

A DE LEÓN ZURIGA

Preparación y Evaluación Química y Biológica de Algunas Proteínas de Origen Foliar



GUATEMALA, C. A.

DESCARTE

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
REPUBLICA DE GUATEMALA

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Preparación y Evaluación Química y Biológica
de Algunas Proteínas de Origen Foliar

TESIS

PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD
DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

HILDA DE LEON ZUÑIGA

EN EL ACTO DE SU INVESTIDURA DE
QUIMICO FARMACEUTICO

Guatemala, Noviembre de 1966.

DESCARTE

DL
06
T(610)OF

JUNTA DIRECTIVA
DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decano	Lic. Rafael Letona Romero
Vocal 1º	Dr. J. Arturo Mendizábal
Vocal 2º	Dr. Augusto Bauer A.
Vocal 3º	Lic. Mario Dary R.
Vocal 4º	Br. Roque Rosito
Vocal 5º	Br. Juan Francisco Archila B.
Secretario	Ing. Ricardo Díaz Duque

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN
GENERAL PRIVADO

Decano Suplente	Ing. Carlos Enrique Molina
Vocal de la Junta Directiva	Lic. Rafael Quintana
Examinador	Lic. Rafael Letona Romero
Examinador	Dr. José Méndez de la Vega
Secretario	Lic. Rubén Mayorga

DEDICO ESTE ACTO

A MIS PADRES:

**Dr. Gilberto de León León
Carmen Zúñiga de de León**

A MI ABUELITO:

Gral. Nicolás de León López

A MIS HERMANOS:

Isabel, Nicolás, Gilberto y Carmelita

A LA FAMILIA:

Adams

AL INGENIERO:

José Joaquín Pardo Rosales

A LA SEÑORITA:

Adilia Leticia Barrios

A MIS MAESTROS:

Dr. Ricardo Bressani
Dr. Edgar Braham
Lic. Julio Valladares Márquez
Lic. Sara B. de Monzón
Ing. Jorge Meany
Prof. Joaquín Quiroa
Srita. Ester Domínguez
Revda. Engracia Nájera Leiva
Srita. Beatriz Montalvo
Prof. Marco Tulio Barrios

A MIS COMPAÑEROS:

Carlos Solís
Mercedes Montúfar de Sánchez
Ludmila Cobián
Lucinda Camey
José Israel Santizo
Vilma Oliva de Vargas
Rolando Avila
Carlos Beck

A MIS AMIGOS:

Alfredo Conde
María Laura Mejicanos
Carlos González
Carmen Bolaños
Margoth Rodas Ralón

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR:

Tengo la honra de presentar a vuestra consideración, después de una larga lucha y muchos sacrificios, este Trabajo de Tesis que, abrigo la esperanza, ha de iniciar una serie de investigaciones al respecto.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Este trabajo se llevó a cabo en la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), con la asesoría del Dr. J. Edgar Braham, Jefe Asistente de dicha División.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

PLAN DE TESIS

	Pág. No.
I. INTRODUCCION	15
II. REVISION DE LA LITERATURA	19
III. MATERIALES Y METODOS	31
A. Hojas	31
B. Recolección de las Hojas	31
C. Preparación de las Hojas	32
D. Extracción de Compuestos Nitrogenados	32
E. Precipitación de Proteínas	33
F. Preparación de Proteína Foliar para Ensayos Biológicos	34
G. Preparación de Harinas de Hojas para Estudio de su Valor Nutritivo	35
H. Estudio de Aminoácidos	36
I. Ensayos Biológicos	36
IV. RESULTADOS	39
A. Composición Química	39
B. Extracción	39
C. Ensayos Biológicos	41
V. DISCUSION	45
VI. RESUMEN	53
VII. RECONOCIMIENTOS	55
VIII. REFERENCIAS	57

I. INTRODUCCION

En la selección de cultivos con fines alimenticios, el hombre siempre se ha visto obligado a depender de la capacidad de las plantas de concentrar, en determinado órgano, ya sea éste tallo, raíz, fruto o semilla, compuestos químicos que la planta sintetiza a partir de elementos simples del aire y del suelo, catalizada por la energía solar en el transcurso de su proceso vital ^(31, 32). Paralelo al desarrollo de cultivos, el hombre ha creado procedimientos tecnológicos capaces de transformar los productos agrícolas en alimentos que puedan ser ingeridos directamente o que sirvan para la nutrición de animales domésticos, cuyos productos emplea el hombre para su propio consumo.

