



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

---

---

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA

**“DESARROLLO DE UNA HARINA DE SEMILLA DE GUAJE**

*Leucaena esculenta* PARA USO ALIMENTICIO”

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

Presenta:

**GUADALUPE GARCÍA MACEDA**

Bajo la supervisión de: **DIANA GUERRA RAMÍREZ, DRA.**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, diciembre 2019

**“DESARROLLO DE UNA HARINA DE SEMILLA DE GUAJE *Leucaena  
esculenta* PARA USO ALIMENTICIO”**

Tesis realizada por **Guadalupe García Maceda**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:



DR. DIANA GUERRA RAMÍREZ

ASESORA:



DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

ASESORA:



DRA. ROCÍO GUADALUPE CASAÑAS PIMENTEL

## CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>10</b>
<b>DATOS BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	<b>12</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 Las leguminosas.....	16
2.2 Toxicidad de las semillas de <i>Leucaena ssp.</i> ....	20
2.3 Proceso termoalcalino o nixtamalización .....	21
2.4 Proteínas .....	22
2.5 Antioxidantes.....	24
2.5.1 Polifenoles .....	24
2.6 Lípidos .....	26
2.7 Diseño San Cristóbal.....	28
2.8 Literatura citada.....	29
<b>III. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA DE LAS SEMILLAS DE GUAJE</b> .....	<b>34</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>34</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>35</b>
3.1 Introducción .....	36
3.2 Materiales y métodos.....	37
3.2.1 Material vegetal .....	37
3.2.2 Reactivos e instrumentación.....	38
3.2.3 Caracterización fisicoquímica de las semillas secas de guaje .....	39

3.2.4	Análisis proximal .....	39
3.2.5	Determinación de calcio .....	41
3.2.6	Propiedades antioxidantes.....	41
	Determinación de fenoles totales .....	41
	Determinación de flavonoides .....	42
	Ensayo DPPH .....	42
	Ensayo ABTS .....	43
3.2.7	Determinación de mimosina.....	43
3.3	Resultados y discusión .....	44
3.3.1	Propiedades antioxidantes.....	48
3.3.2	Determinación de mimosina.....	48
3.4	Conclusiones.....	49
3.5	Literatura citada.....	50
<b>IV.OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO TERMOALCALINO DE LAS SEMILLAS DE GUAJE (<i>Leucaena esculenta</i> (DC) Benth) PARA OBTENER HARINA .....</b>		<b>53</b>
	RESUMEN .....	53
	ABSTRACT .....	54
4.1	Introducción .....	55
4.2	Materiales y métodos.....	56
4.2.1	Diseño estadístico.....	56
4.2.2	Material vegetal .....	57
4.2.3	Estandarización del proceso termoalcalino.....	57
4.2.4	Experimentación termoalcalino con base en el diseño San Cristóbal.	60
4.2.5	Proceso termoalcalino de la harina de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth, en condiciones óptimas .....	62
4.2.6	Propiedades nutricionales de la harina.....	63
4.2.7	Propiedades antioxidantes.....	64
	Determinación de fenoles totales .....	65
	Determinación de flavonoides .....	65

Ensayo DPPH .....	66
Ensayo ABTS .....	66
4.2.8 Determinación de mimosina.....	67
4.2.9 Obtención de un extracto enriquecido en proteínas a partir de las semillas y la harina de <i>Leucaena esculenta</i> (DC) Benth.....	67
4.2.10 Electroforesis.....	69
4.2.11 Prueba de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	70
4.3 Resultados y discusión .....	71
4.3.1 Análisis realizados al agua residual de cocimiento .....	72
4.3.2 Optimización del proceso termoalcalino de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth.....	74
4.3.3 Condiciones óptimas del proceso termoalcalino en semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth para la producción de harina.....	76
4.3.4 Análisis proximal de harina.....	76
4.3.5 Determinación de minerales .....	77
4.3.6 Determinación de ácidos grasos .....	78
4.3.7 Determinación de antioxidantes.....	78
4.3.8 Determinación de mimosina.....	79
4.3.9 Ensayos de citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).....	79
4.3.10 Electroforesis.....	82
4.4 Conclusiones.....	87
4.5 Literatura citada.....	87
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Combinaciones de tratamientos.....	28
Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica, nutrimental, antioxidante y toxicidad de <i>Leucaena esculenta</i> (DC) Benth.....	47
Cuadro 3. Niveles de las variables de la matriz San Cristóbal para el proceso termoalcalino.....	58
Cuadro 4. Puntos factoriales para la matriz de San Cristóbal.....	59
Cuadro 5. Tratamientos obtenidos a partir de la matriz San Cristóbal para el proceso termoalcalino de las semillas secas <i>L. esculenta</i> (DC) Benth.....	59
Cuadro 6. Durezas de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth.....	71
Cuadro 7. Porcentaje de retención de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth.....	72
Cuadro 8. Niveles de los factores experimentales.....	72
Cuadro 9. Condiciones óptimas del proceso termoalcalino en semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth.....	76
Cuadro 10. Análisis proximal de la harina obtenida de semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth con proceso termoalcalino y sin proceso termoalcalino.	77
Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos del aceite de la harina de semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth con proceso termoalcalino extraído por el método Soxhlet (%). .....	78
Cuadro 12. Propiedades antioxidantes de harina semillas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth antes y después del proceso termoalcalino.....	79
Cuadro 13. Extracción de proteínas de la harina sin proceso termoalcalino y harina con proceso termoalcalino de las semillas secas <i>L. esculenta</i> (DC) Benth por el método de Bradford .....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Leucaena esculenta</i> (DC) Benth.-----	38
Figura 2. Representación gráfica de los parámetros Hue y Croma de la harina de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth. (CIELAB color chart). -----	46
Figura 3. Diagrama de bloques del proceso termoalcalino de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth. -----	61
Figura 4. Efecto de cocción de 40 minutos, tiempo de cocción y tiempo de reposo sobre el contenido de calcio en la harina de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth, desarrollada por el proceso termoalcalino.-----	75
Figura 5. Efecto del CaO y el tiempo de reposo sobre el contenido de proteína en la harina de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth desarrollada por el proceso termoalcalino. -----	76
Figura 6. Citotoxicidad del extracto proteico de la harina de semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth sin proceso termoalcalino. Por cada grupo n = 6, el signo (▼) indica que son estadísticamente diferentes de los controles (Tukey, P≤0.05). -----	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 7. Citotoxicidad del extracto proteico de la harina semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth sin proceso termoalcalino. Por cada grupo n = 6, el signo (▼) indica que son estadísticamente diferentes de los controles (Tukey, P≤0.05). -----	81
Figura 8. Perfil electroforético de las fracciones proteicas de la harina de las semillas secas de <i>L. esculenta</i> (DC) Benth. Carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA) con un peso molecular de 66.430 kDa como control, carril 3) Muestra del extracto proteico de la harina sPT y en el carril 4) Muestra del extracto proteico de la harina cPT. -----	84

Figura 9. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Glutelinas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Glutelinas.-----85

Figura 10. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Globulinas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Globulinas.-----85

Figura 11. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Albúminas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Albúminas. -----86

Figura 12. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Prolaminas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Prolaminas. -----87

## **AGRADECIMIENTOS**

A México, mi hermosa Nación y a las políticas del Gobierno Federal que permiten tener los apoyos económicos para realizar estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento y las facilidades permitidas para la culminación de este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en particular al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por la oportunidad que se me brindó y por permitirme alcanzar un éxito más en mí vida.

A la Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada, por su valioso y gran apoyo para la culminación de esta investigación. Que además de ser una gran profesional, la caracteriza su humanidad y carisma. Usted que a pesar de todo sigue confiando en sus estudiantes y no cualquier docente se atreve hacerlo; Usted que da por el otro sin recibir o esperar nada a cambio.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez, por todo el apoyo dado para concluir con este trabajo y por ser parte importante para lograrlo. Usted que a pesar de todo me proporcionó su confianza y amistad, no habrá forma de compensar lo que me brindó en toda la extensión de la palabra.

A la Dra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel, por sus aportaciones y apoyo incondicional, realmente haberla conocido y trabajar con Usted fue de gran bendición, Usted una gran profesional y un extraordinario ser humano.

A la M. C. Ofelia Buendía González, por todo el apoyo desinteresado, por sus aportaciones relevantes en este trabajo de investigación, pero sobre todo por su amistad y confianza.

A la Dra. Willelmira Castillejos López, por enseñarme, que ser persistente es mejor que corromperse, que es mejor alcanzar un objetivo planteado, aunque el camino sea largo y pesado, al final el resultado sabe mejor.

A todos los trabajadores académicos, administrativos y no docentes del Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria del Departamento de Ingeniería Agroindustrial y del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, que de alguna manera contribuyeron para alcanzar este objetivo.

## DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios, a mi Señor Todopoderoso Jesús Cristo, por todo su amor y misericordia. Todo es gracias a Usted y todo es para Usted. ¡Lo amo Padre!

A los seres más hermosos que Dios puso al cuidado de mí, mis padres, que amo con todo mi corazón. Mamá Lucy, muchas gracias por todo su apoyo, de usted he aprendido aferrarme hasta alcanzar lo que uno se propone, gracias por todo su amor y los cuidados que ha tenido conmigo, esto es una muestra de las cosechas que usted sigue cultivando. A usted papá, gracias por sus sugerencias y apoyo incondicional, me han sido de gran ayuda, de usted he aprendido que con lo que Dios nos da, podremos multiplicarlo, muestra clara es la familia. Este logro es dedicado a ustedes. ¡Esto es de ustedes!

A cada uno de mis queridos hermanos y hermanas: Alvarito<sup>†</sup>, Mónica, Fredy, Rogelio, Rufino, Jesús, Karina y Socorro, gracias doy a Dios por sus vidas.

A mis queridos y hermosos sobrinos y sobrinas: Uriel, Abigail, Cristian, Jair, Álvaro, Emmanuel, Ximena y “bebé” (hermosa bendición que Dios ha enviado a casa). Ustedes han sido mi ánimo en momentos de dificultad y son la demostración existente que Dios es real.

A la familia García Ybarra por su incondicional apoyo y confianza, de manera especial y con gran cariño a la Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada y al Dr. J. Rodolfo García Nava. ¡Dios les bendiga mucho!

A la familia Solís Trueba por la confianza y el apoyo brindado, por permitirme ser parte de su gran familia, muchas gracias Ely, muchas gracias Dr. Solís. ¡Bendiciones!

Al Q.F.B. Adalberto Gómez Cruz por su apoyo incondicional y desinteresado, al Ing. Fabian del laboratorio del Departamento de Zootecnia, por su gran ayuda.

A todos mis amigos y seres queridos con los cuales tuve la oportunidad de coincidir en esta maravillosa etapa: Nathaly, Yaneth, Néstor, Daniel, Bernabé, Rosy, Lety, Karen, Graciela, Vero, Pepe, Didy, Melchor, Areli, Esperanza, Cornejo, Armando, Fer, Juanito, Wilson, Erich, Ale, Laura, Jorge, Ismael, Jenny, Gloria.

A mis compañeras y amigas de la maestría: Perlita, Carlita, Magdiel, Dianita, Dalila, Silvia, Dulce y Beto.

“Clama a mí, y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces”.

**Jeremías 33:3**

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Guadalupe García Maceda nació en San Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodríguez Puebla, el 03 de noviembre de 1986. Estudió la licenciatura en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo (2005-2010), tiene un Diplomado en Estrategias de Evaluación e Investigación Didáctica, en la Universidad Autónoma Chapingo. Fue docente en el nivel medio superior en la Preparatoria Oficial Núm. 171, del año 2011 al 2017.

## RESUMEN GENERAL

### DESARROLLO DE UNA HARINA DE SEMILLA DE *Leucaena esculenta* (DC) Benth PARA USO ALIMENTICIO

Las semillas de *Leucaena esculenta*, pertenecientes a la familia Leguminosae, se caracterizan por su alto valor nutritivo. En diferentes comunidades de México se consumen frescas, sin embargo, las semillas secas son subutilizadas. El objetivo de esta investigación fue modificar algunas propiedades nutricionales de las semillas secas de *Leucaena esculenta*, mediante un proceso termoalcalino, para la obtención de una harina útil en la preparación de alimentos. Para optimizar el proceso termoalcalino se aplicó el diseño San Cristóbal, teniendo como respuestas el calcio y la proteína. Las propiedades nutricionales y nutracéuticas de las semillas procesadas fueron comparadas con aquellas de las semillas sin procesar, además, en las semillas procesadas se evaluó la toxicidad y se aislaron las fracciones proteicas. De acuerdo con los resultados, las condiciones óptimas del proceso termoalcalino fueron las siguientes: para 100 g de semillas se utilizó una solución (300 mL) de óxido calcio a una concentración de  $0.004 \text{ g mL}^{-1}$ , 42 minutos de cocción y 8 h de reposo. En la harina de semillas secas con proceso termoalcalino el calcio aumentó en un 85 %, la fibra cruda fue 14.89 % menor, además se determinó que el ácido graso más abundante fue el linoleico (35.80 %) y que las fracciones proteicas mayoritarias corresponden a las glutelinas (56.40 %). Finalmente, la mimosina, aminoácido tóxico presente en las plantas del género *Leucaena*, no presentó diferencias significativas respecto a las semillas sin procesar. El desarrollo de esta harina, mediante la optimización del proceso termoalcalino, permitirá dar un uso alternativo a las semillas secas de *Leucaena esculenta*.

**Palabras clave:** Leguminosae, proceso termoalcalino, método San Cristóbal.

---

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Guadalupe García Maceda

Director de Tesis: Diana Guerra Ramírez, Dra.

## GENERAL ABSTRACT

### FLOUR DEVELOPMENT FROM SEEDS OF *Leucaena esculenta* (DC) Benth FOR FOOD USE

Seeds of *Leucaena esculenta* belong to the Leguminosae family and they have a high nutritional value. Fresh seeds are consumed in different communities of Mexico; however, dried seeds are underutilized. The objective of this research was to modify some nutritional properties of the dried seeds of *Leucaena esculenta* by a thermal-alkaline process, in order to obtain a useful flour for food preparation. A San Cristóbal design was used to optimize the thermal-alkaline process with calcium and protein as response variables. The nutritional and nutraceutical properties of the processed seeds (thermal-alkaline) were compared with those of the unprocessed raw seeds, in addition, in the processed seeds the toxicity was evaluated and the protein fractions were isolated. The optimal conditions of the thermal-alkaline process were: for 100 g of seeds a solution (300 mL) of calcium oxide at a concentration of  $0.004 \text{ g mL}^{-1}$ , 42 minutes of cooking and 8 h of rest. Calcium increased in 85 %, in flour of dry seeds with thermal-alkaline process, crude fiber was 14.89 % smaller with respect to the unprocessed seeds. In addition it was determined that the most abundant fatty acid was the linoleic (35.80 %) and that the majority protein fractions correspond to the glutelins (56.40 %). Finally, mimosine, a toxic amino acid present in seeds of the genus *Leucaena* did not present significant differences regarding the unprocessed seeds. The development of this flour, through the optimization of the thermal-alkaline process, may be an alternative for the utilization of dry seeds of *Leucaena esculenta*.

**Keywords:** Leguminosae, thermal-alkaline process, San Cristóbal method.

---

Thesis: Universidad Autónoma Chapingo.  
Author: Guadalupe García Maceda  
Advisor: Diana Guerra Ramírez, Dra.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente un tercio de la población mundial enfrenta problemas de seguridad alimentaria, en respuesta, la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación han impulsado la investigación en torno a nuevas fuentes de alimentación nutricional (Joshi *et al.*, 2018). México cuenta con una gran diversidad vegetal. Entre las principales especies vegetales que se usan como fuente alimentaria, se encuentran las plantas pertenecientes a la familia Leguminosae, las cuales ocupan uno de los primeros lugares después de los cereales. En la actualidad las leguminosas son uno de los alimentos de origen vegetal de mayor consumo en dietas de los países en vías de desarrollo (Astiasaran y Martínez, 2000).

En varias comunidades rurales del sureste del Estado de Puebla, específicamente en San Felipe Otlaltepec, la leguminosa *Leucaena esculenta* (DC) Benth (guaje), se aprovecha para múltiples propósitos: como alimento, medicina tradicional, forraje y combustible. Las vainas de *Leucaena esculenta*, cosechadas entre los meses de septiembre y enero se comercializan principalmente a distribuidores de la Ciudad de México (CDMX), al inicio de la cosecha su precio es de aproximadamente \$100.00/ kg de guaje, pero conforme más abundante es la producción de guaje, el precio disminuye hasta \$5.00/ kg. Las vainas que quedan en los árboles se dejan secar y las semillas secas son vendidas entre \$30.00-35.00 por 5 kg.

En algunas investigaciones previas sobre los usos de *Leucaena spp.* se describe la obtención de harina a partir de sus hojas, la cual se utiliza como alimento para aves. Así mismo, se han hecho estudios etnobotánicos, bromatológicos, toxicológicos en brotes, botones florales y semillas de guaje

verde. Entre las propiedades medicinales de esta especie, se han documentado: efectos antiinflamatorio y antidiabético, también se utiliza como alimento balanceado para el ganado ovino y en la restauración ecológica, (Rodríguez, 2007; Sánchez, 2014; Abou *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2017; Salem *et al.*, 2011; Chotivannakul *et al.*, 2016; Syamsudin *et al.*, 2010; Imededdine *et al.*, 2014).

Esta investigación se dividió en dos etapas: la identificación botánica del guaje para tener la certeza de la especie bajo estudio y al mismo tiempo, las semillas secas se caracterizaron por sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y nutraceuticas. Posteriormente, las semillas se sometieron a tratamientos termoalcalinos, para determinar la cantidad de óxido de calcio, tiempo de cocción y tiempo de reposo, que permitan desarrollar una harina para consumo humano con propiedades alimenticias y nutricionales adecuadas.

El objetivo general de esta investigación fue: desarrollar harina a partir de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth, utilizando el diseño San Cristóbal, en función a los factores: óxido de calcio, tiempo de cocción y tiempo de reposo, las respuestas concentración de iones calcio y porcentaje de proteína. El diseño permitió estimar el punto óptimo del proceso termoalcalino aplicado a las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Las leguminosas

La familia de las Fabaceae o Leguminosae, extendida por todo el planeta, excluyendo regiones polares y desiertos de temperaturas extremas, cuenta con cerca de 20,000 especies y 750 géneros (Lewis *et al.*, 2013). Se divide en tres subfamilias: la Papilionaceae compuesta por 476 géneros y 13,860 especies, la Caesalpinaceae con 160 géneros y aproximadamente 1,900 especies y la Mimosaceae compuesta 82 géneros y 3,300 especies. Otras leguminosas están distribuidas en las tribus: Cercideae y Detarieae. La primera compuesta por árboles y lianas con 4 a 12 géneros y aproximadamente 265 especies, dentro de las cuales el género más representado es Bauhinia, mientras que la segunda tribu incluye aproximadamente 80 géneros compuestos por numerosas especies de árboles tropicales, entre ellos algunos maderables que se distribuyen en África y Sudamérica (Villanueva *et al.*, 2010). Es la tercera mayor familia de plantas angiospermas (después de Orchidaceae y Asteraceae que llegan a las 25.000 especies). Económicamente, las leguminosas representan la segunda familia más importante de las plantas cultivadas después de la familia de las gramíneas o poaceae que incluye los cereales. Las leguminosas de grano representan el 27 % de la producción agrícola mundial y proporcionan el 33 % de la proteína de la dieta consumida por los seres humanos, mientras que los pastos y leguminosas forrajeras proporcionan parte vital de la alimentación animal (Koenen *et al.*, 2013).

La principal característica de la familia Fabaceae radica en la posesión de un fruto conocido como legumbre. La definición botánica de legumbre es: fruto seco, dehiscente, pluriseminado, que en la madurez se abre por dos líneas correspondientes a la sutura y al nervio central del único carpelo que constituye el gineceo en cada flor (Llamas y Acedo, 2016).

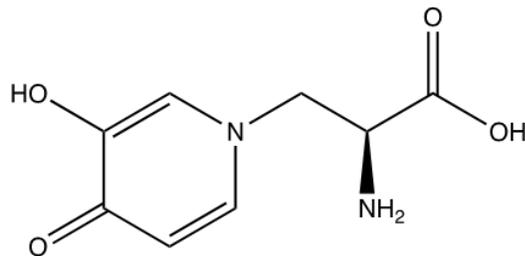
Las leguminosas, cuyo uso se remota a tiempos inmemoriales, tienen elevado contenido proteico, entre el 20 y 25 % (Nadal, Moreno y Cubero, 2004), destacan por su contenido en hidratos de carbono, en algunos minerales y vitaminas, y por su baja cantidad de grasa, las convierte en una importante y económica fuente de proteínas vegetales (Astiasaran y Martínez, 2000).

Las leguminosas contribuyen a la seguridad alimentaria, a la nutrición, a la salud, a combatir el cambio climático y a favorecer la biodiversidad. Muchas de ellas han sido cultivadas como ornamentales, otras como plantas forrajeras y otras por sus semillas o legumbres comestibles o porque de ellas se extraen aceites, tinturas o principios activos medicinales (Llamas *et al.*, 2016). Además, forman parte de sistemas agroforestales y son importante en la restauración ecológica (Martínez, 2014).

