.10	17.18	6.30	20.53	52.89
22	Mezquitillo	4.88	4.46	22.46	3.25	14.23	55.60
23	Mucuna-	10.01	3.50	28.36	3.50	8.71	55.93
24	Ojo de Aguila	3.93	5.30	24.59	24.41	4.87	40.83
25	Parota	7.08	3.76	34.51	2.69	2.58	56.06
26	Palo Fierro completo	6.27	3.89	22.94	3.13	33.16	36.88
27	Palo fierro semilla	33.59	6.14	41.32	8.61	27.36	16.57
28	Palo de gusano	7.52	4.47	27.97	1.02	52.15	14.39
29	Tepeguaje	5.80	3.86	33.94	12.94	13.51	35.75
30	Cassia fruticosa	5.31	4.55	24.00	11.72	20.01	36.08
31	Crotolaria vitellina	2.56	3.82	24.13	2.62	13.54	55.89
32	Lyalloma bahamensis	14.90	7.29	35.17	6.14	18.79	30.61
33	Guinolo-algarrobo	8.16	4.59	27.22	3.36	17.51	47.32

CONTENIDO DE PROTEINAS.  
GRAFICA 1



## 2. - Triptófano e Inhibidores nutricionales.

Como se señaló en la parte experimental se seleccionaron algunas semillas para determinar su contenido de triptófano e inhibidores nutricionales. Los resultados de triptófano se presentan en el Cuadro II y Gráfica 2 .

En el Cuadro III se muestran los resultados encontrados de inhibidores de tripsina. Se puede observar que el contenido de inhibidores de tripsina en las semillas es muy variable, encontrándose en alta proporción sólo en las semillas de Alampepe y Ojo de Aguila. Se muestran también los contenidos de inhibidores de tripsina en frijol negro y soya, como dato comparativo.

En todas las semillas el tratamiento térmico destruye cierta cantidad de - estos inhibidores (gráfica 3) .

En el cuadro IV se encuentran los resultados de hemaglutininas, es importante señalar que no en todas las semillas esta prueba resulta positiva, y que en algunos casos después del tratamiento térmico el contenido de hemaglutininas en lugar de disminuir permaneció constante (huizache y alampepe) o aumentó (algarrobo y soya) ( gráfica 4 ) .

A todas las semillas se les hizo una prueba presuntiva de alcaloides, en todos los casos la prueba resultó negativa.

## 3. - Pruebas biológicas .

Las pruebas biológicas se efectuaron solamente en algunas semillas en las que se contó con la cantidad necesaria para llenar a cabo esta prueba.



## CUADRO II

### CONTENIDO DE TRIPTOFANO

MUESTRA	g. de triptófano/100g.
1. - Acacia "fracción C"	5.52
2. - Alampepe	1.15
3. - Ojo de Aguila	1.15
4. - Mucuna	1.00
5. - Alverjón	0.85
6. - Acacia siria	0.82
7. - Parota	0.79
8. - Cornezuelo	0.72
9. - Frijol del Monte	0.66
10. - Acacia	0.48
11. - Huizache	0.41
12. - Algarrobo semilla	0.30
13. - Palo fierro	0.29
14. - Mechudilla	0.20
15. - Frijol negro (19)	0.21
16. - S o y a (19)	0.52

G/100G. DE PROT.