Las actividades agropecuarias desarrolladas en el transcurso de los años parecen suficientes, por ahora, para satisfacer los requerimientos de la humanidad en cuanto a carbohidratos, lípidos, vitaminas y aún, proteínas. Sin embargo, la población mundial está creciendo a una velocidad sumamente alta en comparación con el aumento de la producción agropecuaria, y ello ha tenido como resultado una menor disponibilidad y consumo de alimentos y, por consiguiente, de nutrientes por persona. Se deduce así la necesidad urgente de poder producir más por unidad de área, y de lograr también la utilización más eficiente de todos los recursos que la naturaleza ofrece. Una de las posibles soluciones a este problema es la de reducir el tiempo de transformación de los alimentos, aumentando en esta forma, en términos cuantitativos, la disponibilidad, para el hombre, de ciertos nu-

trientes, por ejemplo, las proteínas. Sin duda alguna, es más eficiente la utilización directa de las proteínas de una semilla o de una hoja, por el hombre, que el usar esta proteína primero para alimentar al animal y luego consumir el producto resultante, ya sea éste leche, carne o huevos.

Esta solución al problema que plantea la disponibilidad de alimentos para el hombre ha recibido gran atención, principalmente durante los últimos años, ya que la utilización de ciertos productos sobre bases científicas, puede rendir resultados muy favorables. Tal es el caso de la proteína de la semilla de algodón, del frijol de soya y de otros productos, los cuales hoy día ya se usan como alimento humano cuando hace apenas unos cuantos años se empleaban sólo para la alimentación de animales.

Si se tiene en cuenta que el origen primario de cualquier alimento es alguna planta, es lógico que se estudien constantemente nuevos medios de incrementar el rendimiento de los cultivos o de hacer accesibles al consumo humano y de animales monogástricos —por medio de una transformación adecuada— productos agrícolas que de otro modo no se utilizan o se usan en forma poco eficiente. Ello ha tenido como resultado el desarrollo de tecnologías modernas y apropiadas de procesamiento de productos y subproductos agrícolas, haciéndolos aptos para el consumo de animales de crianza.

Lo que es más grave aún, la deficiencia de concentrados proteicos adecuados para consumo animal se refleja en lo que respecta al humano. En este caso el problema es todavía más complejo, ya que con la tasa de natalidad que actualmente existe en el mundo, sobre todo en los países en vías de desarrollo como lo son los del área centroamericana, las fuentes proteicas vegetales y animales pronto serán insuficientes para satisfacer los requerimientos de estas poblaciones. Es necesario, por lo tanto, estudiar e investigar nuevas fuentes de proteína adecuadas para consumo humano que en un momento dado puedan, si no cubrir del todo esos requerimientos, por lo menos servir como suplemento de

dietas deficientes en su contenido proteico. En este renglón la tecnología de alimentos desempeña un papel muy importante en la obtención, purificación, transformación y estandarización de las posibles fuentes de proteínas.

Las hojas ofrecen muchas posibilidades. En primer lugar contienen cantidades de proteína que, en base seca, son semejantes o superiores a la de los cereales en cuanto a cantidad, y en segundo lugar, muchas ya son consumidas por el hombre en cantidades que dependen principalmente de la concentración de fibra presente en la hoja. Además, existen muchas hojas que son buena fuente de proteína pero que no se utilizan con fines alimenticios ni en el caso de los animales ni en el caso del hombre. Finalmente, en los países tropicales y semitropicales las hojas constituyen una fuente proteica potencial y constante, dado que las condiciones ambientales permiten la fotosíntesis diariamente.⁽²⁸⁾

El propósito de este trabajo fue iniciar una serie de estudios de extracción de la proteína de varias hojas, en algunos casos de consumo humano, con el fin de estudiar dicha proteína química y biológicamente, y determinar la posibilidad de utilizarla con mayor eficiencia en la nutrición, ya sea directamente, o como suplemento a las dietas o raciones habituales del hombre o del animal.

II. REVISION DE LA LITERATURA

Las plantas están constituidas por compuestos químicos que se sintetizan constantemente en las hojas, a partir de agua, sales minerales y dióxido de carbono, usando la energía radiante de la luz solar. Estos compuestos, una vez sintetizados, se translocan a los lugares de la planta donde serán utilizados o almacenados.