El árbol del guaje, cuyo nombre científico es *Leucaena esculenta* (familia Leguminosae o Fabaceae, subfamilia Mimosoideae), llega a medir de 4 a 12 m de alto, su corteza es lisa y de color gris claro brillante, suberizada, ramas angostamente aladas, cuando jóvenes con diminutas verrugas, pinnas 32 pares, 3 a 13 cm de largo; folíolos 64 pares, glándulas nectaríferas o nectario peciolar una entre el primer par de pinnas, a veces una entre los primeros dos o más pares; inflorescencia pedunculada 1.5 a 4.5 cm; capítulos en antesis 1.3 a 2.5 cm de diámetro, en botón 7 a 12 mm de diámetro, a veces elipsoides; cáliz 2.5 a 3.8 mm de largo, corola 3.5 a 5 mm de largo, anteras incoloras, infrutescencia pedunculada de 1.5 a 4.5 cm de largo; fruto 14 a 24 cm de largo, 1.4 a 2.5 cm de ancho, membranáceo, generalmente rojizo, a veces pardo. Semillas obovadas, frecuentemente suborbiculares paniculadas, 8 a 9 mm de

largo, 5 a 6 mm de ancho, castaño- rojizas o amarillentas (Sprent, 1995; Zarate, 1994). Esta especie, es ampliamente propagada y consumida en países en vía de desarrollo y representa una alternativa alimenticia por su alto contenido proteico (Reyes, 2014).

En algunas áreas rurales de la América Central y del Sudeste de Asia, así como en México en la depresión del Balsas, la gente consume las vainas tiernas y las hojas como un vegetal cocido, mientras que las semillas se utilizan como un sustituto del café (Dijkman, 1980). Según Román, García, Castillo, Sahagún, y Jiménez (2014). Las semillas de *L. esculenta*, presentan mayores niveles de N, Mg, Mn, P y Zn, lípidos, concentración de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides, que las de *L. leucocephala*, pero ambas presentaron niveles similares de proteína y fibra cruda. Las especies de este género, suelen contener sustancias antinutricionales como la mimosina (1), aminoácido no proteico de características tóxicas. Este aminoácido aromático se localiza en las hojas y semillas de la planta y representa entre un 2-10 % (Pound y Martínez, 1985).



(1)

Esta variación depende de la especie, variedad, estado de la planta y época de cosecha, la mayor parte de la mimosina se concentra en las partes tiernas en crecimiento activo. Es decir, las hojas tiernas contienen dos o tres veces más mimosina que las hojas maduras y el follaje de tres a cuatro veces más que los tallos (Pound y Martínez, 1985). El potencial tóxico de la mimosina hace que el consumo de *Leucaena spp.* sea riesgoso (NAS, 1984).

En cuanto a la distribución geográfica de las especies de *Leucaena*, según Chung, Chen, Chang, Yang y Lin (2017) la *L. leucocephala*, es nativa del sur de México y el norte de América Central, actualmente se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales, incluyendo Australia, el sur de la India, África, América del Sur, Filipinas y Taiwán.

La *Leucaena esculenta*, se distribuye sobre todo en la sierra madre del sur, en la depresión del Balsas y abarcando también la región de la Cañada (depresión de Tehuacán – Cuicatlán – Quiotepec) y la zona de las sierras y tierras altas mixteco zapotecas. En otras localidades se presenta como especie exótica cultivada. Se localiza en selva baja caducifolia; cultivada o espontánea. Altitudes de 850 a 2100 msnm de preferencia en suelo calizo. Su floración y fructificación se presenta de agosto a marzo (a veces hasta mayo) y de noviembre a marzo (a veces desde agosto). Registros actuales de árboles cultivados se encuentran en localidades alejadas en los estados de Sonora, Hidalgo, Chiapas y la costa de Oaxaca y el área de distribución natural se encuentra en la zona central de Guerrero, Morelos y sur de Puebla (Sánchez, 2014).

En varias comunidades rurales del Sureste del Estado de Puebla, específicamente en San Felipe Otlaltepec la *L. esculenta* (DC) Benth, se aprovecha para múltiples propósitos: como alimento, en medicina tradicional, forraje, maderable y combustible. Además, en otras comunidades forma parte de sistemas agroforestales y es importante en la restauración ecológica (Martínez, 2014).

En México existe una gran riqueza productiva y diversidad vegetal, por tanto, es recomendable ampliar las investigaciones de la calidad nutricia y nutracéutica de alimentos autóctonos que contribuyan a la conservación de la identidad cultural del país y a la generación de disponibilidad comercial de especies de cultivo rural como el guaje (Román *et al.*, 2014).

El uso culinario de las semillas de guaje consiste en su separación de la vaina y combinación con diversos ingredientes para preparar platillos tradicionales que forman parte de la dieta de los habitantes de San Felipe Otlaltepec.

Diversas partes del árbol de *L. leucocephala* tienen uso medicinal para tratar trastornos tales como el dolor interno, los problemas respiratorios, enfermedades parasitarias y diabetes (Chung *et al.*, 2017).

## **2.2 Toxicidad de las semillas de *Leucaena ssp.***

Las semillas y hojas de *Leucaena* contienen ácido  $\beta$ -[N-(3-hidroxi-4-oxipiridil)]- $\alpha$ -aminopropiónico; L-mimosina o mimosina, aminoácido no proteico tóxico para los mamíferos (Binh and Shinkichi, 2016).

Las manifestaciones clínicas de toxicidad por ingerir *Leucaena* incluyen alopecia, mal estado corporal, infertilidad, bajo peso al nacer, disfunción de la glándula tiroides, formación de cataratas, toxicidad en el hígado, riñón y sistema nervioso central. Estos síntomas se han reportado en una amplia gama de especies, incluidos los humanos, rumiantes domésticos, caballos, roedores y pollos (Crawford *et al.*, 2015). En los animales se puede presentar bocio. Los efectos sobre la reproducción incluyen mortalidad embrionaria precoz y muerte perinatal. La toxicosis puede ser aguda o crónica y conllevar incluso a la muerte (Valle y Lucas, 2000).

Los efectos nocivos de las sustancias pueden ser evaluados en animales, sin embargo, debido a las consideraciones éticas y a la opinión pública actual se ha reducido el número de animales utilizados para probar la toxicidad de productos. Actualmente, la evaluación de la toxicidad de las sustancias se hace en células humanas del sistema inmunológico, con la prueba de células mononucleares de sangre periférica, por sus siglas en inglés (PBMCs). La aplicación de esta alternativa permite reducir el uso de animales en la investigación aproximar los resultados de la toxicidad de las sustancias al humano. Esta prueba según Pourahmad and Salimi (2015), es un componente importante de la evaluación general de la toxicidad de los productos.

### 2.3 Proceso termoalcalino o nixtamalización

La palabra nixtamalización del náhuatl *nixtli*, cenizas, y *tamalli*, masa, se utiliza para describir el proceso de alcalinización de granos y cereales, principalmente maíz para la preparación de la masa y subsecuentemente tortillas. Esta práctica, se ha transmitido de generación en generación en Mesoamérica, y se utiliza desde tiempos prehispánicos. Se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1 % a una porción de maíz. Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua, sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. Se obtiene así el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45 % de humedad (Paredes *et al.*, 2009).

Durante el proceso termoalcalino se desprende el pericarpio del grano haciendo más disponibles los aminoácidos, niacina, triptófano y minerales como el calcio. Adicionalmente, facilita la molienda y mejora la adhesividad y extensibilidad de la masa resultante (Martínez *et al.*, 2001). Durante este proceso el maíz reduce su contenido de fibra dietética, vitaminas y carotenoides (Salazar *et al.*, 2015).

La importancia de la cal (CaO), en la cocción alcalina del maíz ha sido investigada por varios autores (Paredes *et al.*, 2009, López y Saharoupulos (1982), Trejo y González *et al.*, 1982, Robles *et al.*, 1986, Gómez *et al.*, 1992). La cocción alcalina y el remojo del maíz hacen que el agua y el calcio sean absorbidos por los granos. La solución alcalina degrada y solubiliza los componentes de la pared celular, lo que resulta en la eliminación del pericarpio y el ablandamiento de la estructura del endospermo. Una pequeña cantidad de lixiviación de la amilosa ocurre después de que los gránulos de almidón se hinchan, lo que contribuye a la formación de una red de componentes celulares. A valores de pH 11 y superiores, las moléculas de amilosa tienen una carga negativa, lo que permite la interacción con los iones de calcio (Trejo y González *et al.*, 1982).

El proceso termoalcalino provoca que la estructura que une a las células del endospermo, llamada lámina media, y las paredes celulares se degraden y solubilizan parcialmente. La mayoría del germen permanece en el grano durante la nixtamalización, lo que permite que la calidad de la proteína no se vea afectada. Además, la aleurona o membrana semipermeable alrededor del grano permanece sobre éste durante el proceso, lo que minimiza la pérdida de nutrientes hacia el nejayote por lixiviación. En el líquido de cocción se encuentran residuos y otros constituyentes: parte del pericarpio, sólidos del endospermo, grasa del germen y cal (Serna, 1996). La cocción alcalina altera la estructura y la solubilidad de las proteínas del maíz, incrementando la disponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales por lo que dicho proceso es una de las principales contribuciones de la cultura náhuatl a la nutrición humana (Paredes *et al.*, 2009).

## **2.4 Proteínas**

Las proteínas son biomoléculas poliméricas grandes, que consisten en una o más cadenas largas de residuos de aminoácidos. Las funciones de las proteínas dentro de los organismos son: catalizar reacciones metabólicas, replicar el ADN, proporcionar estructura a las células y organismos, y transportar moléculas de un lugar a otro. Las proteínas adquieren ciertas cargas dependiendo del pH en el que se encuentren dispersas y del tipo de aminoácidos que las constituyen. A pH ácido, cualquier proteína presenta una carga neta positiva, debido a que los grupos  $-\text{COOH}$  se encuentran en forma neutra, pero los grupos amino están protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ). Por el contrario, en un medio alcalino, una proteína estaría cargada negativamente, ya que en este caso los grupos carboxilo se encuentran desprotonados ( $-\text{COO}^-$ ) y los grupos amino en su forma neutra ( $-\text{NH}_2$ ). El pH, en el cual la carga neta de una proteína puede ser cero, es conocido como punto isoeléctrico (pI). El punto isoeléctrico, se encuentran en equilibrio las cargas positivas y negativas por lo que una proteína será insoluble y fácilmente separada (Papalampro, Doxastakis and Kiosseoglou, 2009).

La importancia de las proteínas en los alimentos radica en sus propiedades nutricionales. De ellas se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de los consumidores; así mismo, pueden ser ingredientes en otros productos alimenticios y por sus propiedades funcionales, ayudan a establecer las características finales (Badui, 2006). Las proteínas de las leguminosas constituyen una clase importante de las proteínas vegetales, siendo la proteína de soya la representante más conocida de este grupo (Papalampro *et al.*, 2009; Voet y Voet, 2004).

Las proteínas de origen vegetal presentan ciertas ventajas en comparación con las proteínas de origen animal, por ejemplo: tienen bajo costo de producción, se pueden almacenar durante periodos largos y son fáciles de manejar y transportar. En términos de balance de aminoácidos esenciales las proteínas de origen animal poseen generalmente mejor calidad nutricional (Sandoval y Paredes, 2012).

Para cuantificar proteínas se debe elegir un método analítico, de acuerdo al propósito del estudio. Existen muchos métodos para la determinación de proteínas, algunos de los cuales se valen del color que presentan estas moléculas cuando reaccionan con reactivos específicos; cada uno de estos procedimientos tiene su particularidad, y el mejor solo podrá ser determinado dependiendo de las concentraciones de las proteínas en las muestras (García y Vásquez, 1998).

Antes de analizar una muestra que contenga proteínas es necesario extraerla, para lo cual se debe considerar que la solubilidad de la proteína está determinada por las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente, así como al balance hidrofóbico-hidrofílico en la superficie de las biomoléculas (Moure *et al.*, 2006).

El método Kjeldahl sigue siendo la técnica más confiable para la determinación del contenido total de proteínas (nitrógeno orgánico) en los alimentos; se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo para reducir

el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio. El digerido, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado y luego se titula. Sin embargo, este método sobreestima el contenido de proteínas en los alimentos en comparación con el análisis de aminoácidos (Egan *et al.*, 2006 y Hanne, Lars, Guro, Edel and Ida-Johanne, 2018).

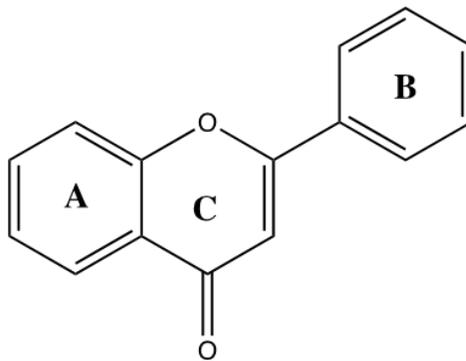
## **2.5 Antioxidantes**

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que por separado o mezclada es capaz de aplazar, retardar o prevenir el periodo de oxidación de las biomoléculas constituyentes de un alimento u organismo provocados por la acción del aire, luz, trazas de iones metálicos. En términos de alimentos los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, sin embargo, lo hacen a costa de inactivarse por lo que su utilización retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de forma definitiva (Coultrate, 2009). Su mecanismo de acción es retardar la iniciación o interrumpir la propagación de la cadena de radicales libres (Marinova y Nedyalka, 2003). Los radicales libres son cualquier especie capaz de existir de manera independiente con uno o más electrones desapareados, debido a esto, son altamente reactivos; tienen un tiempo corto de vida media y pueden comportarse como donador o aceptor de electrones. Los radicales libres pueden estar cargados positiva o negativamente, cationes radicales o aniones radicales, respectivamente, o ser eléctricamente neutros. Los radicales tienen la capacidad de reaccionar con moléculas no radicales para dar origen a un nuevo radical; son producidos por procesos fisiológicos celulares y también por exposición a algún agente ambiental (Ariza, Bijur y Williams, 1999).

### **2.5.1 Polifenoles**

Los polifenoles son un conjunto de compuestos orgánicos que presentan como estructura base al menos un anillo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo ligados a él. Este grupo de compuestos fitoquímicos se dividen dependiendo del número de anillo fenólicos que contienen y con base en los diferentes elementos

estructurales que ligan estos anillos a otros (Lewandowska, Kalinowska, Lewandowski, Stepkowski y Borzóska, 2016). La ingesta diaria promedio de polifenoles en la dieta humana es de aproximadamente 1 g por persona. Se ha reportado que las principales fuentes de estos compuestos son las frutas, aunque también están presentes en verduras y leguminosas (Scalbert y Williamson, 2000). Los flavonoides son el grupo más común y extenso presente en la dieta de fuente vegetal humana, son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que comparten una estructura en común, el difenilpirano ( $C_6-C_3-C_6$ ), formado de dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano (2) (Manach *et al.*, 2004; Valant-Vetschera y Wollenweber, 2006).



(2)

Los flavonoides constituyen la fuente más importante de polifenoles de las plantas (Robinson, 1991). La distribución cuantitativa varía entre los diferentes órganos y entre las diferentes especies. Esta variabilidad está condicionada por la genética y por otros factores, entre los que se incluyen la climatología, estado de madurez, la posición en el árbol, el origen y las prácticas agrícolas (Robards y Antolovich 1997).

Los fenoles no comparten una estructura base que relacione a todos sus elementos, esta dictaminada por el número de anillos fenólicos que contiene y con base en los diferentes elementos estructurales que ligan estos anillos a otros (Rabassa, Trespalacios, Llorach, Tulipani, Zamora, García y Andrés, 2012).

## 2.6 Lípidos

Los lípidos son un grupo de compuestos heterogéneo, que incluye grasas, aceites, esteroides, ceras y compuestos relacionados más por sus propiedades físicas que por sus propiedades químicas. Tienen la propiedad común de ser: 1) relativamente insolubles en agua y 2) solubles en solventes no polares, como éter y cloroformo. Son importantes constituyentes de la dieta no sólo debido a su alto valor energético, sino también debido a las vitaminas liposolubles y los ácidos grasos esenciales contenidos en la grasa de alimentos naturales (Botham y Kennelly, 2010). Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen vienen determinadas en gran parte por la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. La cadena hidrocarbonada apolar explica la poca solubilidad de los ácidos grasos en agua. El grupo ácido carboxílico es polar (ionizado a pH neutro) y justifica la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta (Nelson y Cox, 2009).

Los lípidos se clasifican como simples, complejos y precursores, los primeros son ésteres de ácidos grasos con diversos alcoholes:

- a) Grasas: ésteres de ácidos grasos con glicerol. Los aceites son grasas en el estado líquido.
- b) Ceras: ésteres de ácidos grasos con alcoholes monohídricos de masa molecular relativa (peso molecular) más alta.

Los lípidos complejos son ésteres de ácidos grasos que contienen grupos funcionales como el alcohol y un ácido graso:

- a) Fosfolípidos: lípidos que contienen, además de ácidos grasos y un alcohol, un residuo ácido fosfórico. A menudo poseen bases que contienen nitrógeno y otros sustituyentes; por ejemplo, en los glicerofosfolípidos el alcohol es glicerol.
- b) Glucolípidos: lípidos que contienen un ácido graso, esfingosina y carbohidrato.

- c) Otros lípidos complejos: lípidos como sulfolípidos y aminolípidos. Las lipoproteínas también pueden colocarse en esta categoría.

Los lípidos precursores y derivados comprenden ácidos grasos, glicerol, esteroides, otros alcoholes, aldehídos grasos, cuerpos cetónicos, hidrocarburos, vitaminas liposolubles y hormonas (Botham y Kennelly, 2010).

Los lípidos más sencillos obtenidos a partir de los ácidos grasos son los triacilgliceroles, también denominados triglicéridos, grasas o grasas neutras., Están compuestos de tres ácidos grasos en enlace éster con un solo glicerol, son moléculas apolares, hidrofóbicas, prácticamente insolubles en agua. Los triacilgliceroles se almacenan también en semillas de muchos tipos de plantas, proporcionando energía y precursores sintéticos cuando las semillas germinan. Los aceites vegetales como el aceite de maíz y el de oliva están compuestos mayoritariamente de triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados, por lo que son líquidos a temperatura ambiente (Nelson y Cox, 2009).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos ( $C_4$  a  $C_{36}$ ). En algunos ácidos grasos esta cadena está completamente saturada (no tiene dobles enlaces) y sin ramificar; otros contienen uno o varios dobles enlaces. Unos cuantos contienen anillos de tres carbonos o grupos hidroxilo (Nelson y Cox, 2009). Los ácidos grasos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids, PUFAs por sus siglas en inglés) contienen cadenas de 18, 20 y 22 carbonos con dobles enlaces en configuración *cis*, separados por un grupo metileno (Egan, Kirk y Sawyer, 2006). El ácido linoleico ( $C_{18}:2$ ,  $\omega_6$ ) y el ácido  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18}:3$ ,  $\omega_3$ ) son ácidos grasos poli-insaturados necesarios para el desarrollo normal y funcionamiento de los tejidos animales y seres humanos, por lo cual se conocen como ácidos grasos esenciales. Otros ácidos grasos esenciales de cadena más larga son el ácido araquidónico ( $C_{20}:4$ ,  $\omega_6$ ) y ácido docosahexanoico ( $C_{22}:6$ ,  $\omega_3$ ). Khan y Scheinmann (1978) estudiaron los métodos instrumentales modernos para su análisis y caracterización.

## 2.7 Diseño San Cristóbal

El diseño estadístico San Cristóbal fue desarrollado por Rojas (1979) y ha sido extensamente empleado para el estudio de respuestas de algunos cultivos tal como la experimentación de fertilizantes en caña de azúcar de México y de otros países.

Este diseño comprende el ensayo de  $p$  factores, cada uno en cuatro niveles igualmente espaciados. Se denotan los niveles de los factores por los símbolos 0, 1, 2 y 3. Así, las combinaciones de tratamientos que comprende el diseño San Cristóbal son:

- 1) Las combinaciones de tratamientos de un arreglo factorial  $2^p$ , con niveles de los factores 0 y 2.
- 2) El punto central  $(1, 1, \dots, 1)$
- 3) Los  $p$  puntos axiales  $(3, 1, \dots, 1), (1, 3, \dots, 1), \dots, (1, 1, \dots, 3)$ .

En este caso se ensayaron 12 combinaciones de tratamientos, lo que puede considerarse un número muy adecuado, desde el punto de vista práctico (Martínez, 1998).

El Cuadro 1 muestra el caso particular en que  $p = 3$ , se tienen las combinaciones de tratamientos.

Cuadro 1. Combinaciones de tratamientos

Tratamientos		Tratamientos		Tratamientos	
1.	<b>(0,0,0)</b>	5.	<b>(0,0,2)</b>	9.	<b>(1,1,1)</b>
2.	<b>(2,0,0)</b>	6.	<b>(2,0,2)</b>	10.	<b>(3,1,1)</b>
3.	<b>(0,2,0)</b>	7.	<b>(0,2,2)</b>	11.	<b>(1,3,1)</b>
4.	<b>(2,2,0)</b>	8.	<b>(2,2,2)</b>	12.	<b>(1,1,3)</b>

## 2.8 Literatura citada

- Abou, E. F. M. F., Sarmiento, F. L., Santos, R. R. y Solorio, S. F. (2011). Efectos nutricionales de la inclusión dietética de harina de hojas de *Leucaena leucocephala* y *Moringa oleifera* en el comportamiento de gallinas Rhode Island Red. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45:(2). 163-170.
- Ariza, M., Bijur, G.N., Williams, M. (1999). *Environmental Metal Pollutants Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity*. Ed. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 149 p.
- Astiasaran, A. y Martínez, A. (2000). *Alimentos: Composición y propiedades*. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, pág. 155
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos. Hidratos de carbono*. Editorial Pearson. Cuarta edición. México.
- Binh., C. Q. N., and Shinkichi., T. (2016). The Chemistry and Biological Activities of Mimosine: A Review. *Phytotherapy Research*, (30), 1230-1242. doi: 10.1002/ptr.5636
- Botham, K. M., Kennelly, P. J. (2010). Lípidos de importancia fisiológica. In: Romero H. G. (Ed.), *Harper. Bioquímica ilustrada* (pp. 121-130). México: McGRAW-HILL.
- Chowtivanakul, P., Srichaikul, B. and Talubmook, Ch. (2016). Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Agriculture and Natural Resources*, 50:(2016). 357-361.
- Chung, H. H., Chen, M. K., Chang, Y. Ch., Yang, S. F., Lin, Ch. Ch., Lin, Ch. W. (2017). Inhibitory effects of *Leucaena leucocephala* on the metástasis and invasion of human oral cancer cells. *Environmental Toxicology*, 2017(32), 1765-1774. doi: 10.1002/tox.22399
- Coultate, T. (2009). *Food chemistry*; Ed. The Royal Society of Chemistry, UK. 2009 p.
- Crawford, G., Puschner, B., Affolter, V., Stalis, I., Davidson, A., Baker, T., Tahara, J., Jolly, A. and Ostapak, S. (2015). Systemic Effects of *Leucaena leucocephala* Ingestion on Ringtailed Lemurs (*Lemur catta*) at Berenty Reserve, Madagascar. *American Journal of Primatology*, (77), 633-641.
- Dijkman, M.J. 1980. *Leucaena* a promising soil erosion control plant. *Economic Botany*, (4), 337-349.
- Egan, H., Kirk, R. S., y Sawyer, R. (2006). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. Ed. CECSA. 777 p.
- García, H. y Vázquez, R. (1998). Cuantificación de proteínas: Una revisión. *BioTecnología*, (3), 77-88.
- Gómez, H. M., Lee, J. K., McDonough, V. M., Waniska, R. D., Rooney, L. W. (1992). Corn starch changes during tortilla and tortilla chip processing. *Cereal Chem*, (69), 275-279.