# CONTENIDO DE TRIPTOFANO

## GRAFICA 2

6

5

4

3

2

1

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

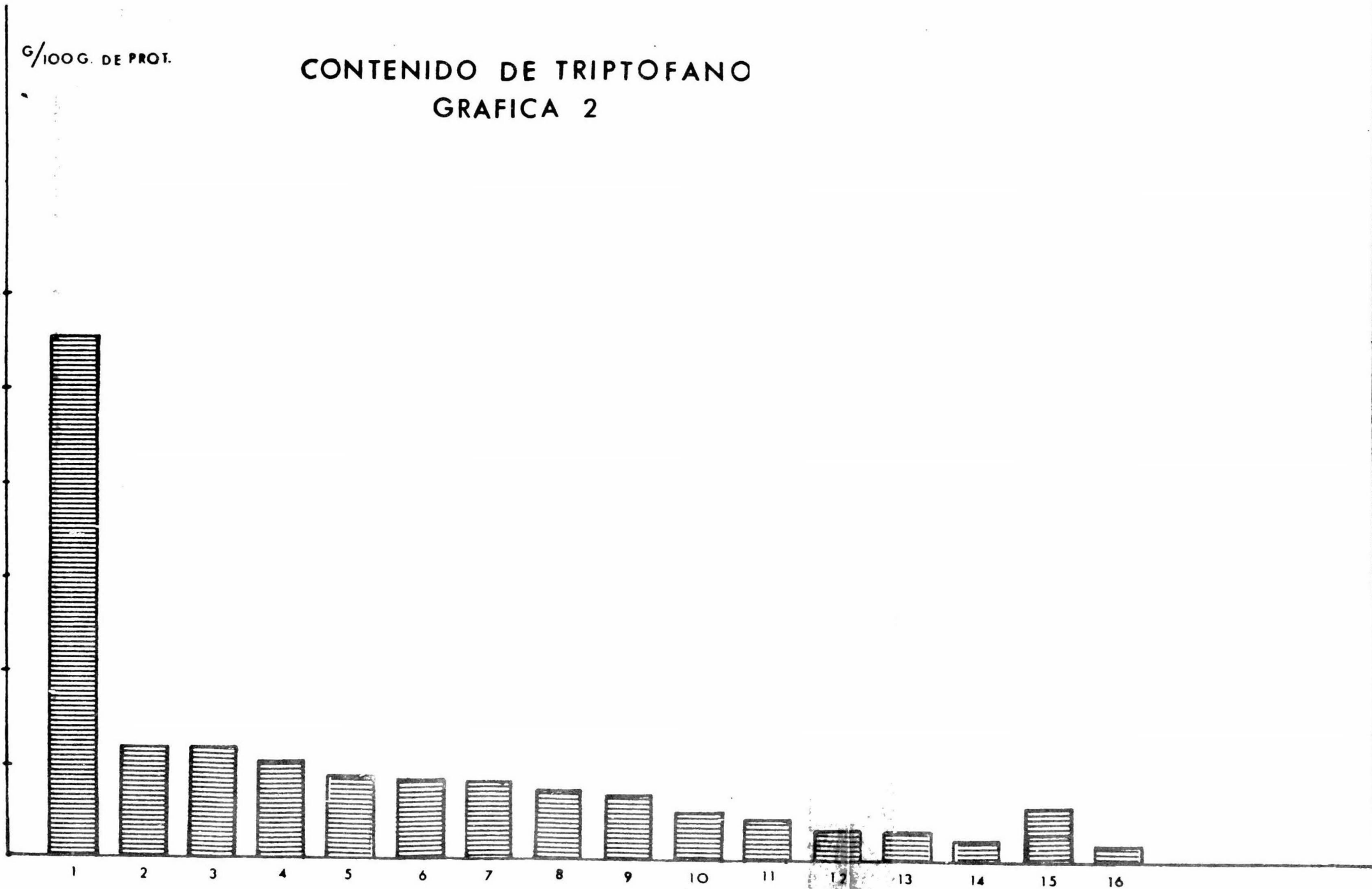
12

13

14

15

16



CUADRO III

INHIBIDORES DE TRIPSINA

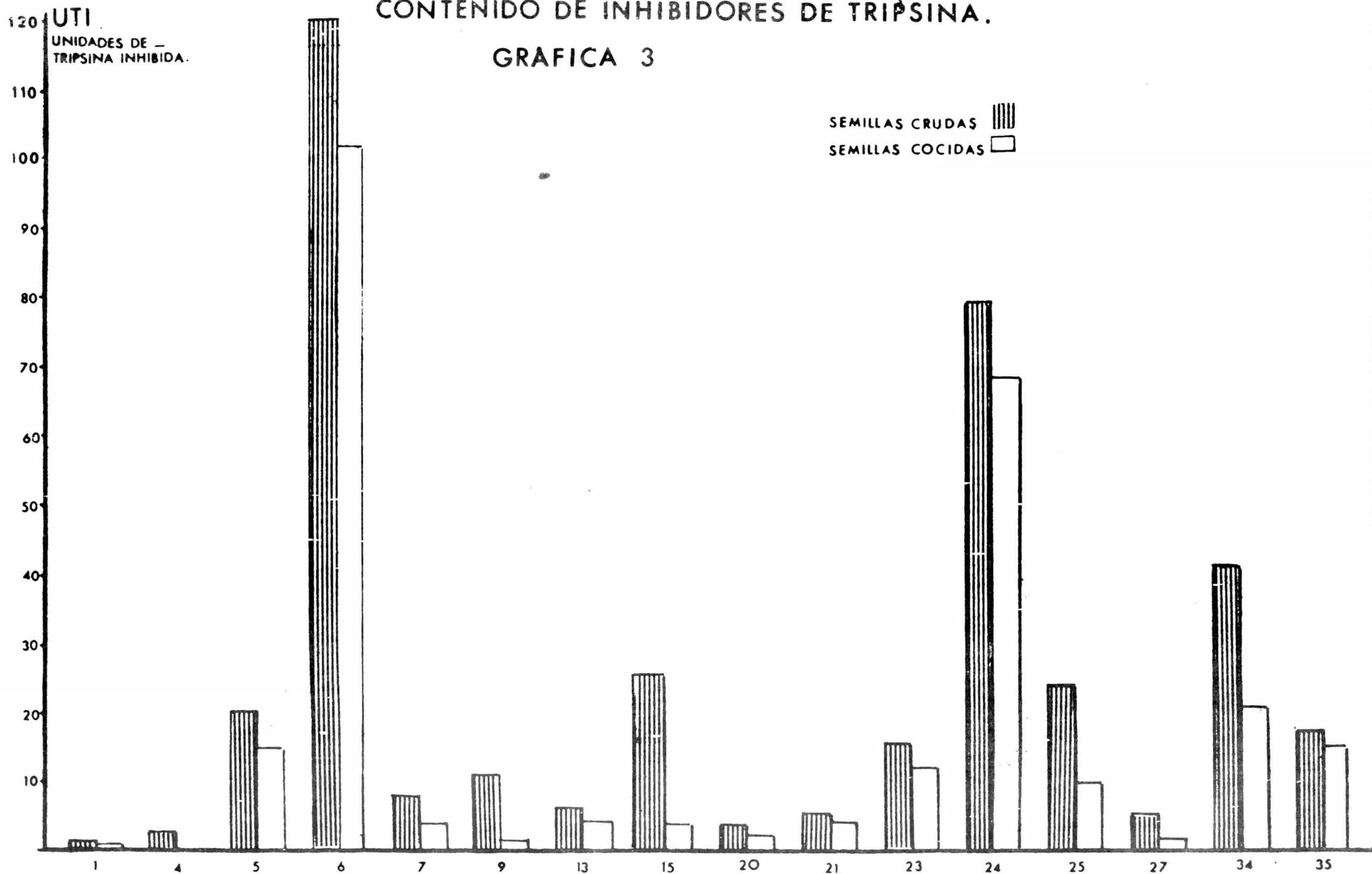
MUESTRA	mgTinh./g. de M.	UTI *
1. - Acacia: CRUDA	2,70	1,64
COCIDA	1,40	0,95
4. - Acacia fracción "C"		
CRUDA	**	
COCIDA	3,51	2,76
5. - Acacia siria:		
CRUDA	23,80	19,93
COCIDA	19,21	15,23
6. - Alampepe:		
CRUDA	149,50	121,51
COCIDA	125,50	102,00
7. - Alverjón: CRUDA	12,20	8,91
COCIDA	7,68	4,33
9. - Algarrobo semilla:		
CRUDA	14,30	11,30
COCIDA	2,40	1,25
13. - Cornezuelo:		
CRUDA	8,55	6,15
COCIDA	7,25	4,66
15. - Frijol del Monte:		
CRUDA	19,90	25,60
COCIDA	3,20	5,50
20. - Huizache: CRUDA	6,70	3,65
COCIDA	4,52	2,08
21. - Mechudilla:		
CRUDA	8,03	5,53
COCIDA	6,53	4,08
23. - Mucuna: CRUDA	14,03	15,45
COCIDA	13,01	12,73
24. - Ojo de Aguila:		
CRUDA	70,70	78,80
COCIDA	66,25	68,00
25. - Parota: CRUDA	20,44	24,04
COCIDA	8,65	9,97
27. - Palo fierro:		
CRUDA	5,52	5,50
COCIDA	3,59	2,20
34. - Soya: CRUDA	41,17	41,90
COCIDA	19,45	21,00
35. - Frijol negro:		
CRUDA	17,21	17,40
COCIDA	13,00	15,50