Las proteínas foliares han sido clasificadas en nucleares, cloroplasmáticas y citoplasmáticas, según el lugar que ocupan dentro de la célula vegetal.⁽²⁾ Esta clasificación se deriva de los métodos usados para separar las proteínas celulares, los cuales siguen, en principio, el esquema de extracción de los compuestos intracelulares, es decir, rompiendo la membrana celular, ya sea por acción mecánica, en molinos de alta velocidad o por cambios de la presión osmótica, haciendo el líquido externo hipotónico, de modo que la célula se hincha y rompe así la membrana celular. Este mismo efecto se logra por congelación y descongelación repetidas, puesto que la formación de cristales de hielo deja dentro de la célula porciones de líquido con una concentración de sales mucho más alta, haciéndolo entonces hipertónico y produciendo el mismo resultado de hinchar y romper la célula, ayudado por las lesiones que ocasionan los cristales de hielo que se forman a ambos lados de la pared celular.⁽¹⁶⁾

La pulpa obtenida por cualquiera de estos procedimientos se separa en sus constituyentes líquidos y sólidos. El sólido contiene los residuos fibrosos de las células de soporte, así como las proteínas insolubles. La extracción de estas

últimas requiere el uso de reactivos específicos, de acción más severa que, como resultado de la degradación de la proteína original, producen soluciones proteicas de bajo peso molecular.

El filtrado, en cambio, contiene la proteína citoplasmática, cloroplasmática y nuclear, fracciones que es factible separar por centrifugación, obteniéndose un precipitado que contiene el material cloroplasmático. Las proteínas nucleares se encuentran en una proporción muy baja, prácticamente despreciable en comparación con las otras.

En los cloroplastos se localizan los compuestos encargados de la fotosíntesis, clorofila y enzimas, así como pequeñas cantidades de grasa y almidón, sobre todo después de períodos de fotosíntesis intensa. La proteína cloroplasmática es muy insoluble en agua libre de sales y para solubilizarla se necesita la acción de soluciones alcalinas que la separen de la clorofila, y de solventes que extraigan tanto esta última como la grasa, quedando los carbohidratos en la fracción insoluble. Se ha podido comprobar que la composición de aminoácidos de la proteína citoplasmática es muy similar en diversas especies de plantas.⁽²⁾

Todos los extractos proteicos presentan muchas dificultades en su manipulación, ya que son susceptibles a la acción bacteriana y a cualquier cambio de las condiciones de temperatura, pH, concentración de sales y actividad enzimática, las cuales conducen a la degradación o desnaturalización. En muchos casos basta la agitación severa, irradiación ultravioleta, ondas ultrasónicas o aún el simple envejecimiento. Esta dificultad se enfrenta a todo lo largo de los procedimientos analíticos, e induce a la obtención de resultados al parecer erráticos pero que corresponden a situaciones y estructuras momentáneas en el proceso normal conducente hacia una condición estable.

Se ha encontrado que el nitrógeno de las hojas se distribuye en proteico y no proteico, en proporciones que varían según la especie y el estado de madurez.

Kulkarni y Sohoni⁽²⁰⁾ informaron de un estudio sobre la distribución del nitrógeno de algunos vegetales, presente en hojas, peciolo, flores, frutas y raíces, detallando el contenido de aminoácidos de la fracción no proteica. En lo que corresponde a las hojas, dichos autores indican que el nitrógeno presente corresponde a nitrógeno no proteico, en una proporción que varía entre 14% y 41% en base del nitrógeno total, para las especies vegetales investigadas (apio, coliflor, maíz, arveja, rábano y nabo).

Numerosos solventes han sido utilizados para extraer la proteína foliar. Chibnall,⁽¹¹⁾ por ejemplo, utilizó una mezcla de agua y éter con el objeto de ayudar a la proteína a liberarse de la clorofila y de la materia grasa. En cambio, Smith y colaboradores,⁽¹¹⁾ estudiaron la posibilidad de extraer proteínas foliares, usando como solventes digitonina, sales biliares y desoxicolato, el cual separa la clorofila de la proteína. Por otro lado, Smith y Pickels⁽¹¹⁾ intentaron la extracción de proteínas foliares empleando como solvente dodecil sulfato de sodio, compuesto que rompe la molécula proteica en pequeñas partes.

Byers,⁽⁴⁾ por su parte, preparó concentrados proteicos usando para el efecto varias plantas de Ghana, logrando establecer que las legumbres eran las mejores fuentes cuando se trataba de extraer un concentrado proteico de buena calidad. Además, obtuvo muy buenos resultados con algunas malezas de las más comunes. Ciertas especies de hojas contenían gran cantidad de mucílago o de fibra y fue muy difícil para dicho investigador, preparar un extracto adecuado de ellas por el método que él describe. Este consistió en preparar una pulpa de hojas y separar la parte sólida por filtración en tela; la proteína fue precipitada por medio de calor.