- Hanne, K. M., Lars, D., Guro, K. E., Edel, O. E., and Ida-Johanne, J. (2018). Protein Determination-Method Matters. *Journal Foods*, (7), 2-11. doi: 10.3390/foods7010005.
- Imededdine, A. N., Hassen, S., Chin, P. T., Saud, I. A. (2014). *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit seed oil: Characterization and uses. *Industrial Crops and Products*, (52), 582-587.
- Koenen, E. J. M., De Vos, J. M., Atchison, G. W., Simon, M. F., Schrire, B. D., De Souza, E. R., De Queiroz, L. P. y Hughes, C. E. (2013). Exploring the tempo of species diversification in legumes. *South African Journal of Botany*, (89), 19-30. doi: 10.1016/j.sajb.2013.07.005.
- Lewandowska, H., Kalinowska. M., Lewandowski. W., Stepkowski. T. y Borzóska. K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (32), 1-19.
- Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., Rico. L. y Clark. R. (2013). A linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context a tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, (89), 76-84. doi: 10.1016/j.sajb.2013.06.005.
- Llamas, F. y Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminales o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *AmbioCiencias Revista de Divulgación Científica*, (14), 15-18.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez. L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Marinova, E.M y Nedyalka, V.Y. (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Journal Food Chemistry*, (81), 189-197.
- Martínez, B. F., Martínez, F. H.E., Sanmartin, M. E., Sanchez, S. F., Chang, Y.K., Barrera, A. D. y Rios, E. (2001). Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (81), 1455-1462.
- Martínez, G. A. (1998). Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Ed. Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 756 p.
- Martínez, G. A. S. (2014). Análisis de semilla de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit de dos procedencias del Estado de México. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Forestales, UACH, Texcoco. Edo. Méx.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945-963.
- Nadal, M. S., Moreno, Y. M. T., Cubero, S. J. I. (2004). Las leguminosas de grano en la agricultura moderna. Ed. Mundi-Prensa. México.

- National Academy of Sciences. (1984). *Leucaena: promising forage and tree crop for the Tropics*. 2nd edition. National Academy of Sciences. Washington, USA. 100 p.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2009) *Lehninger Principios de Bioquímica* (5a ed.). España: Editorial Omega.
- Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., Kiosseoglou, V. (2010). Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2010), 304–313.
- Paredes, L. O., Guevara, L. F. y Bello, P. L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencia. Universidad Nacional Autónoma de México*, 92-93, 60-70.
- Peralta, J. I., Gómez, C. A., Romero, C. P.A., y Reyes, D. A. (2017). Uso Antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. DC.) Benth, en dos comunidades de la Mixteca baja Oaxaqueña, México. *Revista POLIBOTÁNICA*, (43), 1-16.
- Pound, B. y Martínez, C. L. (1985). *Leucaena: su cultivo y utilización*. Overseas Development Administration. Londres, Inglaterra.
- Pourahmad, J. and Salimi, A. (2015). Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), 679-980.
- Rabassa, M., Trespalacios, M., Urpi, M., Llorach, R., Tulipani, S., Zamora. R., García. M. y Andrés. C. (2012). Polifenoles como antioxidantes. En *Antioxidantes: En alimentos y salud*. México. D.F. Clave Editorial, (pp 293-328).
- Reyes, O. E. S. (2014). Estudio etnobotánico, bromatológico en brotes, botones florales y semillas de guaje verde (*Leucaena leucocephala*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, CDMX.
- Robards, K., Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, (122), 11-34.
- Robinson, D. (1991). *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. 560 p.
- Robles, R. R., Murray, E. D., Paredes, L. O. (1988). Physicochemical changes of maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *Int. J. Food Science and Technology*, 23, 91-98.
- Rodríguez, I. (2007). Importancia de la harina de hojas de *Leucaena leucocephala* (*hhl*) y *Lemna ssp*, en la calidad de huevos de consumo. *Agricultura Andina*, (13), 78-85.
- Rojas, B. A. (1979). Análisis estadístico del diseño San Cristóbal con tres factores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. D. F. México. 17 p.

- Román, C. N., García, M. Ma. R., Castillo, G. A. Ma., Sahagún, C. J., Jiménez, A. A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp): Un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), 157-170.
- Salem, A. Z. M., Olivares, M., López. S., González, R., Rojo, R., Camacho, L. M., Cerrillo, S. M. A., Mejía, H. P. (2011). Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 170(2011), 27-34 p.
- Sánchez, H.J.C. (2014). Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos naturales de partes comestibles de guaje rojo (*Leucaena esculenta subsp. esculenta*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, CDMX.
- Sandoval, O. M. R. y Paredes, L. O. (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 193-201.
- Scalbert, A y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073-2085 p.
- Serna, S. S. R. O. (1996). Química, almacenamiento e industrialización de cereales. Ed. A.G.T. Editor, S. A. México D.F. 521p.
- Sprent, J. I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4), 401-407.
- Syamsudin, S. R., Simanjuntak, P. (2010). Antidiabetic activity of active fractions of *Leucaena leucocephala* (Imk) de Wit seeds in an experimental model. *Eur. J. Sci. Res*, (43), 384-391.
- Trejo, G. A., Rria, M. A. and Wild, A. C. (1982). The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla production. 245-263 p.
- Valant-Vetschera, K.M y Wollenweber, E. (2006). Flavonoids. En O. M. Andersen, and K. R. Markham. *Chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, FL. CRC Press. 617-748 p.
- Valle, P. y Lucas, B. (2000). *Toxicología de alimentos*. México. ISBN 92753004 4. Recuperado en 03 de marzo de 2019. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>
- Villanueva, A. J. F., Herrera, C. F., Plascencia, J. R. (2010). Leguminosas forrajeras: Un recurso sustentable para el trópico mexicano. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Folleto Técnico. 14. ISBN: 978-607-425-449-5. Recuperado en 15 de enero de 2019. Disponible en: [http://nutriciondebovinos.com.ar/MD\\_upload/nutriciondebovinos\\_com\\_ar/Archivos/LEGUMINOSAS FORRAJERAS UN RECURSO SUSTENTABLE MEXICO WWW.pdf](http://nutriciondebovinos.com.ar/MD_upload/nutriciondebovinos_com_ar/Archivos/LEGUMINOSAS FORRAJERAS UN RECURSO SUSTENTABLE MEXICO WWW.pdf)

Voet, D., Voet, J. G. (2004). Bioquímica 3ª edición. Ed. Médica Panamericana.

Zarate, P. S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. Anales Instituto de Biología UNAM, México, Ser. Bot, 65(2), 83-162.

### III. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, NUTRICIONAL Y NUTRACÉUTICA DE LAS SEMILLAS DE GUAJE

#### RESUMEN

La calidad harinera de las semillas secas depende de parámetros físicos: peso hectolítrico y el peso de mil granos, además de sus propiedades nutricionales, nutraceuticas y tóxicas. El objetivo de esta investigación fue caracterizar las semillas secas de *Leucaena esculenta*, para su uso potencial como materia prima en la obtención de una harina. El peso hectolítrico se determinó de acuerdo con las normas aplicadas para determinar la calidad de una harina, las propiedades nutricionales fueron evaluadas de acuerdo a los métodos de la AOAC, las propiedades antioxidantes se determinaron cuantificando los fenoles y flavonoides totales y evaluando la capacidad antioxidante por los ensayos DPPH y ABTS, además se cuantificó el contenido de mimosina, aminoácido no proteico con propiedades tóxicas. De acuerdo con los resultados, las semillas secas tienen un peso hectolítrico de 78.09 kg hL<sup>-1</sup>, peso de mil semillas 86.34 g, humedad 8.26 ± 0.12 %, proteína 33.27 ± 0.09 %, cenizas 5.23 ± 0.12 %, calcio 0.357 %, fibra cruda 26.61 ± 0.89 %, extracto etéreo 3.70 ± 0.15 %, fenoles 5.86 ± 0.74 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoides 0.46 ± 0.03 mg EC g<sup>-1</sup>, capacidad antioxidante por los ensayos DPPH y ABTS 0.66 ± 0.14 y 28.34 ± 2.20 mg ET g<sup>-1</sup>, respectivamente y la mimosina 0.172 %. Las características físicas indican que las semillas secas de guaje se encuentran dentro de los criterios de la calidad molinera; las químicas muestran que por ser una leguminosa presenta cantidades importantes de proteína, calcio, fibra cruda y ácidos grasos. Los porcentajes de los antioxidantes y mimosina son similares a otras especies de *Leucaena spp.*

**Palabras clave:** calidad harinera, propiedades nutricias, comercialización, antioxidantes.

---

Tesis de Maestría en Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Guadalupe García Maceda

Director de Tesis: Diana Guerra Ramírez, Dra.

## PHYSICOCHEMICAL, NUTRITIONAL AND NUTRACEUTICAL CHARACTERIZATION OF GUAJE SEEDS

### ABSTRACT

The flour quality of dry seeds depends on physical parameters: hectolitic weight and the weight of a thousand grains, in addition to their nutritional, nutraceutical and toxic properties. The objective of this research was to characterize the dry seeds of *Leucaena esculenta*, for potential use as raw material in obtaining a flour. The hectolitic weight was determined according to the norms applied to determine the quality of a flour, the nutritional properties were evaluated according to the AOAC methods, the antioxidant properties were determined quantifying the total phenols and flavonoids and evaluating the antioxidant capacity by the DPPH and ABTS assays, in addition the content of mimosine was quantified, non-protein amino acid with toxic properties. According to the results of the dry seeds have a hectolitic weight of 78.09 kghL<sup>-1</sup>, weight of a thousand seeds 86.34 g, humidity 8.26 ± 0.12 %, protein 33.27 ± 0.09 %, ashes 5.23 ± 0.12 %, calcium 0.357 %, crude fiber 26.61±0.89 %, ethereal extract 3.70±0.15 %, phenols 5.86 ± 0.74 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoids 0.46 ± 0.03 mg EC g<sup>-1</sup>, antioxidant capacity by DPPH and ABTS assays 0.66 ± 0.14 and 28.34 ± 2.20 mg ET g<sup>-1</sup>, respectively and mimosine 0.172 %. The physical characteristics indicate that the dry seeds of guaje are within the criteria of the milling quality; the chemical ones show that for being a leguminous it presents important quantities of protein, calcium, crude fiber and fatty acids. The percentages of antioxidants and mimosine are similar to other species of *Leucaena spp.*

**Keywords:** Flour quality, nutritional properties, marketing, antioxidants.

### 3.1 Introducción

La creciente demanda de alimentos ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas alimenticias, entre las que destacan el uso de especies vegetales silvestres que crecen en diferentes localidades de México. En particular el género *Leucaena spp.* es una leguminosa que tiene diferentes usos. La *Leucaena esculenta* es una especie de consumo subvalorado de alto valor nutricional y funcional (Román *et al.*, 2014). En América Central, México, Indonesia y Tailandia diversas especies de *Leucaena* se utilizan en la alimentación animal y humana (Negi vs Bortjakur, 2016), es una especie estrictamente tropical que requiere temperaturas cálidas para su óptimo crecimiento y tiende a soportar siete meses de sequía, lo que permite que sea considerada como una especie que no necesita de mayores labores agronómicas ni de agua en abundancia. Además *L. esculenta* se utiliza para diversos fines: es una alternativa para la reforestación, se utiliza como forraje, leña, sombra para plantaciones permanentes, y para la producción de madera, también se considera una especie valiosa en la medicina tradicional y en las industrias cosmética y farmacéutica (Imededdine *et al.*, 2014). Desde un punto de vista industrial, el género *Leucaena* es importante en la producción de pulpa para la fabricación de papel (Pandey y Kumar, 2013). La especie *Leucaena leucocephala* es la más ampliamente estudiada, particularmente por sus propiedades farmacológicas relacionadas con la prevención y tratamiento del cáncer oral, por tal motivo se ha recomendado su estudio contra otros tipos de cáncer (Chung *et al.*, 2017). Por otro lado, los extractos de hojas y semillas de *L. leucocephala* en estado fisiológico inmaduro tienen actividades antioxidantes y antidiabéticas (Chowtivannakul y Talubmook, 2012). Con respecto de las semillas secas de *Leucaena* no se encontró ninguna investigación de sus usos y beneficios, lo que favorecería el estudio integral de esta especie, para beneficiar principalmente a las comunidades rurales del país. En la comunidad de San Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodríguez, Puebla, durante los meses de septiembre y enero de cada año, las vainas frescas de *Leucaena*, son cosechadas para el consumo de las semillas, sin embargo, al final de la

cosecha muchas vainas tienden a secarse y son poco utilizadas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar los parámetros fisicoquímicos, nutricionales y nutraceuticos que permitan determinar la viabilidad de utilizar las semillas secas de *Leucaena esculenta* en la obtención de una harina útil para preparar alimentos con alto valor nutritivo.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Material vegetal**

Para identificar la especie estudiada, se herborizaron tres ejemplares de *Leucaena spp.*, colectadas en la comunidad de San Felipe Otlaltepec, municipio Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. La identificación botánica, se llevó a cabo por la M.C. Ernestina Cedillo Portugal, del área de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los ejemplares herborizados fueron depositados en el herbario hortorio JES con número de registro 26061, haciendo uso de claves dicotómicas (Zarate, 1994), se determinó que la planta corresponde a *Leucaena esculenta* (DC) Benth (Figura 1). Por otro lado, las vainas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, fueron cosechada durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2018 en la comunidad de San Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodríguez Puebla. De acuerdo con García, Bustamante, Vargas, Guerrero y Olvera (2004) el clima predominante de esa comunidad es del tipo (A)C(wo), semicálido, con temperatura media anual de 18 °C. Altitud 1500 a los 2100 msnm. Coordenadas: 18° 24' 02.85" latitud Norte, 97° 45' 28.70" longitud Oeste.



Figura 1. *Leucaena esculenta* (DC) Benth.

### 3.2.2 Reactivos e instrumentación

Los reactivos de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio anhidro, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), acetato de sodio trihidratado, 2,4,6-tripiridil-s triazina (TPTZ, cloruro de hierro (III) hexahidratado, catequina,  $\beta$ -caroteno, persulfato de potasio y los ácidos 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido gálico, 2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico (ABTS) y L-Mimosine from Koa hoale seeds S)- $\alpha$ -Amino- $\beta$ -[1-(3-hidroxi-4-oxopiridina)] ácido propiónico, fueron adquiridos de Sigma Aldrich. La medición de absorbancias para cuantificar los fenoles y flavonoides totales, mimosina y para evaluar la capacidad antioxidante, se hizo en un lector de microplacas Synergy 2 Microplate reader, Biotek International, software Gen5, Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, USA.

### 3.2.3 Caracterización fisicoquímica de las semillas secas de guaje

El peso hectolítrico se determinó utilizando una balanza para peso hectolítrico marca Seedburo Equipment Co, la cual tiene un cono que deja caer las semillas en un vaso de 285 mL hasta sobrellenarlo, después, el exceso de semillas se eliminó con una regla con movimiento en zigzag y se registró el peso. Por otro lado, se contaron y pesaron 1000 semillas enteras de *L. esculena* (DC) Benth, los resultados de esta determinación se expresaron como gramos por cada mil semillas. Ambos análisis se hicieron por triplicado (Método 55-10, AACCC, 2005).

La dureza se determinó según Hernández *et al.* (2016), se pesó 30 g de muestra y se procesó en un molino de grano de café marca Mr. Coffee® durante 2 s. La muestra molida se cribó en mallas número 14, 18, 20, 24, 30 y charola, durante 3 min, utilizando el mismo cernidor marca Montinox®. Finalmente, se obtuvo el porcentaje de retención de cada tamiz. Para determinar la dureza del grano, se comparó con una escala hedónica.

El color se determinó con un colorímetro Hunter Lab (Mini Scan XE Plus 45/ 0-L, USA) en escala Cielab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Con los valores de  $a^*$  y  $b^*$  se calcularon los parámetros de ángulo de tono (*Hue*;  $h^*$ ) y saturación del color (*Croma*;  $C^*$ ) con base en las Ecuaciones (1) y (2), en tanto que el valor de  $L^*$  se tomó como luminosidad (McGuire, 1992).

$$h^* = \text{Tan}^{-1}(b^* / a^*) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

### 3.2.4 Análisis proximal

El análisis proximal se basó en el sistema Wendee ideado por Henneberg and Stohmann (1867). Los parámetros que se determinaron fueron porcentaje de humedad total, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda. Cada una de las determinaciones se hizo por triplicado.

La determinación de humedad se llevó a cabo de acuerdo al método 44-15 de la AACC (1995). Una muestra de semillas molidas de *L. esculenta* (DC) Benth (1 g) fue sometida a secado a 100°C, hasta peso constante. El porcentaje de humedad se calculó por la diferencia de pesos.

El porcentaje de ceniza fue determinado con base en el método oficial 56-60 de la AACC (1995). El porcentaje de cenizas se calculó por diferencias de pesos entre el crisol a peso constante y del crisol con las cenizas, el resultado se dividió entre el peso de la muestra y se multiplico por 100.

El contenido de proteína cruda se determinó por el método macro Kjeldahl (AOAC, 1990). Se pesó 0.25 g de muestra y se colocó en el tubo de digestión Kjeldahl, se agregaron 14 mL de ácido sulfúrico y la pastilla catalizadora Kjeltabs™, se procedió a la digestión (400 °C, 3 h) en el equipo FOOS Tecator Digestor. La muestra se destiló (en el equipo Kjeltec 8100 Destillation Unit) usando hidróxido de sodio al 40 % y ácido bórico al 4 %. La titulación de la muestra se llevó a cabo con HCl 10 N y el porcentaje de proteína se determinó de acuerdo con la Ecuación (3):

$$\% \text{ Proteína} = \frac{1.401 \times N \text{ de H}_2\text{SO}_4 \times 6.25 \times (\text{gasto de HCl})}{\text{peso de la muestra (mg)}} \quad (3)$$

El factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda recomendado por la FAO/OMS (1973) es 6.25 para cualquier material de origen vegetal (Egan *et al.*, 2006).

El contenido de extracto etéreo fue determinado con base en el método de Goldsfigh (AOAC, 2000).

El porcentaje de fibra cruda fue evaluado basándose en el método de Weende y consiste en cuantificar la pérdida por ignición, a partir del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25 % e hidróxido de sodio al 1.25 % de una muestra previamente desengrasada (Egan *et al.*, 2006).

### **3.2.5 Determinación de calcio**

Se pesaron 0.5 g de muestra y se digirieron con 8 mL HNO<sub>3</sub> al 100 % y 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el horno de microondas (Modelo Multiwavepro) a 220 °C por 1.10 h, las muestras se aforaron a 50 mL con agua destilada. La concentración del calcio se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica (GBC, modelo SAVANTA) tomando en cuenta una curva de calibración.

### **3.2.6 Propiedades antioxidantes**

Los extractos para determinar las propiedades antioxidantes en las semillas secas de *Leucaena esculenta*, se obtuvieron como se menciona a continuación: una muestra de semillas molidas (1 g) se mezcló con metanol al 80 % en una relación 1:10 (p/v). La mezcla se agitó en vortex por 1 minuto, y el pH se ajustó a 3 con HCl al 10 %. Los extractos se obtuvieron por agitación en vortex (3 minutos), sonicación (15 min) y agitación en incubadora (30 min, 37 °C). Posteriormente la mezcla se centrifugó (4000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se aforó a 10 mL con metanol al 80 %.

### **Determinación de fenoles totales**

Los fenoles totales se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) adaptado a microplacas. En cada pozo de una microplaca se mezclaron 25 µL del extracto, 20 µL del reactivo Folin Ciocalteu, 30 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20 % y 125 µL de agua destilada, la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min bajo condiciones de oscuridad. Transcurrido el tiempo, se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. Una curva de calibración de ácido gálico se preparó en un rango de concentraciones de 1.25 a 11.25 µg mL<sup>-1</sup>. La ecuación obtenida mediante la curva tipo se utilizó para determinar el contenido de fenoles totales en la muestra. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g<sup>-1</sup>).