\* Unidades de tripsina inhibida.

\*\* Como esta fracción se obtiene después de cocer la semilla sólo se muestra un dato.

# CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.

## GRAFICA 3



CUADRO IV  
HEMAGLUTININAS \*

MUESTRA:	ERITROCITOS		DE :
	CONEJO	HUMANA	VACA
1. - Acacia: CRUDA	--	--	1:10
COCIDA	1:10	→ --	→ --
4. - Acacia fracción "C"			
CRUDA	1:10	--	--
COCIDA	**		
5. - Acacia siria:			
CRUDA	--	--	--
COCIDA	→ --	--	--
6. - Alampepe:			
CRUDA	--	--	--
COCIDA	--	→ --	--
7. - Alverjón:			
CRUDA	1:9000	1:1500	1:7000
COCIDA	1:1000	1:500	1:500
9. - Algarrobo semilla:			
CRUDA	1:1000	1:100	1:10
COCIDA	1:1000	1:100	--
13. - Cornezuelo:			
CRUDA	--	--	--
COCIDA	--	--	--
15. - Frijol del monte:			
CRUDA	1:500	1:5000	--
COCIDA	--	--	--
20. - Huizache:			
CRUDA	1:200	1:100	1:50
COCIDA	1:200	1:100	1:100
21. - Mechudilla:			
CRUDA	1:200	1:50	1:50
COCIDA	1:200	1:10	1:50
23. - Mucuna: CRUDA	--	--	--
COCIDA	--	--	--
24. - Ojo de Aguila:			
CRUDA	1:10	1:100	1:10
COCIDA	1:10	1:50	1:10
25. - Parota: CRUDA	--	--	--
COCIDA	--	--	--
27. - Palo fierro:			
CRUDA	--	1:100	1:10
COCIDA	1:50	1:10	--
34. - Soya: CRUDA	1:10	1:10	--
COCIDA	1:1000	1:10	--
35. - Frijol negro:			
CRUDA	1:15000	1:5000	1:10
COCIDA	1:500	1:500	--

\* Dilución máxima que causa aglutinación.