## **Determinación de flavonoides**

Los flavonoides totales se determinaron de acuerdo con el procedimiento de Kubola & Siriamornpun (2011) adaptado a microplacas. El extracto de cada muestra (0.5 mL) se mezcló con agua destilada (4.3 mL) y  $\text{NaNO}_2$  al 5 % (0.15 mL). Después de 5 min se agregaron 0.3 mL de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 10 %. La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH al 5 %. Después, la mezcla de reacción fue agitada en vortex (3,000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm. Una curva de calibración de la catequina se preparó en un rango de concentraciones de 0.65 a 32.60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La ecuación obtenida por la curva tipo se utilizó para determinar la concentración de flavonoides totales en la muestra. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg EC g}^{-1}$ ).

## **Ensayo DPPH**

El ensayo DPPH se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Cheng *et al.* (2006), haciendo algunas modificaciones. Se preparó una disolución 1 mM DPPH en metanol al 80 %. Para la curva de calibración se utilizó una disolución stock de trolox 4.5 mM, a partir de la cual se obtuvieron disoluciones en un rango de concentraciones de 3.99 a 39.95  $\mu\text{M}$ , usando como disolvente metanol al 80 %. La muestra se diluyó para obtener diferentes concentraciones en el intervalo de 1.21 a 12.05  $\text{mg mL}^{-1}$ , usando metanol al 80 %. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de trolox y por otra parte las diferentes concentraciones del extracto de las semillas secas de guaje, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la disolución DPPH. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. Como control se utilizó una mezcla de la disolución de DPPH (50  $\mu\text{L}$ ) en metanol al 80 % (200  $\mu\text{L}$ ). Para calcular el porcentaje de DPPH degradado se aplicó la siguiente Ecuación (4). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg ET g}^{-1}$ ).

$$\% \text{ DPPH}_{\text{degradado}} = \left( 1 - \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100 \quad (4)$$

Donde  $A_m$ ,  $A_b$  y  $A_c$ , representan las absorbancias de la muestra, del blanco y del control, respectivamente. El porcentaje de reducción del DPPH fue graficado contra las concentraciones de las muestras y la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), concentración necesaria para degradar el 50 % de DPPH. Se calculó la ecuación de regresión obtenida de la curva de calibración de Trolox en función al DPPH degradado.

### **Ensayo ABTS**

El ensayo de ABTS se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por (Re *et al.*, 1999) adaptado a microplacas. Se prepararon las disoluciones de ABTS 7.4 mM y una disolución de persulfato de sodio 2.6 mM de las cuales se mezclaron volúmenes iguales (10 mL cada una) y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 16 horas en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se tomaron 600  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se aforó a 10 mL con metanol puro. En la microplaca de 96 pozos se colocaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto de guaje. Se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de la disolución ABTS. Como blanco se utilizó la disolución ABTS (200  $\mu\text{L}$ ). La disminución de la absorbancia fue registrada a 734 nm por espacio de 10 minutos. La curva de calibración de trolox se preparó en un rango de concentraciones de 4.99 a 59.93  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg ET g}^{-1}$ ).

#### **3.2.7 Determinación de mimosina**

Para determinar el contenido de mimosina se siguió el método de Zul, Hanisjasyamah, Nurul, Norfadhilah y Normaniza (2015). Las semillas secas y molidas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth (1 g) se mezclaron HCl 0.1N (10 mL). La mezcla se sometió a reflujo durante 1 h, después de enfriar, la mezcla se centrifugó a (4000 rpm, 30 min) y el sobrenadante se aforó a 10 mL 0.1N de HCl. La disolución stock de mimosina para preparar la curva de calibración fue preparada de la siguiente manera: la L-Mimosine (0.025 g), se mezcló 25 mL 4

mL de  $\text{FeCl}_3$  al 0.5 %, en HCl 0.1N y se aforó a 50 mL con HCl 0.1N. La mimosina se cuantificó por un método colorimétrico por microplacas, se tomaron diferentes alícuotas del estándar de mimosina para hacer la curva de calibración a partir de 0 (blanco)-100-200-300-400-500  $\mu\text{L}$ , se agregaron 1000  $\mu\text{L}$  0.1 N de HCl, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  0.1 N de HCl y se aforó con agua destilada en un matraz de 10 mL, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  para colocarlos en la microplaca. Se realizó la lectura a 535 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en porcentaje de masa, masa base seca. Cada determinación se hizo por triplicado.

### 3.3 Resultados y discusión

Para determinar la calidad molinera de las semillas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth, se consideran como referencia los parámetros usados para clasificar la calidad física de los granos de trigo, los cuales se han estudiado ampliamente. La pureza genética, sanidad y calidad física del grano son importantes para la comercialización del trigo harinero (Salazar, 2000). La Norma Oficial Mexicana NMX-FF-036-1996. Clasifica los grados de calidad del trigo basándose en las características físicas del grano (México 1, 2 y 3) y en la calidad del gluten (proteínas). Considerando el grado de calidad México 1, presenta los siguientes parámetros: peso hectolítrico 76 kg  $\text{hL}^{-1}$  y humedad 13 %.

El peso hectolítrico tiene relación con los granos sanos, pero en algunas ocasiones la calidad física del grano es afectada por la presencia de granos inmaduros, dañados por enfermedades que originan bajo peso hectolítrico, por lo que se tienen problemas de comercialización (Salazar, 2000).

El peso hectolítrico y el peso de 1000 semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth evaluados en esta investigación presenta valores similares a los reportados para las semillas de la *Phaseolus vulgaris* que son de 76 kg  $\text{hL}^{-1}$  y 88.4 g del peso de 1000 semillas (Pérez, Esquivel, Rosales y Acosta, 2002). La variación del peso hectolítrico se debe a que son cosechados en condiciones de riego y no de temporal, como sucede con el trigo, que tiene un peso hectolítrico de 82 kg  $\text{hL}^{-1}$  para el caso de la cosecha en riego (De la O *et al.*, 2012).

De acuerdo con De la O, Espitia, López, Villaseñor, Peña y Herrera (2012), el peso hectolítrico es una de las características más importantes del comercio mundial de trigo por su relación significativa con el rendimiento harinero.

### **Dureza y color de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth**

Las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth presentaron mayor porcentaje de semillas retenidas en la malla 14 (91.15 %), consultando la escala hedónica que aplicaron en quinoa, (Hernández *et al.*, 2016) estas semillas se clasificaron como extremadamente duras.

Con respecto al color de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth la Figura 2 muestra que la Luminosidad fue de  $L = 71.58 \pm 0.311$  es decir, es relativamente brillante. Acorde con su valor Hue ( $444.27 \pm 0.32$ ) se aprecia un tono amarillo, este parámetro corresponde al tono de color y a través del cual se puede distinguir entre rojo ( $0$  y  $360^\circ$ ), amarillo ( $90^\circ$ ), verde ( $180^\circ$ ) y azul ( $270^\circ$ ), es de las variables de color que mayor asociación tiene con la apreciación visual. Para el caso del Cromo ( $24.38 \pm 0.10$ ), que es un parámetro que mide el nivel de saturación de un color, en donde valores elevados son colores puros y valores bajos con colores mate o de menor pureza (Jha, 2010).

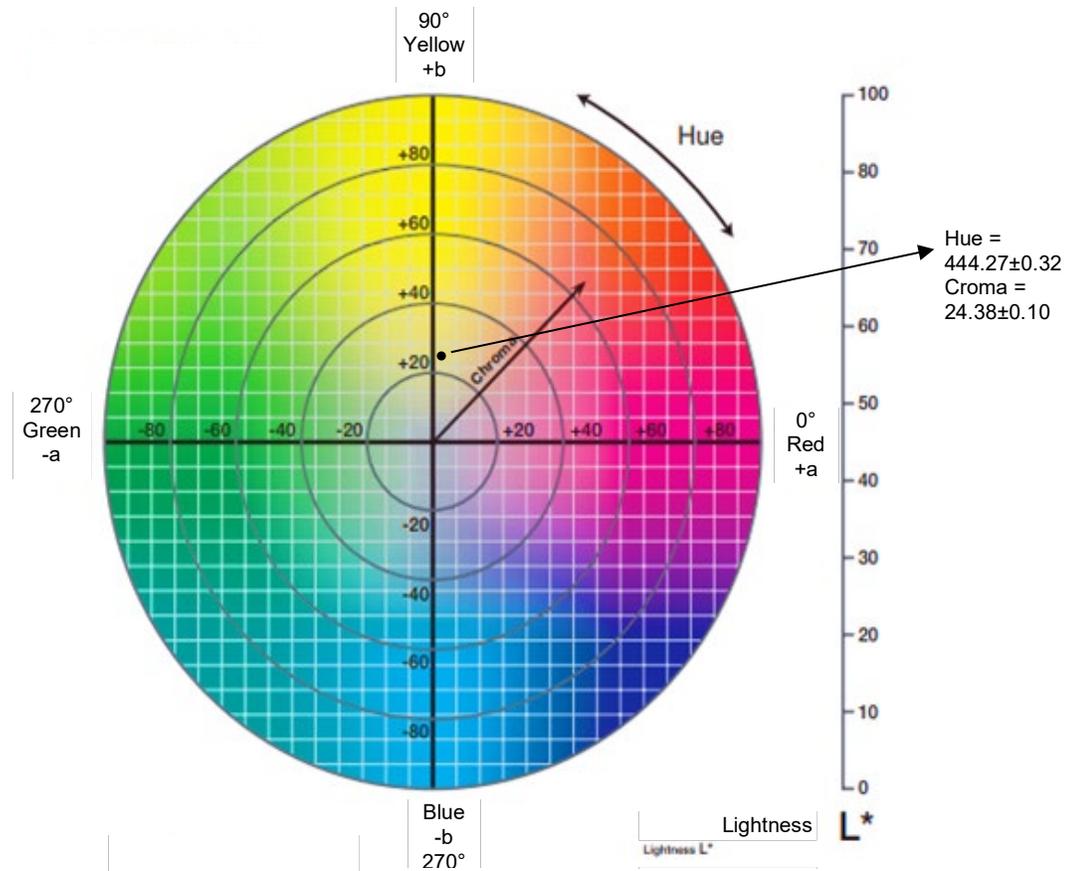


Figura 2. Representación gráfica de los parámetros Hue y Croma de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. (CIELAB color chart).

Los resultados de las características fisicoquímicas, análisis proximal, propiedades nutrimentales y capacidad antioxidante, además de la toxicidad de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica, nutrimental, antioxidante y toxicidad de *Leucaena esculenta* (DC) Benth.

Características	Valor
Peso hectolítrico (kg hL <sup>-1</sup> )	76.87±1.22 <sup>z</sup>
Peso de 1000 semillas (g)	86.13±0.21
Humedad (%)	8.26±0.12
Cenizas (%)	5.23±0.12
Fibra cruda (%)	26.61±0.89
Extracto etéreo (%)	3.70±0.15
Proteínas (%)	33.27±0.09
Calcio (mg g <sup>-1</sup> )	3.57
Fenoles totales (mg EAG g <sup>-1</sup> )	5.86±0.74
Flavonoides (mg EC g <sup>-1</sup> )	0.46±0.03
DPPH (mg ET g <sup>-1</sup> )	0.66±0.14
ABTS (mg ET g <sup>-1</sup> )	28.34±2.20
Mimosina (g 100 g <sup>-1</sup> )	0.167±0.005

<sup>z</sup>Desviación estándar.

Los valores obtenidos son el resultado de tres repeticiones.

De acuerdo con (Godoy, 2012) el porcentaje de la fibra cruda es diferente en las semillas secas de *L. esculenta*, debido a las etapas fenológicas, tal que mientras avanza la edad de corte de la planta, ésta se lignifica y se hace fibrosa. Por ello, en esta investigación se obtuvo 26.61±0.89 % de fibra cruda, dado que se cosecho en madurez fisiológica. Para el caso del extracto etéreo en las semillas secas es menor, en este caso sucede lo contrario, es decir, a medida que avanza la edad disminuye la concentración, es probable que se deba a la presencia de cutinas (Godoy, 2012).

Dentro de la familia de las Leguminosas se encuentra la *L. leucocephala*, nativa del sur de México y el norte de América Central, contiene altos porcentajes de proteína en su follaje y sus semillas, por tal motivo se utiliza como alimento para el ganado y los humanos. En *L. esculenta* (DC) Benth, el porcentaje de proteínas (33 %) fue similar al reportado por Román *et al.* (2014) (33.82 %).

El contenido de calcio para las semillas secas de guaje fue de 3.57 mg g<sup>-1</sup> es superior al reportado por Román *et al.*, 2014, que fue de 1.50 mg g<sup>-1</sup> en base seca. Es probable que las diferencias estén relacionadas con las condiciones geográficas y climatológicas de las localidades de colecta, así como a las etapas de madurez de las semillas.

### **3.3.1 Propiedades antioxidantes**

Las semillas de *L. esculenta*, son consideradas como un alimento funcional, principalmente por su calidad nutricional y capacidad antioxidante (Román *et al.*, 2014). Los flavonoides e inhibición de los radicales libres (ABTS) muestran valores superiores a los reportados por Román *et al.* (2014) (Cuadro 2). Sin embargo, presenta cantidades inferiores de fenoles y DPPH aquellos reportados por los autores citados. Por lo tanto, se confirma que, a menor concentración de compuestos fenólicos totales es menor la capacidad antioxidante.

En estudios epidemiológicos y de laboratorio se han identificado varios nutrientes antioxidantes protectores: selenio, vitaminas C y E, β-caroteno, y otros carotenoides, y varios compuestos polifenólicos derivados de alimentos de origen vegetal. El daño oxidativo del tejido por efecto de radicales O<sub>2</sub> es reducido mediante factores antioxidantes (Bender, 2010).

### **3.3.2 Determinación de mimosina**

En la presente investigación se analizó por primera vez la mimosina de la especie *Leucaena esculenta* (DC) Benth.

Las partes inmaduras del árbol de *Leucaena spp.* contienen cantidades mayores de mimosina que las partes maduras. Las semillas secas de *L. esculenta* (DC)

Benth contienen un menor porcentaje de mimosina ( $0.167\pm 0.005$  %) que el reportado para *L. leucocephala* (2.38 %) por Xuan, Elzaawely, Deba, Fukuta y Tawata (2006).

Los porcentajes de antioxidantes, la capacidad inhibidora de radicales libres y la mimosina fluctúan en función a la especie de *Leucaena spp.* Esto, podría deberse a factores genéticos y ambientales (Duarte *et al.*, 2012).

### **3.4 Conclusiones**

Las características físicas de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth se encuentran dentro de los parámetros de calidad molinera y comercial; las químicas como proteína, calcio, fibra cruda, ácidos grasos y contenido fenólicos, resaltan su valor nutrimental y nutracéutico.

### 3.5 Literatura citada

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2000). Official Methods of Analysis, 17th. Ed. Gaithersburg, MD, USA.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. (1990). Official Methods of Analysis. 15th Ed. Washington DC.
- AACC, American Association of Cereal Chemists. (2005). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10 th edition. Chemists, St. Paul, MN, USA.
- AACC, American Association of Cereal Chemists. (1995). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9th edition, Inc, St. Paul Minnesota.
- Bender, D. A. (2010). Radicales libres y nutrientes antioxidantes. In: Romero H. G. (Ed.), Harper. Bioquímica ilustrada (pp. 564-568). México: McGRAW-HILL.
- Chowtivanakul, P., Srichaikul, B. and Talubmook, Ch. (2016). Antidiabetic and antioxidant activities of seed extract from *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. Agriculture and Natural Resources, 50:(2016). 357-361.
- Chung, H. H., Chen, M. K., Chang, Y. Ch., Yang, S. F., Lin, Ch. Ch., Lin, Ch. W. (2017). Inhibitory effects of *Leucaena leucocephala* on the metástasis and invasion of human oral cancer cells. Environmental Toxicology, 2017(32), 1765-1774. doi: 10.1002/tox.22399.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. Journal of agricultural and food chemistry, 54(20), 7429-7436.
- De la O, O. M., Espitia, R. E., López, S. H., Villaseñor, M. H. E., Peña, B. R.J y Herrera, H. J. (2012). Calidad física de grano de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) mexicanos de temporal. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3(2), 271-283 p.
- Duarte, M. H. C., Bigonha, S. M., De Moraes, C. L., De Oliveira, B. R. C., Brunoro, C. N.M., Ramírez, C. L.L., Machado, R.R.S. (2012). Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health. 233-258 p. In: Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds (ACS Symposium). Tunick, M. H., González, D M. E. (eds.). American Chemical Society. USA. doi: 10.1021/bk-2012-1109.
- Egan H., Kirk R. S., Sawyer R. (2006). Composición y análisis de alimentos de Pearson. Ed. CECSA. 777 p.
- García, M. J.; Bustamante, G. A.; Vargas, L. S.; Guerrero, R. J. D.; Olvera, H. I. (2004). Organización territorial y distribución de la tierra en la comunidad de San Felipe Otlaltepec, Puebla, México. Revista de Investigación de la Universidad De la Salle Bajío. NovaScientia.

- Godoy, E. V., Barrera, A. A., Vivas, M. R., Quintana, Z. J., Peña, G. M., Villota, G. L., Casanova, F. L., Avellaneda, C. J. (2012). Evaluación fenológica y digestibilidad IN VIVO de la leguminosa forrajera (*Arachis pintoi*) en diferentes edades de corte. *Ciencia y Tecnología*, 5(2):7, 7-16.
- Henneberg, W.; Stohmann, F. (1867). *Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Widerkauer*. Vol 1. Braunschweig, Germany [In German].
- Hernández, H. F. de Jesús., Buendía, G. M. O. y López, H. A. de Jesús. (2016). Determinación de la dureza de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) por un método experimental de molienda integral. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 8(2), 61-69. doi: 10.5154/r.inagbi.2016.10.005.
- Imededdine, A. N., Hassen, S., Chin, P. T., Saud, I. A. (2014). *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit seed oil: Characterization and uses. *Industrial Crops and Products*, (52), 582-587.
- Jha, S. (2010). Colour measurements and Modeling In: *Nondestructive evaluation of food quality. Colour Measurements and Modeling*, En Jha (ed). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 17-40.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food chemistry*, 127(3), 1138-1145 p.
- McGuire, R. (1992). Reporting objective color measurements. *Horticultural Science*, 27, 1254-1255.
- Negi, V.S., Borthakur, D. (2016). Heterologous Expression and Characterization of Mimosinase from *Leucaena leucocephala*. In: *Fett-Neto A. (eds) Biotechnology of Plant Secondary Metabolism. Methods in Molecular Biology*, 1405, 59-77.
- Norma Oficial Mexicana NMX-FF-036-1996. PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS. CEREALES. TRIGO. (*Triticum aestivum* L y *Triticum durum* Desf.). Especificaciones y métodos de pruebas.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.
- Pandey, V. Ch., Kumar, A. (2013). *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant for pulp and paper production. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(3), 1165-1171. doi: 10.1007/s10722-012-9945-0.
- Pérez, H. P., Esquivel, E., Rosales, S. R., Acosta, G. J. A. (2002). Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(2), 172-180. Recuperado en 28 de julio de 2019, de

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000200009&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000200009&lng=es&tlng=es).

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237 p.
- Román, C. N., García, M. Ma. R., Castillo, G. A. Ma., Sahagún, C. J., Jiménez, A. A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp): Un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), 157-170.
- Rojas, B. A. (1979). Análisis estadístico del diseño San Cristóbal con tres factores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. D. F. México. 17 p.
- Salazar, M. J., Rivera, F. C. H., Arévalo, G. S., Guevara, E. A., Malda, B. G., Rascón, C. Q. (2015). Calidad del nixtamal y su relación con el ambiente de cultivo de maíz. *Revista Fitotecnia México*, 38(1), 67-73.
- Salazar, Z. A. 2000. Calidad industrial del trigo para su comercialización. In: el trigo de temporal en México. Villaseñor, M. E. y Espitia, R. E. (eds.). Campo Experimental Valle de México, INIFAP. Chapingo, Estado de México. 313 p.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Valle, P. y Lucas, B. (2000). Toxicología de alimentos. México. ISBN 92753004 4. Recuperado en 03 de marzo de 2019. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>
- Xuan, T.D., Elzaawely, A.A., Deba, F., Fukuta, M., Tawata, S. (2006). Mimosine in *Leucaena* as a potent bio-herbicide. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 26(2), 89-97 p.
- Zarate, P. S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México (parte A). *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* [en línea]. 65(2), 83-162. [Fecha de consulta: 26 de julio de 2019] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40065204>> ISSN 0185-254X
- Zul, I., Hanisjasyamah, H., Nurul, A. R., Norfadhilah, R., y Normaniza, O. (2015). Extraction and Quantification of Toxic Compound Mimosine from *Leucaena leucocephala* Leaves. *Procedia Chemistry*, 16(12), 164-70 p.

#### IV. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO TERMOALCALINO DE LAS SEMILLAS DE GUAJE (*Leucaena esculenta* (DC) Benth) PARA OBTENER HARINA

##### RESUMEN

Las semillas frescas de *L. esculenta* (DC) Benth se consumen en la época de cosecha, sin embargo, el excedente de semillas se deshidrata en los árboles y con frecuencia se desechan. El objetivo de esta investigación fue aplicar el proceso termoalcalino a las semillas de *L. esculenta* (DC) Benth para la obtención de una harina útil en la preparación de alimentos con alto valor nutrimental. Para el proceso de optimización se aplicó el diseño San Cristóbal. La harina obtenida fue analizada para determinar sus propiedades nutricionales, de acuerdo a los métodos de la AOAC y sus propiedades antioxidantes cuantificando los fenoles y flavonoides totales, la capacidad antioxidante se evaluó por los ensayos DPPH y ABTS. Asimismo, se determinó la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), además se aislaron las fracciones proteicas adaptando el método de Osborne. Se encontró que las condiciones óptimas del proceso termoalcalino fueron 0.004 g mL<sup>-1</sup> de óxido de calcio, 42 minutos de cocción y 8 h de reposo. De acuerdo con los resultados de las semillas secas con proceso termoalcalino la concentración de calcio incrementó en un 85 %, la humedad fue de 6.16 ± 0.07 %, proteína 31.59 ± 0.57 %, fibra cruda 22.65 ± 1.15 %, cenizas 17.72 ± 0.12 %, extracto etéreo 6.34 ± 0.03 %, fenoles 3.69 ± 0.52 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoides 0.38 ± 0.05 mg EC g<sup>-1</sup>, DPPH 0.63 ± 0.07 mg g<sup>-1</sup>, ABTS 13.85 ± 2.0 mg g<sup>-1</sup> y mimosina 0.154 %. Los ensayos de PBMCs muestran que la viabilidad de las células del sistema inmune no fue afectada. Las fracciones proteicas mayoritarias fueron las glutelinas y las prolaminas (58.24 %). La optimización del proceso termoalcalino deberá ser considerado como una alternativa de transformación agroindustrial, garantizando un producto alimenticio, nutritivo, nutracéutico e inocuo.