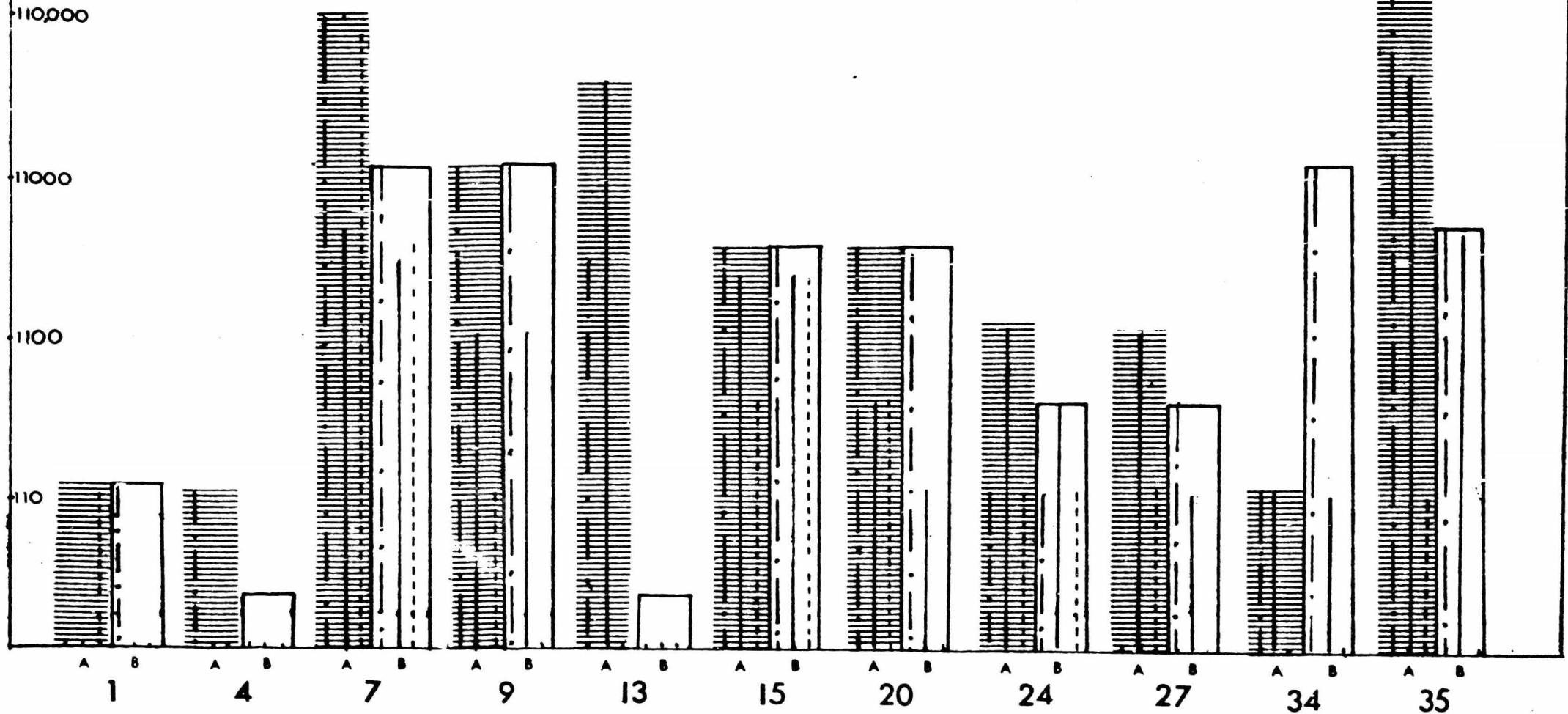
\*\* Como esta fracción se obtiene después de cocer la semilla sólo se obtiene un dato.

UTI  
(UNIDADES DE  
TRIPSINA INH.)

# CONTENIDO DE HEMAGLUTININAS . GRAFICA 4

HEMAGLUTININAS VS.  
ERITROCITOS DE: CONEJO -----  
HUMANO -----  
VACA -----

(A) SEMILLAS CRUDAS  
(B) SEMILLAS COCIDAS



La prueba biológica que se llevó a cabo fue la de "Relación de Eficiencia Proteica" (REP), en la cual como se indicó antes consiste en sacar la relación de 
$$\frac{\text{Peso ganado}}{\text{Proteína consumida.}}$$

En el Cuadro V se muestran los resultados obtenidos en 3 de las muestras estudiadas. En la gráfica 5 se muestran las curvas de crecimiento de este estudio.