**Palabras clave:** Leguminosae, nixtamalización, antioxidantes, nutrición, toxicidad.

## OPTIMIZATION OF THE ALKALINE THERMO PROCESS OF THE SEEDS OF GUAJE (*Leucaena esculenta*) TO OBTAIN FLOUR.

### ABSTRACT

The fresh seeds of *L. esculenta* (DC) Benth are consumed at harvest time, however, surplus seeds are dehydrated in trees and often discarded. The aim of this research was to apply the thermal-alkaline process to the seeds of *L. esculenta* (DC) Benth to obtain a flour useful in the preparation of food with high nutritional value. For the process of optimization, the San Cristóbal design was applied, the obtained flour was analyzed to determine its nutritional properties, according to the methods of the AOAC and its antioxidant properties quantifying the total phenols and flavonoids, the antioxidant capacity was evaluated by the assays DPPH and ABTS. Cytotoxicity was also determined in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and protein fractions were isolated by adapting the Osborne and Mendel methods. It was found that the optimal conditions of the thermoalkaline process were 0.004 g mL<sup>-1</sup> of calcium oxide, 42 minutes of cooking and 8 h of rest. According to the results of the dry seeds with thermal-alkaline process the calcium concentration increased in 85 %, the humidity was 6.16 ± 0.07 %, protein 31.59 ± 0.57 %, crude fiber 22.65 ± 1.15 %, ashes 17.72 ± 0.12 %, ethereal extract 6.34 ± 0.03 %, phenols 3.69 ± 0.52 mg EAG g<sup>-1</sup>, flavonoids 0.38 ± 0.05 mg EC g<sup>-1</sup>, DPPH 0.63 ± 0.07 mg g<sup>-1</sup>, ABTS 13.85 ± 2.0 mg g<sup>-1</sup> and mimosine 0.154 %. Assays of PBMCs show that the viability of immune system cells was not affected. The major protein fractions were glutellins and prolamins (58.24 %). The optimization of the thermal-alkaline process should be considered as an agroindustrial transformation alternative, guaranteeing a food, nutritious, nutraceutical and innocuous product.

**Keywords:** Leguminosae, nixtamalization, antioxidants, nutrition, toxicity.

## 4.1 Introducción

Las diversas complicaciones de la salud de los mexicanos se derivan principalmente por una dieta inadecuada que causa factores metabólicos de riesgo, como hipertensión arterial, niveles elevados de glucosa y colesterol, así como exceso de peso y obesidad. Lo anterior provoca enfermedades crónico-degenerativas que, en México, causan 78 % de las muertes, entre las que destacan cardiopatías, diabetes y cáncer, actualmente estas enfermedades son más comunes en niños. Esta problemática está relacionada con la transición mundial en los patrones de alimentación y la accesibilidad hacia alimentos con mayor contenido calórico. Con el fin de mejorar la alimentación, además de reducir la ingesta de alimentos altamente calóricos, se considera indispensable retomar el consumo de alimentos naturales, poco procesados y/o producidos de forma tradicional. En tal sentido y, para nuestra fortuna, México alberga una gran riqueza, diversidad y accesibilidad de alimentos naturales, cuyo consumo podría contrarrestar los problemas de salud y seguridad alimentaria. Entre estas posibles respuestas, destacan los alimentos tradicionales indígenas de Mesoamérica como las leguminosas (Aparicio y Espinosa, 2016). Para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, las leguminosas forman el grupo de semillas secas y bajas en grasa, que han sido adoptadas en todo el mundo como principal fuente de proteínas y minerales; además, su aporte de aminoácidos esenciales es complementario al de los cereales. En la comunidad de San Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodríguez, Puebla las vainas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth reciben el nombre común de guaje. Esta leguminosa, se cosecha entre los meses de septiembre-enero y son comercializadas tanto local como exteriormente, principalmente a distribuidores de la Ciudad de México. Las semillas frescas de guaje son importantes en regiones suburbanas y rurales del país, se consumen crudas o cocidas en platillos tradicionales dependiendo de su frescura o madurez y forman parte de la identidad cultural de algunas entidades como Guerrero y Oaxaca (Román *et al.*, 2014). Así mismo, en el estado de Puebla hay comunidades donde

el guaje representa una fuente de ingresos y se considerada como parte de su identidad. Cuando la cosecha de vainas es abundante, estas se dejan secar en el árbol, y posteriormente las semillas se venden o usan como complemento de algunos platillos. Sin embargo, con mucha frecuencia las semillas ya no se utilizan. Entre las alternativas para el uso de semillas secas, como el maíz, se encuentra la nixtamalización, que consiste en un tratamiento termoalcalino a base de óxido de calcio. Este tratamiento ayuda a desprender el pericarpio del grano haciendo más disponibles los aminoácidos, la niacina, el triptófano y los minerales como el calcio. Adicionalmente facilita la molienda y mejora la adhesividad y extensibilidad de la masa resultante (Martínez *et al.*, 2001). Este proceso da como resultado importantes cambios en las características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales de los productos nixtamalizados (Salazar *et al.*, 2015). La aplicación del proceso de alcalinización a las semillas secas de *L. esculenta* para su uso posterior como una harina, representa una oportunidad para favorecer la economía de los habitantes de esa comunidad. Para establecer las condiciones óptimas de alcalinización de semillas, se hace necesario aplicar un método estadístico, en este caso se propone el diseño San Cristóbal que permite evaluar dos niveles de experimentación con diferentes factores, para establecer una superficie de respuesta con un punto óptimo (Rojas, 1979). El objetivo de esta investigación fue optimizar las condiciones del proceso termoalcalino de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth, aplicando el diseño San Cristóbal para desarrollar una harina, útil en la preparación de platillos con alto valor nutritivo.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Diseño estadístico**

**Diseño de tratamientos.** Se diseñaron dos tratamientos, con proceso termoalcalino (cPT) y sin proceso termoalcalino (sPT) de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, las variables respuesta a evaluar fueron las propiedades nutricionales, las propiedades antioxidantes, fenoles y flavonoides

totales, los ensayos DPPH y ABTS, la mimosina, la citotoxicidad y las fracciones proteicas.

**Diseño experimental.** Se implementó un diseño completamente al azar (DCA) para ensayar los tratamientos con y sin proceso termoalcalino de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. Con los resultados se realizó un ANOVA y comparación múltiples (Tukey).

#### **4.2.2 Material vegetal**

Se utilizaron 5 kg de semillas secas de guaje de la especie *Leucaena esculenta* (DC) Benth, correspondientes a la cosecha del ciclo agrícola otoño-invierno 2018, de San Felipe Otlaltepec, Tepexi de Rodríguez Puebla. El clima predominante en esta zona es del tipo (A)C(wo), semicálido, con temperatura media anual de 18 °C. Altitud 1500 a los 2100 msnm. Coordenadas: 18° 24' 02.85" latitud Norte, 97° 45' 28.70" longitud Oeste (García *et al.*, 2014).

#### **4.2.3 Estandarización del proceso termoalcalino**

Se trabajaron dos etapas, en la primera se llevaron a cabo ensayos preliminares para encontrar condiciones aproximadas del proceso termoalcalino de semillas de guaje, es decir, la concentración de óxido de calcio y los tiempos de cocción y de reposo iniciales para desarrollar el diseño San Cristóbal. En la segunda etapa se implementó este diseño experimental para estimar las condiciones óptimas del proceso. Finalmente, se implementó un DCA para ensayar los tratamientos, con y sin proceso termoalcalino. Con los resultados se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples de Tukey con apoyo del paquete SAS 9.4 (2009).

En los ensayos preliminares se tomó como referencia el proceso termoalcalino aplicado a frijol: 2 % CaO, 35 min de cocción y 12 h de reposo (Téllez y Arellano, 2005). Se ensayaron 2 tratamientos, los cuales se aplicaron según García y Sandoval (2011). La dureza se determinó de acuerdo al método de Hernández *et al.* (2016), para lo cual una muestra de semillas (30 g) se procesó en un molino de grano de café (marca Mr. Coffee®) durante 2 s. La muestra molida se cribó

en mallas número 14, 18, 20, 24, 30 y charola (marca Montinox®). Finalmente, la dureza del grano se clasificó de acuerdo con el porcentaje de retención en la malla número 14 de una escala hedónica.

Los ensayos preliminares permitieron definir los niveles de los factores: concentración de cal, tiempo de cocción y tiempo de reposo, cuyas combinaciones establecen el punto central (PC) y puntos axiales (PA). Esta información constituyó la base para desarrollar el diseño de la matriz San Cristóbal.

Desde el punto de vista práctico se ensayaron 12 combinaciones de tratamientos, lo que puede considerarse un número muy adecuado (Martínez, 1998). El método San Cristóbal permite diseñar experimentos, con tres variables relevantes o importantes, en este caso se aplicó a la optimización del proceso termoalcalino. La matriz San Cristóbal contiene tres clases de puntos experimentales, central, punto axial y puntos factoriales, generados de la siguiente manera: El punto central fue generado con la Ecuación (5):

$$PC = \frac{A_1 + A_0}{2} \quad (5)$$

Donde: (PC) punto central, ( $A_1$ ) nivel alto del factor A y ( $A_0$ ) nivel bajo del factor A.

Los puntos axiales fueron obtenidos como a partir de la Ecuación (6):

$$PA = A_1 + PC \quad (6)$$

Donde: (PA) punto axial, ( $A_1$ ) nivel alto del factor A y (PC) punto central.

El Cuadro 3, muestra los factores y los niveles que fueron considerados para adaptar el diseño San Cristóbal a las condiciones del proceso termoalcalino.

Cuadro 3. Niveles de las variables de la matriz San Cristóbal para el proceso termoalcalino.

Factor	Niveles	
	Bajo	Alto
Concentración de CaO (%)	0.5	1.0
Tiempo de cocción (min)	40.0	45.0
Tiempo de reposo (h)	5.0	7.0

Los factores y sus niveles se usaron para encontrar los puntos axiales y central cuyos valores se muestran en el (Cuadro 4).

Cuadro 4. Puntos factoriales para la matriz de San Cristóbal.

Puntos factoriales	Concentración de CaO (%)	Tiempo de cocción (min)	Tiempo de reposo (h)
PA <sup>z</sup>	1.25	47.5	8.0
PC <sup>y</sup>	0.75	42.5	6.0
PFA <sup>x</sup>	1.0	45.0	7.0
PFB <sup>w</sup>	0.5	40.0	5.0

<sup>z</sup>Punto Axial, <sup>w</sup>Punto Central, <sup>x</sup>Punto factorial al nivel alto, <sup>w</sup>Punto factorial al nivel bajo.

El Cuadro 5 muestra las 12 combinaciones de tratamientos que se obtuvieron al usar los datos de la matriz y desarrollar el método del diseño San Cristóbal.

Cuadro 5. Tratamientos obtenidos a partir de la matriz San Cristóbal para el proceso termoalcalino de las semillas secas *L. esculenta* (DC) Benth.

Puntos	Tratamientos	CaO (%)	Tiempo de cocción (min)	Tiempo de reposo (h)
Factorial	1	0.5	40	5
	2	1.0	40	5
	3	0.5	45	5
	4	1.0	45	5
	5	0.5	40	7
	6	1.0	40	7
	7	0.5	45	7
	8	1.0	45	7
Central	9	0.75	42.5	6
Axial	10	1.25	42.5	6
	11	0.75	47.5	6
	12	0.75	42.5	8

El modelo estadístico para el diseño San Cristóbal se expresa en la Ecuación (7):

$$y_i = \mu + \beta X_{ip} + e_i, i = 1, 2, \dots, n \quad (7)$$

$i = 1, 2, \dots, n, n \geq p+1$

$y_i$  = i-ésimo valor de la variable explicativa

$X_i$  = i-ésimo valor de la variable explicativa

$\mu$  = Intersección con el eje Y

$e_i$  = i-ésimo error aleatorio

$X_{ip}$  = cantidades conocidas

Supuestos del modelo

$\epsilon_i \sim NI(0, \sigma^2)$  (normalidad, independencia, media cero y varianza homogénea).

#### **4.2.4 Experimentación termoalcalino con base en el diseño San Cristóbal**

El proceso termoalcalino se aplicó con los 12 tratamientos diseñados, en cada ensayo se midieron las siguientes variables respuesta: porcentaje de proteína, calcio, fenoles totales, flavonoides totales y concentración de mimosina. Las variables calcio y proteína fueron elegidas para la optimización de las condiciones del proceso. La estandarización del proceso termoalcalino en las semillas secas *L. esculenta* (DC) Benth se ilustra en la Figura 3.

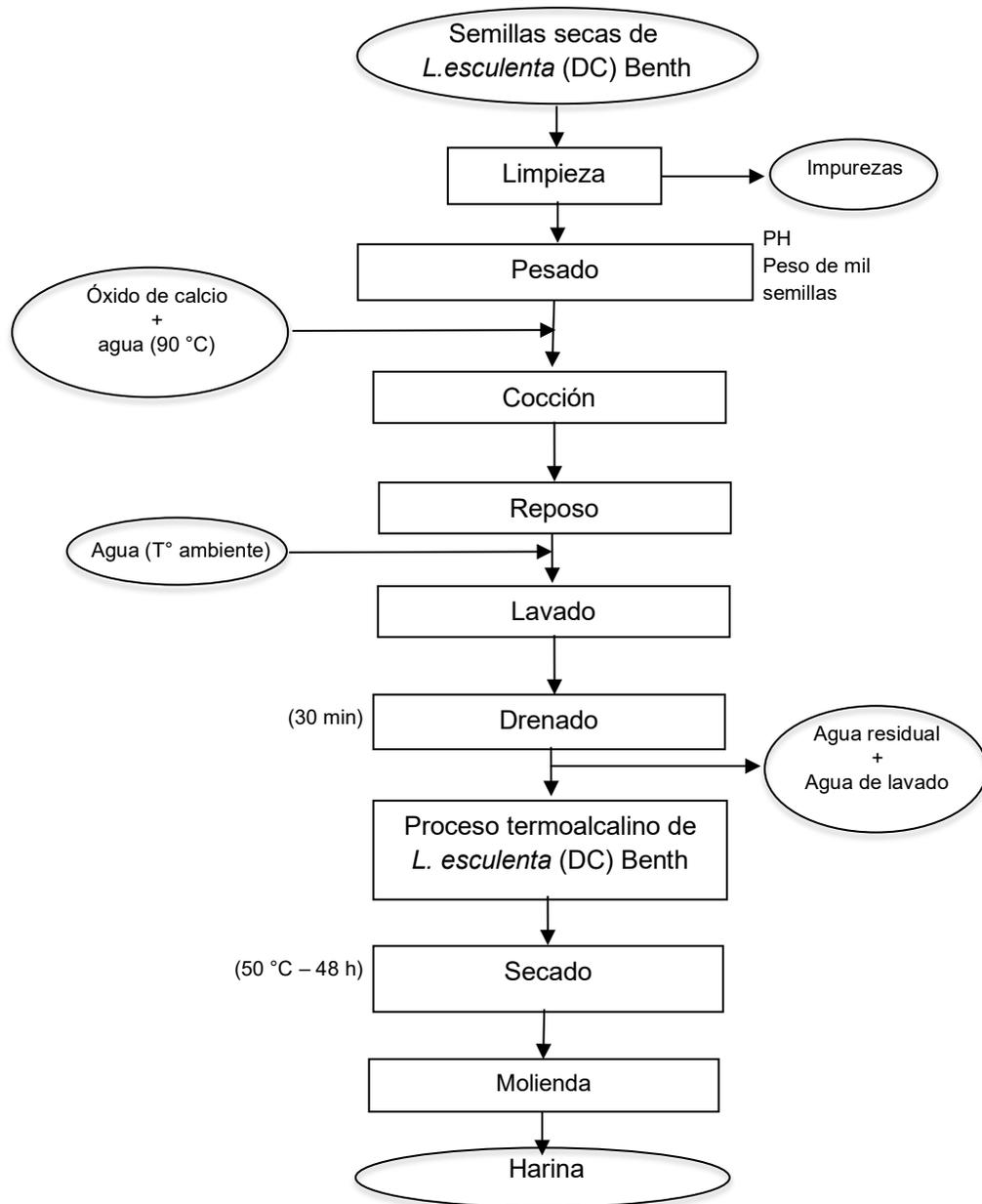


Figura 3. Diagrama de bloques del proceso termoalcalino de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth.

En vasos de precipitados de 600 mL se agregaron 300 mL de agua, se llevó a una temperatura aproximada de 90 °C, inmediatamente se agregan las respectivas cantidades de óxido de calcio para obtener las condiciones de cada tratamiento, la mezcla se homogeneizó con un agitador de vidrio y enseguida se agregaron 100 g de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. Cada vaso se cubrió con papel aluminio y un vidrio de reloj, retirándolos únicamente para mover la mezcla.

Los tiempos de cocción correspondieron a los previamente determinados para cada tratamiento (40, 42.5, 45 y 47.5 min). Después se retiraron y se dejaron reposar durante los tiempos correspondientes para cada tratamiento (5, 6, 7 y 8 horas). Posteriormente las semillas se escurrieron en una malla. Se midió el volumen de agua residual (“nejayote”) y el correspondiente pH. Las semillas secas de guaje nixtamalizadas se lavaron con 550 mL de agua destilada, esta agua de lavado se mezcló con el líquido residual, y se midió el volumen total. Las semillas se dejaron en las mallas y luego se escurrieron en toallas de papel por 30 minutos. Al final, las semillas nixtamalizadas de cada tratamiento se secaron en un deshidratador con corriente de aire a 50 °C durante 48 h (Sedona SD-S9000) y después se molieron en un nutribullet, el cual se prefirió para evitar la pérdida de la muestra.

Por otro lado, los volúmenes del líquido residual ( $V_1$ ) y total ( $V_T$ ) se determinaron después del tiempo de reposo. El pH del líquido residual se determinó con un potenciómetro (ThermoOrion, pH meter, 420) previamente calibrado.

Las semillas sometidas al proceso termoalcalino se lavaron dos veces, este líquido se mezcló con el agua residual. Se determinó el volumen total y de éste se tomaron alícuotas de 20 mL, las cuales se colocaron en cajas de aluminio a peso constante y se secaron a una temperatura de 90 °C durante 24 h, después se colocaron en un desecador (30 min) y se registró el peso final. El porcentaje de los sólidos totales del agua residual se determinó según la Ecuación (8) (Buendía, 2011).

$$ST = \frac{Ch_2 - Ch_1}{VA} * 100 \quad (8)$$

Donde: (Ch1) peso de la charola con muestra seca (g), (Ch2) peso de la charola (g) y (VA) volumen de la alícuota (mL).

#### **4.2.5 Proceso termoalcalino de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, en condiciones óptimas**

Se usó el programa estadístico SAS 9.4 (2009) con las variables respuesta porcentajes de proteína y calcio. Con los resultados se construyeron gráficos de

superficie de respuesta para estimar el punto óptimo del proceso termoalcalino en las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. Los datos arrojados del programa SAS indican la región óptima donde se ubica el punto crítico de la concentración del óxido de calcio, el tiempo cocción y el tiempo de reposo, y con ello obtener el mayor contenido de proteína y calcio en la harina. Finalmente, las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, fueron sometidas al proceso termoalcalino en las condiciones óptimas (punto crítico), siguiendo las operaciones unitarias con base en el diagrama de bloques reportado en la Figura 3. Con ello, producir la harina de *L. esculenta* nixtamalizada bajo condiciones óptimas del proceso.

#### 4.2.6 Propiedades nutricionales de la harina

La harina con proceso termoalcalino de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, se caracterizó nutricional y nutracéuticamente. El análisis proximal consistió en la determinación de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda (Henneberg and Stohmann, 1867) y los porcentajes de calcio, hierro, potasio, magnesio, sodio, fósforo y zinc. Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

El perfil de ácidos grasos se determinó de acuerdo con el método de (López *et al.*, 2018). Primero, una muestra de la harina de semillas secas con proceso termoalcalino (30 g) se sometió a maceración con hexano (24 h). Después de ese tiempo, la mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida en un rotavapor (Büchi Rotovapor, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) a 40 °C. El rendimiento de extracción del aceite se calculó de acuerdo con la ecuación (9).

$$\text{Contenido de aceite (\%)} = \frac{(100 - W) * Z}{Y} \quad (9)$$

Donde: W es el contenido de humedad (%), Z es el peso del aceite extraído (g), Y es el peso de la muestra de la harina de las semillas secas de guaje (g).