CUADRO V  
Relación de Eficiencia Proteica

Muestra	R E P
Acacia	0.53
Acacia fracción "C"	1.61
Parota	1.16
Caseína *	2.24

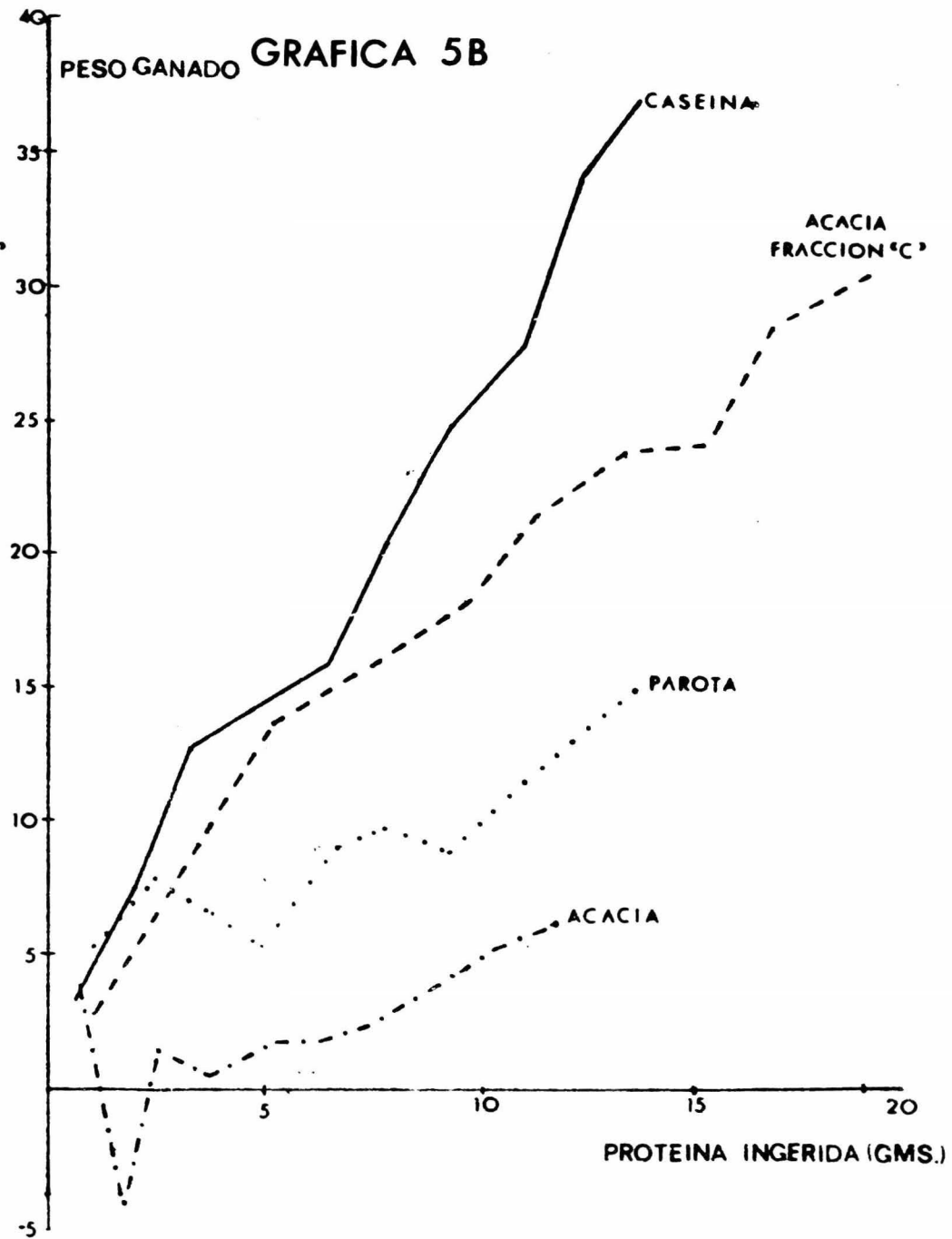
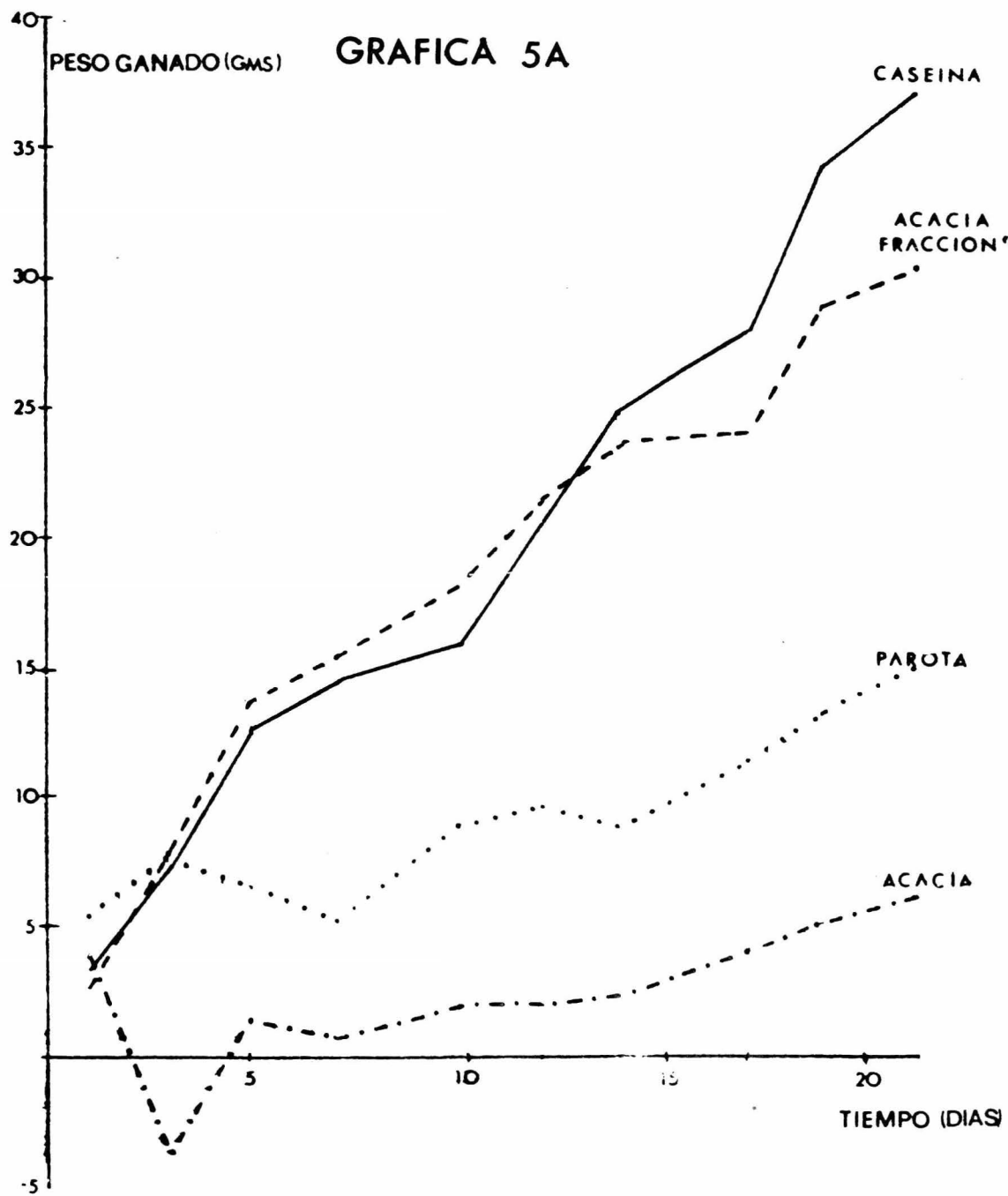
\* El REP de caseína se usa como referencia en las pruebas biológicas.