Para determinar el perfil de ácidos grasos (FAME's), el aceite obtenido fue sometido a los procesos de esterificación ácida y transesterificación alcalina

(Maroquin *et al.*, 2011). Una disolución de metanol con ácido sulfúrico al 5% se adicionó al aceite en una proporción 4:1 (v/p). La mezcla de reacción se sometió a reflujo por 2 h a 60 °C, después de proceso de esterificación, la mezcla se vertió en un embudo de separación, donde el exceso de ácido sulfúrico, alcohol e impurezas se separaron en la fase superior, la fase inferior se recuperó y se lavó con agua hasta pH neutro y finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro. Una mezcla de KOH en metanol (28 mg mL<sup>-1</sup>) se mezcló con el aceite esterificado en una proporción 1:4 (v/p). La mezcla se agitó por una hora a 70 °C. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa delgada usando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo y ácido acético (9:1:0.1, v/v/v), la mezcla de reacción se vertió en un embudo de separación. La fase superior contenía a los FAME's, mientras que la inferior glicerol e impurezas, Después de descartar la fase inferior, los FAME's se lavaron con agua y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Los FAME's fueron analizados por cromatografía de gases (GC Agilent 6890) y Columna ATSilar (30 m · 0.25 mm ID) con ionización de llama (FID). El gradiente de temperatura de la columna varió de 170 a 240 °C y se usó hidrógeno, con un caudal de 1.8 mL por minuto, como gas portador. Se utilizó una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos y los tiempos de retención se utilizaron para identificar los picos de la muestra. Los niveles de ácidos grasos se estimaron como porcentaje del área total del área máxima de ésteres metílicos.

#### **4.2.7 Propiedades antioxidantes**

Los extractos para determinar las propiedades antioxidantes en las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth, se obtuvieron como se menciona a continuación: una muestra de semillas molidas (1 g) se mezcló con metanol al 80 % en una relación 1:10 (p/v). La mezcla se agitó en vortex por 1 minuto, y el pH se ajustó a 3 con HCl al 10 %. Los extractos se obtuvieron por agitación en vortex (3 minutos), sonicación (15 min) y agitación en incubadora (30 min a 37 °C). Posteriormente la mezcla se centrifugó (4000 rpm a 15 min) y el sobrenadante se aforó con metanol al 80 %. Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

### **Determinación de fenoles totales**

Los fenoles totales se cuantificaron por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) adaptado a microplacas. En cada pozo de una microplaca se mezclaron 25  $\mu\text{L}$  del extracto, 20  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin Ciocalteu, 30  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20 % y 125  $\mu\text{L}$  de agua destilada, la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min bajo condiciones de oscuridad. Transcurrido el tiempo, se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. Una curva de calibración de ácido gálico se preparó en un rango de concentraciones de 1.25 a 11.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La ecuación obtenida mediante la curva tipo se utilizó para determinar el contenido de fenoles totales en la muestra. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ). Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

### **Determinación de flavonoides**

Los flavonoides totales se determinaron de acuerdo al procedimiento de Kubola & Siriamornpun (2011) adaptado a microplacas. El extracto de cada muestra (0.5 mL) se mezcló con agua destilada (4.3 mL) y  $\text{NaNO}_2$  al 5 % (0.15 mL). Después de 5 min se agregaron 0.3 mL de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 10 %. La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH al 5 %. Después, la mezcla de reacción fue agitada en vortex (3,000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm. Una curva de calibración de la catequina se preparó en un rango de concentraciones de 0.65 a 32.60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La ecuación obtenida por la curva tipo se utilizó para determinar la concentración de flavonoides totales en la muestra. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg EC g}^{-1}$ ). Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

## Ensayo DPPH

El ensayo DPPH se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Cheng *et al.* (2006), haciendo algunas modificaciones. Se preparó una disolución 1 mM DPPH en metanol al 80 %. Para la curva de calibración se utilizó una disolución stock de trolox 4.5 mM, a partir de la cual se obtuvieron disoluciones en un rango de concentraciones de 3.99 a 39.95  $\mu\text{M}$ , usando como disolvente metanol al 80 %. La muestra se diluyó para obtener diferentes concentraciones en el intervalo de 1.21 a 12.05  $\text{mg mL}^{-1}$  usando metanol al 80 %. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de trolox y por otra parte las diferentes concentraciones del extracto de las semillas secas de guaje, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la disolución DPPH. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. Como control se utilizó una mezcla de la disolución de DPPH (50  $\mu\text{L}$ ) en metanol al 80 % (200  $\mu\text{L}$ ). Para calcular el porcentaje de DPPH degradado se aplicó la Ecuación (10). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg ET g}^{-1}$ ).

$$\% \text{ DPPH}_{\text{degradado}} = \left( 1 - \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100 \quad (10)$$

Donde  $A_m$ ,  $A_b$  y  $A_c$ , representan las absorbancias de la muestra, del blanco y del control, respectivamente. El porcentaje de reducción del DPPH fue graficado contra las concentraciones de las muestras y la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ), concentración necesaria para degradar el 50 % de DPPH. Se calculó la ecuación de regresión obtenida de la curva de calibración de Trolox en función al DPPH degradado. Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

## Ensayo ABTS

El ensayo de ABTS se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por (Re *et al.*, 1999) adaptado a microplacas. Se prepararon las disoluciones de ABTS 7.4 mM y una disolución de persulfato de sodio 2.6 mM de las cuales se mezclaron volúmenes iguales (10 mL cada una) y se dejaron incubar a temperatura

ambiente durante 16 h en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se tomaron 600  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se aforó a 10 mL con metanol puro. En la microplaca de 96 pozos se colocaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto de guaje. Se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de la disolución ABTS. Como blanco se utilizó la disolución ABTS (200  $\mu\text{L}$ ). La disminución de la absorbancia fue registrada a 734 nm por espacio de 10 min. La curva de calibración de trolox se preparó en un rango de concentraciones de 4.99 a 59.93  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de trolox por gramo de muestra en base seca ( $\text{mg ET g}^{-1}$ ). Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

#### **4.2.8 Determinación de mimosina**

Para determinar el contenido de mimosina se siguió el método de (Zul *et al.*, 2015). Las semillas secas y molidas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth (1 g) se mezclaron HCl 0.1 N (10 mL). La mezcla se sometió a reflujo durante 1 h, después de enfriar, la mezcla se centrifugó (4000 rpm, 30 min) y el sobrenadante se aforó a 10 mL 0.1 N de HCl. La disolución stock de mimosina para construir la curva de calibración fue preparada de la siguiente manera: la L-Mimosine (0.025 g), se mezcló 25 mL, 4 mL de  $\text{FeCl}_3$  al 0.5 %, 10 mL de HCl 0.1N y se aforó a 50 mL con HCl 0.1 N. De la disolución stock, se tomaron alícuotas de 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 1000  $\mu\text{L}$  en HCl 0.1 N y 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  al 0.5 % en HCl 0.1 N. Cada mezcla se aforó a 10 mL con agua destilada. Finalmente se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de cada una de las mezclas de reacción a una microplaca. Y se leyeron las absorbancias a 535 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de mimosina en base seca. La determinación se hizo por triplicado y se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

#### **4.2.9 Obtención de un extracto enriquecido en proteínas a partir de las semillas y la harina de *Leucaena esculenta* (DC) Benth**

Para la extracción de proteínas se siguió el método propuesto por Johnson, Nickerson and Low (2015), con algunas modificaciones. Las muestras, sin proceso termoalcalino de la harina de las semillas secas y con proceso termoalcalino de las semillas secas, de *L. esculenta* (DC) Benth se molieron por

separado en un Nutribullet. Cada muestra se extrajo de la siguiente manera: se le adicionó agua destilada en una proporción 0.25:1 m/v, se ajustó el pH a 9 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 M. El extracto se obtuvo por agitación (45 °C, 180 rpm, 1h), después se centrifugó a (7500 rpm, 30 min). El sobrenadante se separó y se guardó en el refrigerador, el residuo se extrajo dos veces más, siguiendo el procedimiento anterior. En el residuo se cuantificó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford (1976).

Las fracciones proteicas de las semillas secas de guaje y de la harina, fueron extraídas adaptando el método de Osborne y Mendel (1914), según Tan, Hailer, Blanchard and Agboola (2011). Para la extracción de las albuminas, las muestras de las harinas de las semillas secas de guaje con y sin proceso termoalcalino, se mezclaron con agua desionizada en una la proporción 1:1 m/v y se agitaron durante una hora, después, la mezcla se centrifugó (7500 rpm, 30 min) y el sobrenadante se recolectó y se guardó en el refrigerador, el residuo se utilizó para extraer la fracción de globulinas, para lo cual se mezcló con 100 mL de NaCl al 5 % y se centrifugó (7500 rpm, 30 min). El sobrenadante fue dializado y el residuo se mezcló con agua destilada ajustando el pH a 4 con HCl 1 M. Después, la mezcla fue centrifugada (7500 rpm, 10 min), el sobrenadante resultante se recuperó y su pH se ajustó a 7 con NaOH 1 M, después, se agitó durante una hora y se centrifugó (7500 rpm, 30 min), en el sobrenadante se aislaron las glutelinas. Finalmente, el residuo obtenido se usó para la extracción de prolaminas, para lo cual, se mezcló con etanol al 70 % (100 mL). Después de filtrar, se evaporó en un rotavapor a presión reducida (Water Bath BM 200). Todas las fracciones obtenidas se liofilizaron.

Cada una de las fracciones proteicas fue analizada por electroforesis. Asimismo, se hicieron pruebas de toxicidad con Células Mononucleares de Sangre Periférica. Cada procedimiento se hizo por triplicado y se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

#### 4.2.10 Electroforesis

La electroforesis se hizo por el método en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico (SDS-PAGE) (Brunelle y Green, 2014). Las soluciones buffer se prepararon de la siguiente manera: acrilamida/ bisacrilamida, se pesó 87.6 g de acrilamida y 2.4 g de bisacrilamida, se mezclaron y se disolvieron en 300 mL de agua desionizada. El tris HCl 1.5 M pH 8.8, se pesó 27.23 g de Tris base, se agregó 8 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.8 con HCl 1.5 M y se llevó a volumen total de 150 mL con agua desionizada, se almacenó a 4 °C. El tris HCl 0.5 M pH 6.8, se pesó 6 g de Tris base, se disolvieron 60 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 6.8 con HCl 0.5 M y se llevó a volumen final de 100 mL de agua desionizada, se almacenó a 4 °C. El Buffer de muestra para SDS-PAGE, se mezcló con 3.55 mL de agua desionizada, 1.25 mL de Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 mL de glicerina, 2 mL de SDS 10 % (p/v) y 0.2 mL de azul de bromofenol (0.5 % p/v). Se conservó a temperatura ambiente y se mezclaron 50  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 950  $\mu$ L de buffer de muestra, se colocó 1:2 con respecto a la muestra. El SDS 10 % (p/v), se pesó 0.5 g de SDS y se diluyó en 5 mL de agua desionizada. El Buffer de corrida SDS-PAGE, se pesó 30.3 g de Tris base, 144.1 g de glicina y 10 g de SDS, se mezclaron y se llevó a volumen de 1000 mL, se tomaron 100 mL de la solución anterior y se aforó a 1000 mL con agua desionizada. Ambos buffers se almacenaron a 4 °C y para el persulfato de amonio (APS) al 10 % (p/v), se pesó 100 mg de APS y se adicionó 1 mL de agua desionizada.

Para el gel de resolución el buffer de gel es Tris HCl 1.5 M pH 8.8, después de desgasificar la solución se adicionó 50  $\mu$ L de APS (10 %) y 5  $\mu$ L de Tetraetilendiamina (TEMED) y para el gel de apilamiento, el buffer correspondiente fue Tris HCl 0.5 M (pH 6.8) y se agregaron 50  $\mu$ L de APS (10 % de persulfato de amonio) y 10  $\mu$ L de Tetraetilendiamina (TEMED).

Con la formulación de un gel al 12 %, se colocaron tres muestras en el gel, dos de albumina con una concentración de 120  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, dos muestras de proteína extraída de las semillas secas de guaje sin proceso termoalcalino y dos muestras

de proteína extraída de la harina de las semillas alcalinizadas, ambas de 50 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína, se corrió a 180 V durante 40 minutos en buffer de Tris-glicina-SDS. Las bandas se tiñeron con azul de Coomasie. Las proteínas extraídas por el método de Osborne se corrieron en las mismas condiciones. Con una concentración de proteína de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , los carriles se cargaron con 15  $\mu\text{L}$  de muestra y 30  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra.

#### **4.2.11 Prueba de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

Para la determinación de esta prueba se siguió el método de Pourahmad and Salimi (2015). Las células fueron obtenidas de paquetes leucocitarios de donadores sanos (Banco de sangre, del Hospital Central Militar, CDMX), usando el gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En un tubo de 50 mL se agregaron 10 mL de Lymphoprep y en otro tubo se colocaron 20 mL de medio de cultivo RPMI 1640, con 20 mL de sangre del paquete leucocitario, esta mezcla se agregó con una pipeta Pasteur al tubo donde estaba el Lymphoprep, evitando que se combinaran, se centrifugó a 1750 rpm a 18 °C durante 30 minutos. Se transfieren solo las células mononucleares a un tubo de 50 mL, se realizaron tres lavados, en el primero se le agregaron 30 mL de RPMI 1640 y se centrifugó a 1750 rpm a 18 °C por 10 minutos, el sobrenadante se desechó (en una solución con cloro al 10 %), y el sólido se agitó, en el segundo lavado se agregaron 20 mL de RPMI 1640, se centrifugó a 1750 rpm a 18 °C por 10 minutos y el tercer lavado se realizó igual que el segundo, solo que con 10 mL de RPMI 1640. Después de los lavados de las células mononucleares se agregaron 5 mL de medio de cultivo X-VIVO.

Se procedió a contarlas usando el kit Muse™ de conteo y viabilidad, con éste se tiñen todas las células vivas o muertas, el equipo discrimina a partir del uso de una suspensión celular, pasan por un capilar una por una y por medio de un láser que excita a los marcadores que se usaron, identifica las células vivas y las muertas, por medio de dos gráficos de puntos muestra los datos, señala qué células tienen marcadores de vida y cuáles de muerte, con esto se saca el porcentaje de viabilidad de la concentración de células.

Para el análisis de la citotoxicidad para ambos tratamientos (harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT y sPT) se usaron 50 µL del extracto proteico, obtenido previamente, este se puso en el medio X-VIVO se filtró con una membrana estéril de 0.22 micras, de ahí se hicieron las diluciones para colocar las diferentes concentraciones a evaluar, para obtener un volumen final de 100 µL. El extracto fue evaluado en las células mononucleares a concentraciones de 50, 100, 250 y 500 µg mL<sup>-1</sup>. Las PBMCs fueron sembradas en microplacas de 96 pozos a una confluencia de 50, 000 células por pozo en un volumen de 50 µL de medio de cultivo X-ben.

La citotoxicidad de cada extracto fue determinada con la solución WST-1 y se dejaron a incubar de 24 y 72 h, después se usaron 10 µL de la solución WST-1, fueron adicionados a cada pozo, las células fueron incubadas por 90 min a 37 °C en una atmósfera modificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las placas fueron agitadas por 5 s y se leyó la absorbancia a 450 nm usando el equipo ELISA. Los diferentes tratamientos se compararon contra el control negativo y el porcentaje de viabilidad fue calculado. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con sus respectivos controles, se implementó un DCA, se obtuvo la media y la desviación estándar para cada uno. Se realizó un ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey).

### 4.3 Resultados y discusión

El Cuadro 6, muestra los resultados de la retención de las semillas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino (cPT) y sin proceso termoalcalino (sPT), como se observa, las cantidades de semillas retenidas en las cribas de malla 14, 24, 30 y la charola, presentaron diferencias entre la retención de semillas sPT y las semillas cPT.

Cuadro 6. Retención de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth en cribas de diferente calibre.

Tratamiento	Malla 14	Malla 18	Malla 20	Malla 24	Malla 30	Charola
sPT	27.13±1.05 <sup>a</sup>	0.6±0.3 <sup>a</sup>	0.8±0.36 <sup>a</sup>	0.37±0.15 <sup>b</sup>	0.27±0.15 <sup>b</sup>	0.6±0.3 <sup>b</sup>
cPT	24.87±0.23 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>a</sup>	1.27±0.15 <sup>a</sup>	0.70±0.1 <sup>a</sup>	0.53±0.06 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>a</sup>

<sup>z</sup> Las muestras con diferente letra dentro de columnas son estadísticamente diferentes (P≤0.05). sPT: sin proceso termoalcalino. cPT: con proceso termoalcalino.

Debido a que las semillas secas son muy duras se incrementó la concentración de óxido de calcio (CaO) al 2 %, pero se percibió un sabor amargo y el color de la harina fue muy oscuro, esto podría ser como menciona Paredes *et al.* (2009) para el caso del maíz, que los aminoácidos liberados pueden producir un compuesto llamado lisinoalanina que puede reaccionar con azúcares reductores formando compuestos de color oscuro.

El Cuadro 7 presenta la clasificación con base en el porcentaje de retención de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. El mayor porcentaje de la muestra de guaje retenido fue en la malla 14, sin embargo, las semillas sPT presentaron el 91.15 % y comparándolo con la escala hedónica se clasifican en extremadamente duro. Para el caso de las semillas cPT que tuvieron el 83.23 % de retención, se clasifica como muy dura.

Cuadro 7. Porcentaje de retención de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth.

Tratamiento	Malla 14	Malla 18	Malla 20	Malla 24	Malla 30	Charola
sPT	91.15	2.02	2.69	1.23	0.90	2.02
cPT	83.53	3.02	4.27	2.35	1.79	5.04

sPT: sin proceso termoalcalino. cPT: con proceso termoalcalino.

Como resultado de los ensayos preliminares y tomando en cuenta el porcentaje de dureza y la concentración de CaO de las semillas secas de guaje, se seleccionaron los factores y sus niveles para el uso de la matriz San Cristóbal. El Cuadro 8 muestra el arreglo factorial 2<sup>3</sup> elegido.

Cuadro 8. Niveles de los factores experimentales.

Factores	NIVELES	
	Bajo	Alto
Concentración de cal (CC)	0.5	1.0
Tiempo de cocción (TC)	40.0	45.0
Tiempo de reposo (TR)	5.0	7.0

#### 4.3.1 Análisis realizados al agua residual de cocimiento

En los volúmenes del agua residual de cocción se observó que las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, tienen diferente absorción de agua (18 – 93 mL),

dependiendo de cada tratamiento, es decir, por los diferentes tiempos de cocción y de reposo.

El tratamiento 1 presentó el menor volumen del agua residual de cocimiento, debido a que tuvo menor concentración de óxido de calcio, menores tiempos de cocción y reposo; el tratamiento 7 presentó mayor volumen del agua residual de cocimiento, tuvo menor concentración de óxido de calcio, mayor tiempo cocción y tiempo de reposo.

Los ensayos preliminares mostraron que el rango de pH del agua residual de cocimiento de los procesos termoalcalinos osciló entre 6.0 y 6.8, en tanto que el pH del agua residual del proceso tradicional en maíz fluctúa de 11 a 12. En general, se pudo observar que el pH de la solución del agua residual de cocimiento se incrementó con el aumento de óxido de calcio. No hubo pérdida de sólidos, comparando con las pérdidas durante la nixtamalización del maíz, de acuerdo con la NMX-FF-034/1-2002, la cual establece que para la industria molinera tortillera se permite un máximo de 5 % de pérdida de sólidos (materia seca). Las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, cumplen la norma, dado que reportaron un rango de 0.48 % a 1.42 % de sólidos totales en el agua residual de cocimiento. Esto pudo deberse a que las semillas son muy duras, en tanto que aquellas del maíz tienen cutícula suave, lo que provoca el desprendimiento de mayor cantidad de pericarpio y componentes del endospermo hacía el agua residual del cocimiento.

El contenido proteico fluctúa en el intervalo de 28.33 % (tratamiento 12) a 30.59 % de proteína (tratamiento 6). El porcentaje de proteína de los tratamientos ensayados fluctuó en torno a 29.5 % correspondiente a semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT. Aquellos tratamientos que superaron el 29.5 % coinciden con lo reportado por Figueroa (2013) y Ramos *et al.* (2007), en el sentido que la nixtamalización incrementa el balance de proteína.

La fijación del calcio al interior del grano con cascarilla, es de interés desde el punto de vista nutricional y se observa que al igual que en el grano de maíz, el

tratamiento con óxido de calcio permite que el contenido de calcio se incremente en la harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. Para el caso del maíz aumenta de 0.05 % a 0.30 % (Castillo *et al.*, 2009).

Los resultados de porcentaje de calcio, cuyo incremento fluctúa de 0.50 % (tratamiento 3) a 0.81 % (tratamiento 5). Esto supera el 0.33 % de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sin proceso termoalcalino. Los tratamientos ensayados en las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino, no mostraron una correlación positiva entre el contenido de óxido de calcio y el tiempo de cocción como menciona Castillo *et al.* (2009), que conforme se incrementa la concentración de CaO y el tiempo de cocción del grano de maíz, la concentración de calcio absorbido tiende a ser mayor.

#### **4.3.2 Optimización del proceso termoalcalino de *L. esculenta* (DC) Benth**

El método de superficie de respuesta, estima las condiciones óptimas del proceso termoalcalino e ilustra el comportamiento de las variables explicativas, en este caso, contenidos de proteína y calcio, en las fronteras experimentales y su efecto sobre la variable respuesta.

Como se puede observar en la Figura 4 a concentraciones de cal a 0.5 %, con tiempo de reposo de 8 h se obtuvieron los mayores contenidos de calcio en harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino.

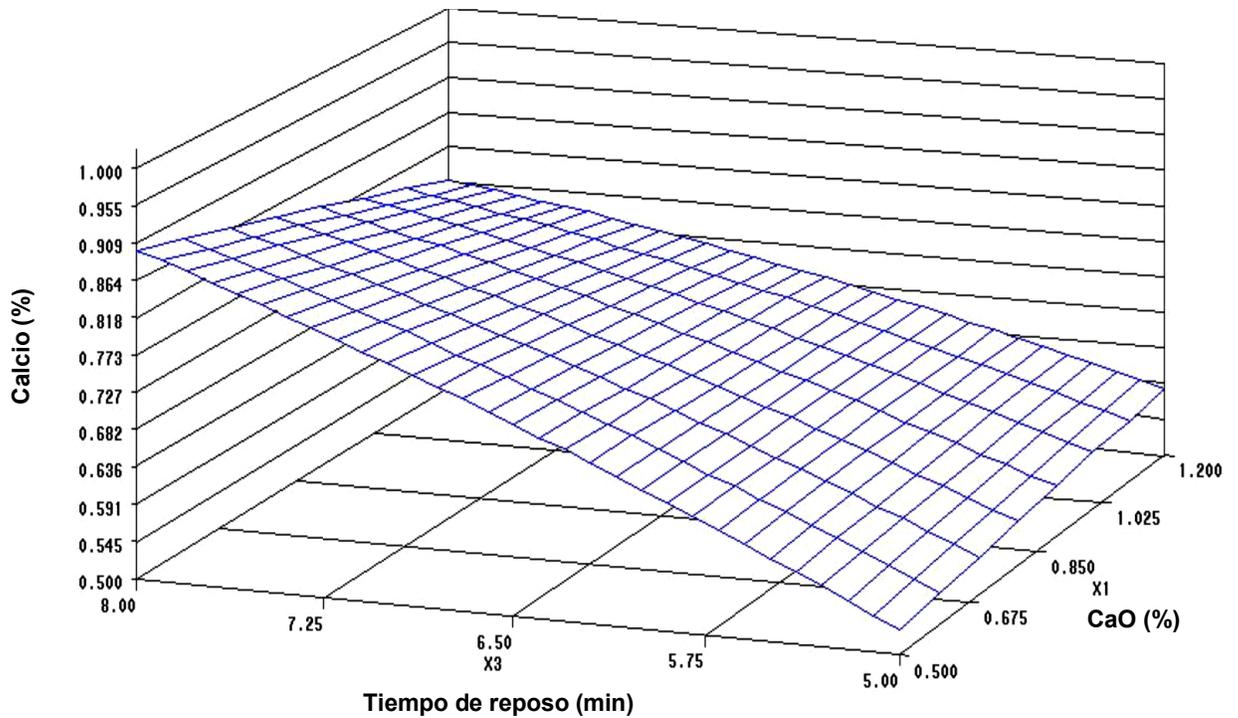


Figura 4. Efecto de cocción de 40 minutos, tiempo de cocción y tiempo de reposo sobre el contenido de calcio en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, desarrollada por el proceso termoalcalino.

La Figura 5 muestra que, a un tiempo de cocción de 40 min, concentración de cal a 0.5% y con tiempo de reposo de 5 h se presenta un incremento en los porcentajes de proteína, sin embargo, llega a un punto que empieza a decrecer, indicando que no existe una relación directamente proporcional, es decir, se esperaba que el proceso termoalcalino incrementará el balance de proteína (Figueroa, 2010).

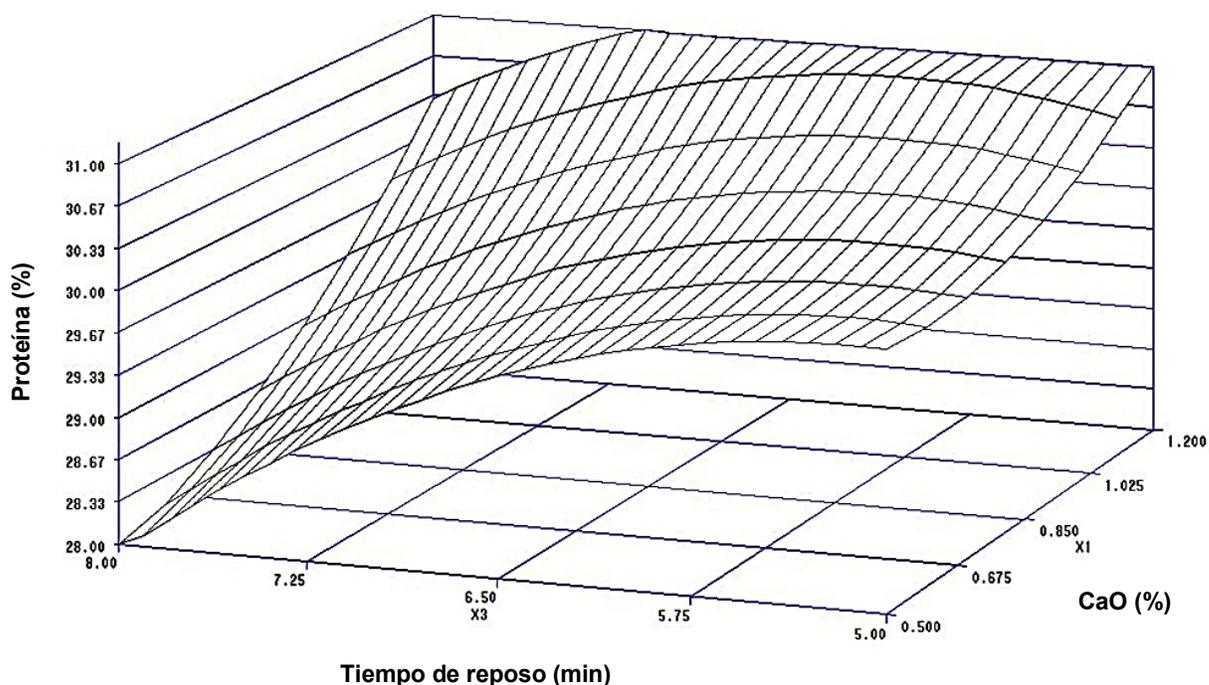


Figura 5. Efecto del CaO y el tiempo de reposo sobre el contenido de proteína en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth desarrollada por el proceso termoalcalino.

#### 4.3.3 Condiciones óptimas del proceso termoalcalino en semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth para la producción de harina

Mediante el paquete estadístico SAS 9.4 (2009) se localizaron los puntos óptimos del proceso termoalcalino de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, donde se tienen los mayores contenidos de calcio y proteína (Cuadro 9).

Cuadro 9. Condiciones óptimas del proceso termoalcalino en semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth.

Factor	Valor óptimo	
	Calcio	Proteína
Óxido de calcio (g)	1.3	1.2
Tiempo de cocción (min)	42	51
Tiempo de reposo (h)	8	8.3

#### 4.3.4 Análisis proximal de harina

El Cuadro 10 muestra la harina de las semillas cPT presenta diferencias en comparación con las semillas secas sPT de *L.* (DC) Benth. El proceso termoalcalino aumentó el contenido de cenizas y extracto etéreo, en tanto que el

porcentaje de proteína y fibra cruda disminuyeron. El contenido de cenizas se debe a que las harinas son integrales y al aumento de la concentración de óxido de calcio (Fernández *et al.*, 2004). Mariscal *et al.* (2015), mencionan que el proceso termoalcalino disminuye la fibra dietética total, así mismo Paredes *et al.* (2009) reporta que los lípidos disminuyen y que esto se puede deber a la pérdida del pericarpio, del pedicelo o probablemente del germen, en donde se localiza la mayoría de los lípidos del grano de maíz.

**Cuadro 10. Análisis proximal de la harina obtenida de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino y sin proceso termoalcalino.**

Harina	Humedad (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	Extracto etéreo (%)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)
cPT*	6.16±0.07 <sup>b</sup> <sub>z</sub>	17.72±0.12 <sup>a</sup>	22.65±1.15 <sup>b</sup>	6.34±0.03 <sup>a</sup>	31.59±0.57 <sup>b</sup>	21.7
sPT#	8.26±0.12 <sup>a</sup>	5.23±0.12 <sup>b</sup>	26.61±0.89 <sup>a</sup>	3.70±0.15 <sup>b</sup>	33.27±0.09 <sup>a</sup>	31.19

<sup>z</sup>Las muestras con diferente letra son estadísticamente diferentes (P≤0.05).

± desviación estándar

\*Harina de semillas secas con proceso termoalcalino (cPT)

#Harina de semillas secas sin proceso termoalcalino (sPT)

#### 4.3.5 Determinación de minerales

El contenido de minerales de la harina desarrollada a partir de los puntos óptimos del proceso termoalcalino presentaron porcentajes numéricamente mayores a los reportados por Román *et al.* (2014), a excepción del sodio.

El calcio fue el mineral que se encontró en mayor concentración (1003 mg 100 g<sup>-1</sup>) y representa un 85 % más que el encontrado en las sPT, este resultado es debido al uso del óxido de calcio y su efecto en la cocción y tiempo de reposo de las semillas.

El proceso termoalcalino de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth favoreció al aumento de la cantidad de algunos minerales como el potasio (750 mg 100 g<sup>-1</sup>), azufre (540 mg 100 g<sup>-1</sup>), fósforo (420 mg 100 g<sup>-1</sup>), magnesio (200 mg 100 g<sup>-1</sup>), zinc (4.7 mg 100 g<sup>-1</sup>) y hierro (3.8 mg 100 g<sup>-1</sup>).

#### 4.3.6 Determinación de ácidos grasos

En las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT se identificaron diferentes ácidos grasos, el ácido linoleico que fue el más abundante con 35.80 %, el oleico con 25.83 %, el palmítico con 23.39 %, el esteárico con 5.11 % y los behénico y araquídico con 3.87 % y 3.30 %, respectivamente. Estos resultados son congruentes con los presentados por Imededdine *et al.* (2014) en la distribución de los ácidos grasos (Cuadro 11).

Los ácidos grasos no saturados oleico y linoleico son los más abundantes en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT. Los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico son relativamente bajos.

En general, el contenido de los ácidos grasos de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT fue menor al de la harina de semillas secas de la *L. leucocephala*, reportado por Imededdine *et al.* (2014), a excepción de los ácidos palmítico y oleico. Es probable que esto se deba a diversos factores, es decir, que son de diferentes especies y al proceso termoalcalino al que fueron sometidas las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, para desarrollar la harina.

Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos del aceite de la harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino extraído por el método Soxhlet (%).

	<b>Ácidos grasos</b>	<b>(%)</b>
Palmítico	C16:0	23.39
Esteárico	C18:0	5.11
Oleico	C18:1 $\omega$ 9	25.83
Linoleico	C18:2 $\omega$ 6	35.80
Araquídico	C20:0	3.30
Behénico	C22:0	3.88

#### 4.3.7 Determinación de antioxidantes

El Cuadro 12 muestra las diferencias de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* cPT y las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, se observa que hay un decremento en todos los antioxidantes analizados. Sin embargo, los

tratamientos mostraron efecto significativo en los fenoles y el ABTS. El proceso termoalcalino alcanzó temperaturas superiores a los 90 °C, es probable que a esta temperatura los antioxidantes sean afectados como menciona Giusti y Wrolstad (2001), los compuestos fenólicos, son sensibles al efecto de las condiciones ambientales durante el procesamiento. La aplicación de alta temperatura o presión pueden conducir a su degradación o modificación de su actividad biológica.

Cuadro 12. Propiedades antioxidantes de harina semillas de *L. esculenta* (DC) Benth antes y después del proceso termoalcalino.

Harina	Fenoles (mg EAG g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mg EC g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg ET g <sup>-1</sup> )	ABTS (mg ET g <sup>-1</sup> )
Harina cPT*	3.69b±0.52b <sup>z</sup>	0.38±0.05a	0.63±0.07a	13.85±2.0b
Harina sPT#	5.86±0.74a	0.46±0.03a	0.66±0.14a	28.34±2.20a

<sup>z</sup>Las muestras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, P≤0.05).  
± desviación estándar.

\*Harina de semillas secas con proceso termoalcalino (cPT).

#Harina de semillas secas sin proceso termoalcalino (sPT).

La pérdida de nutrientes responsables de las propiedades funcionales de los alimentos vegetales se vuelve más significativa a medida que los alimentos se procesan, almacenan y transportan (Hogervorst *et al.*, 2018).

#### 4.3.8 Determinación de mimosina

La cantidad de mimosina en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT (0.167±0.005a) y cPT (0.154±0.021a), no presentaron diferencias significativas, sin embargo, Xuan *et al.*, 2006, menciona que la cantidad de mimosina en las semillas maduras de *L. leucocephala* originarias de Ryukyus y de la región de Okinawa es de 2.38 %.

#### 4.3.9 Ensayos de citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

La evaluación de la toxicidad de la fracción proteica de las harinas de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT y cPT en PBMCs se vuelve obligatoria,

principalmente por la presencia de mimosina, sustancia tóxica, en las harinas de semillas *L. esculenta* (DC) Benth.

La evaluación de la citotoxicidad en PBMCs se determinó para la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT y cPT, tras 24 y 72 horas de incubación. En este estudio sólo se analizaron los extractos proteicos obtenidos por el método descrito (Johnson *et al.*, 2015), donde se obtuvieron rendimientos más altos y el extracto obtenido podría contener la mayor cantidad de las diversas fracciones proteicas (globulinas, prolaminas, glutelinas y albuminas).

El valor promedio de absorbancia de las células puras fue de  $0.3844 \pm 5.98$  que corresponde al 100 % de viabilidad (control negativo) con este dato y las medias de las absorbancias de las células tratadas con las diferentes concentraciones para la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT y cPT, se calculó el porcentaje de viabilidad. Los ensayos se realizaron con seis repeticiones.

La Figura 6 reporta el comportamiento de las células con el extracto de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT y la Figura 7 muestra el comportamiento de las células tratadas con el extracto de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT. Las células puras o control negativo tienen 100 % de viabilidad, después de 24 (a) y 72 (b) horas de incubación. El paclitaxel se usó como control positivo, este indujo una reducción de la viabilidad celular a las 72 h entre el 10 y el 20 %. La evaluación del extracto proteico de las harinas de *L. esculenta* (DC) Benth (sPT y cPT) se realizó con concentraciones altas de proteína. Investigaciones de la ingestión de la *L. leucocephala*, han encontrado actividad citotóxica en las especies no rumiantes, incluidos los seres humanos, cuando la *L. leucocephala*, supera el 5-10 % de la dieta (Sethi & Kulkarmi, 1995; Shelton & Brewbaker, 1994).

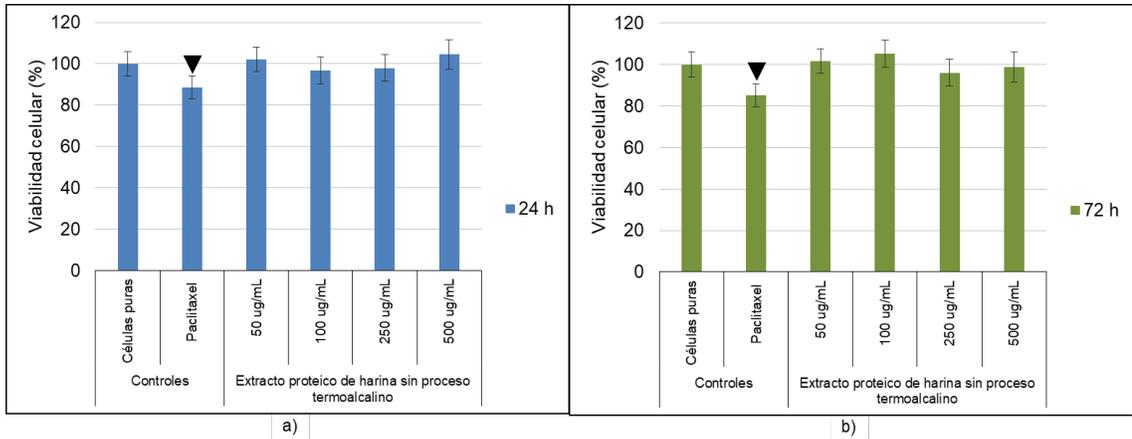


Figura 6. Citotoxicidad del extracto proteico de la harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sin proceso termoalcalino a) 24 h y b) 72 h de incubación. Por cada grupo n = 6, el signo (▼) indica que son estadísticamente diferentes de los controles (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

A pesar que las concentraciones de proteínas evaluadas en este estudio son altas, no se encontró actividad citotóxica para el extracto proteico de *L. esculenta* (DC) Benth, ni para el extracto obtenido a partir de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* con proceso termoalcalino de *L. esculenta*.

Los resultados sugieren que el consumo de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT y sPT puede ser seguro para el humano, al no afectar la viabilidad de las células del sistema inmune. Estos estudios se consideran aproximaciones ya que se deben complementar con evaluaciones *in vivo* para evaluar posibles afectaciones a nivel hepático y renal, en el sistema nervioso central y a otros órganos afectados por la mimosina (Crawford *et al.*, 2015).

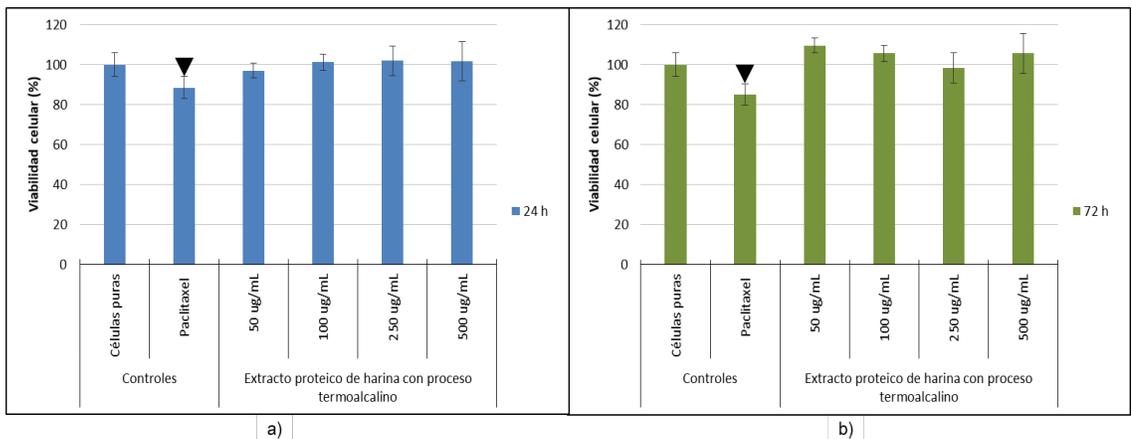


Figura 7. Citotoxicidad del extracto proteico de la harina semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sin proceso termoalcalino 24 h y b) 72 h de incubación. Por cada grupo n = 6, el signo (▼) indica que son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

#### 4.3.10 Electroforesis

El Cuadro 13 muestra las extracciones con NaOH 0.1 M pH 9 de las proteínas de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sin proceso termoalcalino (49 %) y con proceso termoalcalino (46 %), la determinación de la proteína por el método Bradford presentó cantidades superiores en comparación con los obtenidos por el método Kjeldahl (harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth de cPT (31.59 %) y sPT (33.27 %)). El método analítico que se debe elegir para la cuantificación va ser de acuerdo al propósito de estudio, algunos métodos se valen del color que presentan las moléculas de las proteínas cuando reaccionan con reactivos específicos; cada procedimiento tiene su particularidad, y el mejor podrá ser determinado dependiendo de las concentraciones de las proteínas en las muestras (García y Vásquez, 1998).

Los métodos espectrofotométricos de determinación de proteínas a menudo se ven afectados por sustancias que interfieren y, por lo tanto, podrían sobrestimar el contenido de proteínas. La extracción de proteínas a menudo incluye productos químicos que afectan tanto al rendimiento de la extracción como a la determinación posterior (Hanne *et al.*, 2018).

Cuadro 13. Extracción de proteínas de la harina sin proceso termoalcalino y harina con proceso termoalcalino de las semillas secas *L. esculenta* (DC) Benth por el método de Bradford

Extracción	Harina sin proceso termoalcalino	Harina con proceso termoalcalino
Primera	103.12	78.4
Segunda	14.21	18.82
Tercera	6.27	18.16
Total	123.6 (49 % m/m)	115.82 (46 % m/m)

Los valores se expresan en mg/250 mg.

Las proteínas de los extractos proteicos se clasificaron según el método de Osborne *et al.*, 1914, es decir, en albuminas, globulinas, glutelinas y prolaminas. Las fracciones proteicas más abundantes fueron las glutelinas, para ambas

harinas de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino y sin proceso termoalcalino.

La harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT presentó en su mayoría valores numéricos superiores de fracciones proteicas, con respecto a la harina sPT, a excepción de las globulinas, debido al proceso termoalcalino. Según Paredes *et al.*, (2009), en el maíz, las prolaminas se encuentran principalmente en el endospermo, mientras que las glutelinas se encuentran en la matriz proteínica de esa misma estructura; ambas constituyen cerca de 90 % de las proteínas del grano completo. Por el contrario, las del germen son casi en su totalidad albúminas y globulinas.

El germen contiene la mayor cantidad de aceite y proteínas hidrosolubles de la semilla; mientras que el endospermo está compuesto principalmente por almidón y proteínas liposolubles (Aspelund y Glatz, 2010).

En la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT las proteínas más abundantes son las glutelinas y prolaminas que representan el 58.24 %, debido a que la solución alcalina degradó y solubilizó los componentes de la pared celular, eliminó el pericarpio y ablandó la estructura del endospermo y es ahí donde se encuentra el mayor porcentaje (90 %) de la proteína del grano, donde se encuentran las prolaminas y las glutelinas que se localizan específicamente en la matriz proteínica (Paredes *et al.*, 2009).

Las albuminas y globulinas representan el 41.76 % en la harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT y para la harina de *L. esculenta* (DC) Benth sPT el 50.44 %, esto se debe principalmente a que la mayor parte del germen permanece en el grano durante el proceso termoalcalino garantizando que la calidad proteica de la harina no se afecte. Es probable que el incremento de las glutelinas fue por el uso del NaOH<sub>2</sub> durante la cocción alcalina (altera la estructura y la solubilidad de las proteínas), lo que facilitó la solubilidad de ellas durante el proceso termoalcalino (Paredes *et al.*, 2009).