En la gráfica 5A se observa que la curva de crecimiento de fracción "C" de acacia, es muy similar a la de caseína en tanto que la de acacia entera y parota son menores.

En la gráfica 5B se observa que la cantidad de proteína ingerida con respecto a caseína es mayor en el caso de la fracción "C" con lo que se disminuye su REP.

Las pruebas biológicas también se hicieron con otras semillas: alampepe, alverjón, cornezuelo, huizache, meciudilla, mucuna y ojo de águila.

# CURVAS DE CRECIMIENTO





Los resultados de estas pruebas fueron negativos, ya que las ratas se murieron antes de terminar el experimento. Esto se debe quizá a la presencia de otros factores tóxicos, o a la parcial destrucción de los que aquí se estudiaron.

### CONCLUSIONES:

1. - Las leguminosas estudiadas tienen un alto contenido de proteínas, lo que indica su posible uso potencial como alimento humano o animal.
2. - Las leguminosas además de complementar a las proteínas de cereales, podrían ser de fácil aceptación por la población, presentándolas en las formas de alimentos habituales.
3. - El alto contenido de grasas en algunas de las semillas permitirá su uso como alimento energético o para aplicación industrial, una vez que se haya determinado su contenido de ácidos grasos.
4. - En algunas de las semillas existe un alto contenido de fibra cruda, lo que limitaría su uso como alimento humano, pero podrían ser utilizadas como alimento animal.
5. - La mayoría de las leguminosas estudiadas presentan un elevado nivel de carbohidratos asimilables.
6. - Una de las limitaciones que se encontró en el uso de estas leguminosas como alimento, fue la presencia de sustancias tóxicas, como se puso de manifiesto por pruebas biológicas. Consideramos que el tratamiento térmico dado, no fue suficiente para destruir los inhibidores nutricionales.

Sin embargo, pensamos que una cocción de la semilla con agua durante 2.5 horas aproximadamente, que es la forma tradicional de cocinar las leguminosas comestibles con un contenido tóxico similar a nuestras leguminosas, eliminaría casi en su totalidad a los inhibidores nutricionales que pudieran estar presentes.

7. - Los resultados de REP son similares a los de las leguminosas comestibles y debido a su deficiencia en algunos aminoácidos, principalmente los azufrados, consideramos que su REP puede incrementarse al ser suplementos con algunos cereales.

8. - No nos quedó claro en algunas pruebas biológicas si los resultados negativos se debieron a un bajo contenido de aminoácidos esenciales o a la presencia de algunas sustancias tóxicas. Por lo que consideramos que es necesario profundizar en nuestro estudio antes de poder sacar algunas conclusiones.

9. - La conclusión final de este trabajo es que México ofrece en su flora silvestre, un enorme potencial de nuevos alimentos que es necesario estudiar de una manera sistemática y que el avance de la tecnología moderna permitiría aprovecharlas, eliminando sus caracteres tóxicos.

## REFERENCIAS

1. - W.M. Jackson: Enciclopedia práctica Jackson, Inc. 1960. México, D. F.,
2. - Aykroyd, W.R.; Doughty, J.: Las leguminosas en la nutrición humana. FAO. Roma, 1964 .
3. - Hughes, H.D., Heath, M.E. and Metcalfe, D.S.: Forrajes. Editorial CECSA, 1a. Ed. 1966, México, D. F.,
4. - Semple, A. T.: Avances en pasturas cultivadas y naturales. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 1974 .
5. - National Academy of Science. Toxicants Occurring Naturally in Foods. 2a. Ed. Washington, D. C., 1973 .
6. - Protein Advisory Group of the United Nations System. Nutritional Improvement of Legumes Breeding. FAO. Roma, 1973 .
7. - Rodwell, W.S., : Nutrición y Dietoterapia. Editorial Pax, México, 1a. Ed. 1973 .
8. - Revista Tecnología de Alimentos 1973, VIII:3:116, Mayo-Junio .
9. - Xorge A. Domínguez: Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México, 1973 .
10. - Merck Index of Chemical and Drug. 8a. Edición. Editorial Merck Anal. Co. Inc. (1968) .
11. - Revista Tecnología de Alimentos. 1974, IX:2:76, Marzo-Abril.
12. - Escobar, R.: Enciclopedia Agrícola y de Conocimientos Afines. Ciudad Juárez, Chihuahua, 1962 .
13. - Maximino Martínez: Las Plantas Medicinales de México. 3a. Ed. Ediciones Botas, 1944 .
14. - Official Methods of Analysis. 11a. Edición 1970, Washington, USA.
15. - Lombard, J.H. y Lange, D.S.: The Chemical Determination of Tryptophan in Food and Mixed Diets.

- 16.- Kakade, M.L.; Simons, N.; Liener, I.E. An Evaluation of Natural vs Synthetic Substrates for measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. *Cereal Chemistry*, 46:518-526, (1969) .
- 17.- Jaffé, N.G.; Leney, A.; and González, D.: Isolation and Partial characterization of Bean Phytohemagglutinins. *Biochemistry* 13:2685-2693, (1974) .
- 18.- Bressani, R. : Evaluación biológica de proteínas. INCAP. Guatemala, (1970) .
- 19.- Tablas de composición de alimentos para uso en América Latina, INCAP-ICNND, 1961 .