Las proteínas de origen vegetal presentan ciertas ventajas en comparación con aquellas de origen animal, por ejemplo, el bajo costo de producción, se pueden almacenar durante periodos largos y son fáciles de manejar y transportar (Sandoval y Paredes, 2012). Las proteínas de reserva se clasifican en Albuminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas (Espitia *et al.*, 2016).

### **Fracciones proteicas de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sin proceso termoalcalino y con proceso termoalcalino**

La Figura 8 reporta la composición de los extractos proteicos obtenidos en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT y cPT por el método de Osborne es similar, al observarse en ambas bandas correspondientes a 55, 45, 38 y 36 kDa.

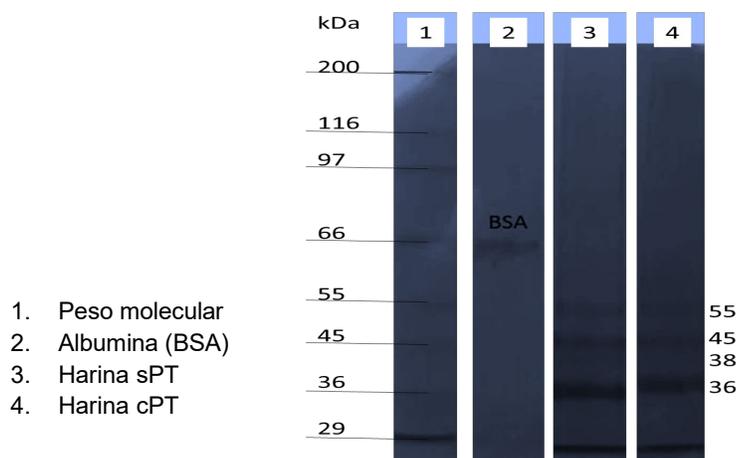


Figura 8. Perfil electroforético de las fracciones proteicas de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth. Carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA) con un peso molecular de 66.430 kDa como control, carril 3) Muestra del extracto proteico de la harina sPT y en el carril 4) Muestra del extracto proteico de la harina cPT.

La Figura 9 muestra que las glutelinas presentan la fracción proteica más abundante en la harina sPT y la harina cPT de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth, sin embargo, la harina cPT fue superior en comparación a la harina sPT, esto se debe principalmente porque son solubles en soluciones alcalinas, es decir, el proceso termoalcalino altera la estructura y la solubilidad de las proteínas (Paredes *et al.*, 2009).

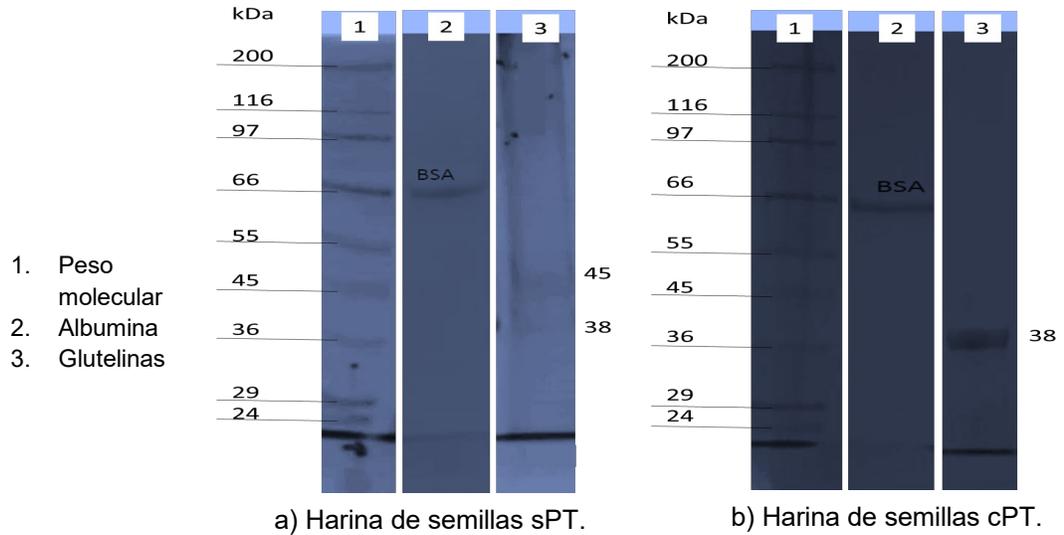


Figura 9. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Glutelinas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Glutelinas.

La Figura 10 reporta que las globulinas para el caso de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT presentaron bandas de 55, 45, 36 kDa y para el caso de las globulinas de la harina de las semillas de *L. esculenta* DC) Benth cPT presentaron bandas a 55, 47, 45 y 36 kDa.

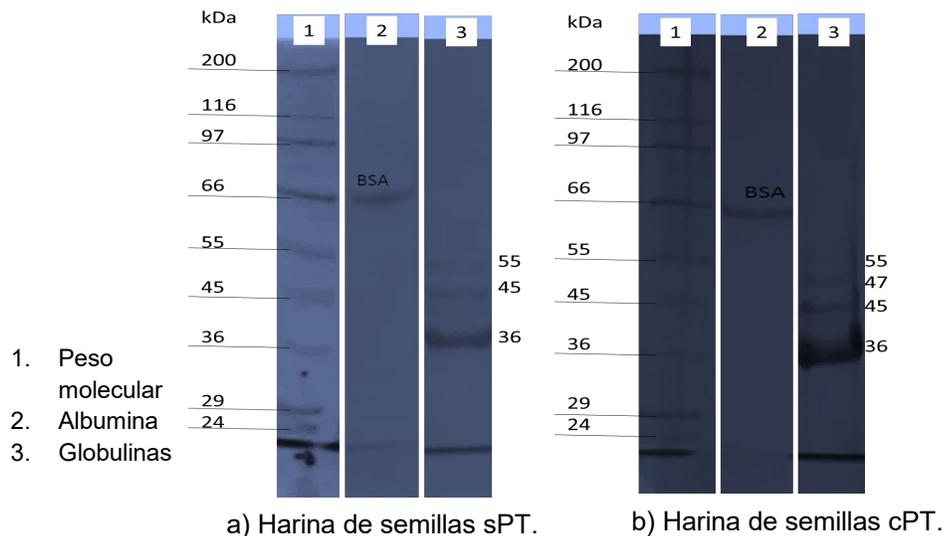


Figura 10. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Globulinas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Globulinas.

La Figura 11 indica que las proteínas se presentan más conservadas en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, esto podría explicarse por que las albúminas incrementaron su disponibilidad. El proceso termoalcalino facilita la solubilidad de las proteínas debido a que las albúminas son solubles en agua, sin embargo, es probable que la aleurona impidió la pérdida de nutrientes hacia el agua residual por el fenómeno llamado lixiviación (Paredes *et al.*, 2009), lo que concuerda con los resultados de cuantificación de este grupo de proteínas en ambas harinas, que fue el mayor en la harina de semillas con proceso termoalcalino.

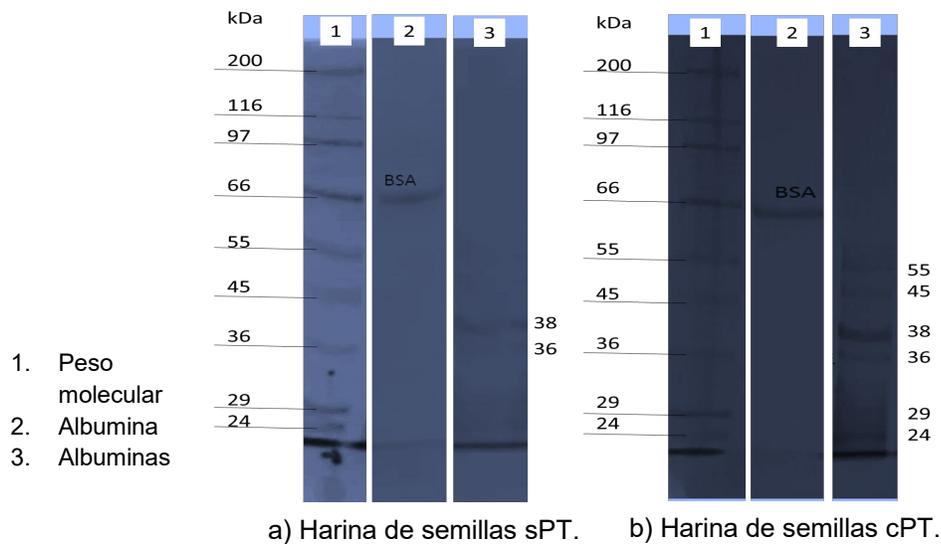


Figura 11. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Albúminas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Albúminas.

La Figura 12 ilustra que el contenido de prolaminas que en los dos tipos de harina es bajo en comparación con las otras proteínas, por tal motivo en el caso de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT no se presentaron y para las prolaminas de la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT solo se identificó una banda a 36 kDa.

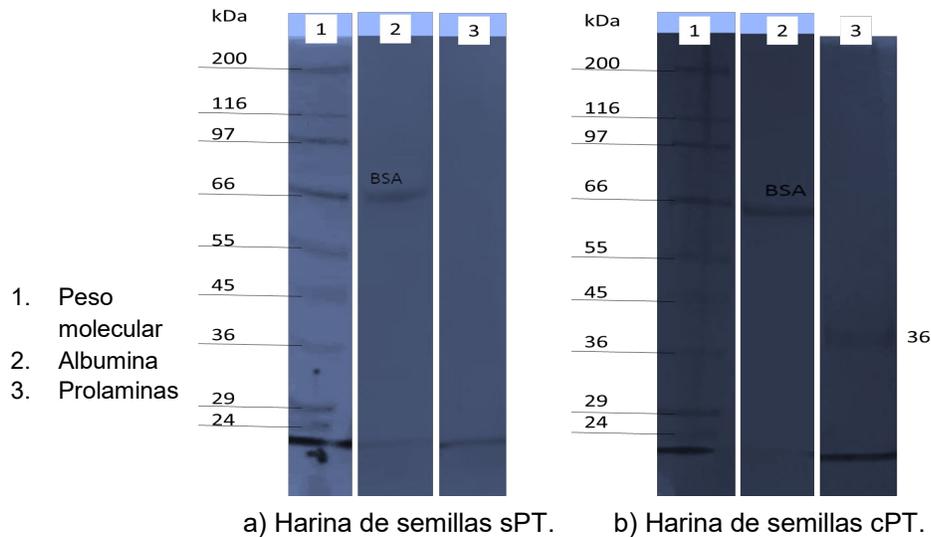


Figura 12. Electroforesis de fracciones proteicas extraídas por el método de Osborne. a) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth sPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Prolaminas. b) Muestra del extracto proteico de la harina de semillas de *L. esculenta* (DC) Benth cPT, carril 1) Marcador del peso molecular, carril 2) Albúmina (BSA), carril 3) Prolaminas.

#### 4.4 Conclusiones

Las condiciones de optimización del proceso termoalcalino de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth fueron determinadas por el método San Cristóbal, en función a los factores: óxido de calcio, tiempo de cocción y tiempo de reposo, y como respuestas la proteína y el calcio. En cada respuesta se estimaron los puntos críticos. Se seleccionó el punto óptimo obtenido con la respuesta calcio: 1.3 g de óxido de calcio, 42 minutos de tiempo de cocción y 8 horas de reposo. Las condiciones óptimas del proceso termoalcalino influyeron positivamente sobre el contenido de calcio y proteína en la harina.

#### 4.5 Literatura citada

- Aparicio, F. X. y Espinosa, A. L. G. (2016). Leguminosas Alimentos nutritivos y funcionales para la salud. Ciencia y Desarrollo. CONACYT, 42(286). Recuperado el 04 de noviembre de 2019, de <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=198>
- Aspelund, M. T. y Glatz, C. E. (2010). Purification of recombinant plant-made proteins from corn extracts by ultrafiltration. Journal of Membrane Science, 353, 103-110.
- Astiasaran, A. y Martínez, A. (2000). Alimentos: Composición y Propiedades. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid. 155 p.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem*, 72, 248-252.
- Brunelle, J. L. y Green, R. (2014). Chapter Twelve One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*. Elsevier. 541, 151-159.
- Buendía, G. M. O. (2010). Manual de prácticas de tecnología de cereales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo Estado de México.
- Castillo, V. K. C., Ochoa, M. L. A., Figueroa, C. J. D., Delgado, L. E., Gallegos, I. J. A., Morales C.J (2009). Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*Zea mays* L) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(4), 425-432. Recuperado en 21 de agosto de 2019, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222009000400011&lng=es&tlng=esInstituto](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222009000400011&lng=es&tlng=esInstituto).
- Contreras, C. J., Calderón, J. L., Guerra, H. E., & García, V. B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food research international*, 44:(7), 2047-2053.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Crawford, G., Puschner, B., Affolter, V., Stalis, I., Davidson, A., Baker, T., Tahara, J., Jolly, A. and Ostapak, S. (2015). Systemic Effects of *Leucaena leucocephala* Ingestion on Ringtailed Lemurs (*Lemur catta*) at Berenty Reserve, Madagascar. *American Journal of Primatology*, 77, 633-641.
- Egan H., Kirk R. S., Sawyer R. (2006). Composición y análisis de alimentos de Pearson. Ed. CECSA. 777 p.
- Espitia, O. F.J., Negrete, T. A.G., Ordoñez, A. L.G., León, G. M. F. (2016). Caracterización de las proteínas de reserva de la semilla de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 147-152.
- Figueroa, C. J. D., Narváez, G. D. E., Sánchez, A. M., Taba, S. M., Gaytán, M. J.J., V, M., Rincón, S. F., y Aragón, C. F. (2013). Propiedades físicas del grano y calidad de los grupos radicales de maíces nativos (criollos) de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 3-A:305314.
- Fernández, M. J. L., Molina, I. R., Dávalos, L. G., Leal M., Valtierra, E. S., Martínez E. M. and Rodríguez, M. E. (2004). Study of calcium on components of maite kernels during tradicional nixtamalization process *American Association of Cereal Chemists*, 81, 65-69.

- Galicia, G. C. F. (2009). Efecto de fecha de siembra sobre la calidad comercial del grano de maíz y sus tortillas. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.
- García, H. y Vázquez, R. (1998). Cuantificación de proteínas: Una revisión. *BioTecnología*, (3), 77-88.
- García, M. G. y Sandoval, D. A. (2011). Optimización de la nixtamalización de avena (*Avena sativa* L) para obtener harina de avena nixtamalizada (HAVN) y su aplicación en pastas alimenticias. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.
- García, M. J., Bustamante, G. A., Vargas, L. S., Guerrero, R. J. D., Olvera, H. I. (2004). Organización territorial y distribución de la tierra en la comunidad de San Felipe Otlaltepec, Puebla, México. *Revista de Investigación de la Universidad De la Salle Bajío. NovaScientia*.
- Giusti, M. y Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, 2.1-2.13.
- Hanne, K. M., Lars, D., Guro, K. E., Edel, O. E., and Ida-Johanne, J. (2018). Protein Determination-Method Matters. *Journal Foods*, (7), 2-11. doi: 10.3390/foods7010005.
- Henneberg, W., Stohmann, F. (1867). Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Widerkauer. Braunschweig, Germany [In German]. Vol 1.
- Hernández, H. F. de Jesús., Buendía, G. M. O. y López, H. A. de Jesús. (2016). Determinación de la dureza de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) por un método experimental de molienda integral. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 8(2), 61-69. doi: 10.5154/r.inagbi.2016.10.005.
- Hogervorst, C. J., Atanackovic, M., Krstonosic, M., Mira, B. M., Miljic, U. (2018). Chapter 7. Polyphenols, En *Nutraceutical and Functional Food Components*. En: Galanakis, C. M. Ed. *Nutraceutical and Functional Food Components*. Academic Press. 203-258 p.
- Imededdine, A. N., Hassen, S., Chin, P. T., Saud, I. A. (2014). *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit seed oil: Characterization and uses. *Industrial Crops and Products*, 52, 582-587.
- Johnston, S. P., Nickerson, M. T., Low, N. H. (2015). The physicochemical properties of legume protein isolates and their ability to stabilize oil-in-water emulsions with and without genipin. *J. Food Sci Technol*, 52(7), 4135-4145. doi: 10.1007/s13197-014-1523-3.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food chemistry*, 127(3), 1138-1145.

- López, Y. A., Guerra, R. D., Jácome, R. J., Espinosa, S. T., Reyes, T. B., Famiani, F., Cruz, C. J. G. (2018). Initial evaluation of fruit of accessions of *Persea schiedeana* Nees for nutritional value, quality and oil extraction. *Food Chemistry*, 245, 879-884.
- Mariscal, M. R. M., Figueroa, J. D. C., Santiago, R. D., Arambula, V. G., Jimenez, S. S., Rayas, D. P., J. J. Véles, M. J. J. y Martínez, F. H. E. (2015). The effect of different nixtamalisation processes on some physicochemical properties, nutritional composition and glycemic index. *Journal of Cereal Science*, 65, 140-146.
- Marroquin, A. L., Cuevas, S. J. A., Guerra, R. D., Reyes, L., Reyes, Ch. A., Reyes, T. B. (2011). Proximate composition, mineral nutrient and fatty acids of the seed of ilama, *Annona diversifolia* Saff. *Scientific Research and Essays*, 6(14),3089-3093. doi: 10.5897/SRE10.1159
- Martínez, A. O. y Martínez de Victoria, M.E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos. Universidad de Granada. 114 p.
- Martínez, G. A. (1998). Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría. Ed. Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 756 p.
- Meyer, M. D., & Terry, L. A. (2008). Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 7439-7445.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., y Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945-963.
- NMX-FF-034/1-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Cereales. Parte I: maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz y productos de maíz Nixtamalizado. Especificaciones y métodos de prueba.
- Osborne, T. B., & Mendel, L. B. (1914). Nutritive properties of proteins of maize Kernel. *The Journal of Biological Chemistry*, 18(1), 1-16.
- Paredes, L. O., Guevara, L. F. y Bello, P. L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencia. Universidad Nacional Autónoma de México*, 92-93, 60-70.
- Pourahmad, J. and Salimi, A. (2015). Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), 679-980.

- Ramos, P. I., Maya, O. K., Jiménez, M. C., Garduño, S. L., Dávila, O. G. (2007). Cambios en la composición química proximal y contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y carotenoides de maíz negro y blanco durante la nixtamalización. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, México, D.F.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rojas, B. A. (1979). Análisis estadístico del diseño San Cristóbal con tres factores. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. D. F. México. 17 p.
- Román, C. N., García, M. Ma. R., Castillo, G. A. Ma., Sahagún, C. J., Jiménez, A. A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp): Un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), 157-170.
- SAS Institute (2009) Base SAS® 9.4. Procedures Guide: Statistical Procedures. Second edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 550 p.
- Sandoval, O. M. R. y Paredes, L. O. (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 193-201.
- Sethi, P. & Kulkarni, P. R. (1995). *Leucaena leucocephala*: a nutrition profile. *Food and nutrition bulletin*. Tokyo: United Nations University Press. 16(3).
- Shelton, H. M. & Brewbaker, J. L. (1994). *Leucaena leucocephala*: the most widely used forage tree legume. *Forage tree legumes in tropical agriculture*. Wallingford: CAB International. 15-29 p.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., Agboola, S. O. (2011). Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals. *Food Research International*, 44, 1075-1082.
- Téllez, T. P. y Arellano, S. V. A. (2005). Optimización de nixtamalización de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y desarrollo de un nuevo producto alimenticio. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México.
- Trejo, G. A., Rria, M. A. and Wild, A. C. (1982). The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla production. 245-263 p.
- Xuan, T.D., Elzaawely, A.A., Deba, F., Fukuta, M., Tawata, S. (2006). Mimosine in *Leucaena* as a potent bio-herbicide. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 26(2), 89-97 p.

Zul, I., Hanisjasyamah, H., Nurul, A. R., Norfadhilah, R., y Normaniza, O. (2015). Extraction and Quantification of Toxic Compound Mimosine from *Leucaena leucocephala* Leaves. *Procedia Chemistry*, 16(12), 164-70.

## CONCLUSIONES GENERALES

El peso hectolítrico de semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth fue de 78.09 kg hL<sup>-1</sup>, valor dentro del rango de calidad establecido, para esta variable. La dureza de las semillas correspondió a extremadamente duro. La cantidad de proteína de la semilla seca fue de 33.36 %, de fibra cruda de 18.92 % y de calcio fue de 3.57 mg g<sup>-1</sup>.

Se desarrolló una harina de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth a partir de los puntos óptimos obtenidos con el diseño San Cristóbal del proceso termoalcalino, donde se tienen los mayores contenidos de calcio.

Se localizó el punto óptimo del proceso termoalcalino de las semillas secas de *Leucaena esculenta* (DC) Benth: óxido de calcio 1.3 g, tiempo de cocción 42 min y tiempo de reposo 8 h.

El calcio incrementó en un 85.05 % en la harina de semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino. Se identificaron los ácidos grasos linoleico (35.80 %), oleico (25.83 %), palmítico (23.39 %). En la harina de semillas secas con proceso termoalcalino, el contenido fenólico total se perdió en un 31 %, mientras que la capacidad antioxidante determinada por el ensayo ABTS se redujo en un 51 %. La mimosina en la harina de semillas sin proceso y la harina de semillas con proceso termoalcalino fue significativamente igual y no se encontró actividad citotóxica para el extracto proteico de *L. esculenta* (DC) Benth, ni para el extracto obtenido a partir de la harina de semillas secas con proceso termoalcalino.

Las fracciones proteicas mayoritarias en la harina de las semillas secas de *L. esculenta* (DC) Benth con proceso termoalcalino fueron las glutelinas (56.40 %).