Festenstein⁽¹¹⁾ estudió también la extracción de proteína foliar usando varios solventes en escala de laboratorio, e informó que la extracción proteica se incrementa fácilmente bajo condiciones alcalinas, debido a la gran dispersión de cloroplastos producida, ya que éstos constituyen la proteína

insoluble.⁽²⁾ El estudio lo llevó a cabo en hojas de tabaco, utilizando como solventes, sacarosa 0.4 M; bicarbonato de sodio pH 7.2; bicarbonato de sodio pH 8.3, e hidróxido de magnesio 0.2 M. Las extracciones se verificaron en un macerador de alta velocidad, siendo la solución de bicarbonato pH 8.3 el solvente más efectivo para extraer las proteínas de las hojas estudiadas. El mismo autor observó que la extracción a 4°C no aumentaba el porcentaje de extracción de nitrógeno.

Boyant y Fowden⁽¹¹⁾ extrajeron el 90% de proteínas de hojas de narciso por un procedimiento de maceración, molienda y homogeneización a pH 9.

Otros investigadores, Zecker y colaboradores,⁽¹¹⁾ dieron cuenta de que la cantidad de proteínas solubles de hojas, desarrolladas bajo la luz solar, era mucho mayor que la de hojas que habían crecido a la sombra. Wilson y Tilley⁽³⁸⁾ en su estudio sobre concentrados proteicos de alfalfa y de varias gramas, notifican que el porcentaje de nitrógeno de las plantas utilizadas fluctuó entre 4.8 y 2.3 en el caso de la alfalfa, y de 3.1 a 2.1% para las gramas. El porcentaje de nitrógeno soluble en agua fue de 14 a 37, oscilando el contenido de nitrógeno en el concentrado proteico preparado, entre 7.1 y 13.1%.

Valli y colaboradores⁽³⁷⁾ en sus trabajos en hojas frescas de la India, encontraron que el contenido de nitrógeno y el porcentaje de nitrógeno proteico extraíble eran notoriamente variables, según la especie. En los concentrados proteicos aislados determinaron los porcentajes de proteína, que variaron de 34.2% a 77.4%. La metionina y lisina de esas proteínas osciló entre 1.3% y 2.2%, y de 3% a 4%, respectivamente. Para obtener la proteína los autores utilizaron una licuadora Waring a fin de destruir la estructura celular, y agua, como solvente extractor, hasta formar una pulpa. La parte sólida de ésta se separó por filtración en tela, y del extracto se precipitó la proteína agregando ácido clorhídrico 0.1 N muy despacio y con agitación constante hasta obtener un pH de 4.5. La proteína obtenida en esta forma se lavó

repetidas veces con agua para eliminar el ácido, y con acetona para eliminar pigmentos y grasa, secándose seguidamente en un horno al vacío durante 4 horas.

Chakravarty y Guha⁽⁶⁾ en la India, desarrollaron un proceso para la extracción de la proteína foliar, que comprende las siguientes operaciones. Las hojas son primero desintegradas en un molino de martillos y luego sometidas a extracción utilizando varios solventes capaces de extraer material proteico foliar como: agua, agua saturada de éter, soluciones acuosas de hidróxido de sodio y soluciones de bicarbonato de sodio. En este caso el solvente extractor se usó en relación de 1:3 en base al peso de hojas molidas; el tiempo de extracción fue de 30 minutos. La separación de las fibras se realizó por centrifugación a 500 r.p.m. y la precipitación del extracto proteico utilizando ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 3.8.

Estos autores estudiaron también la utilización que podría dársele a los subproductos. Teniendo en cuenta que el residuo fibroso contenía alrededor de 30% de proteína, decidieron emplearlo como alimentación para rumiantes. Asimismo, en vista de que el licor remanente de la precipitación era rico en aminoácidos, azúcares y minerales, los autores consideraron la posibilidad de usarlo como medio de fermentación.

Davys y Pirie^(7, 8) y Morrison y Pirie⁽²⁵⁾ han informado extensamente sobre sus trabajos, en escala piloto, señalando los problemas que pueden encontrarse en la preparación de concentrados proteicos.

Los informes de dichos investigadores describen maquinaria adecuada para hacer pulpa de hojas frescas y separar un jugo del que se obtiene el precipitado proteico. Además, tiene capacidad suficiente para procesar varias toneladas de hojas al día, extrayendo alrededor de la mitad o tres cuartos de la proteína foliar.⁽³⁰⁾

Las máquinas descritas por Davys y Pirie⁽⁷⁾ no son convenientes para efectuar buen contacto entre el material fibroso y cualquier reactivo líquido que se agregue para

mejorar la extracción, ya que están diseñadas para separar y recoger cualquier líquido contenido en la masa fibrosa sobre la que se está trabajando, y prácticamente nulifican así el tiempo de contacto. Esto constituye una desventaja, puesto que al trabajar hojas que tengan savia ácida de un pH cercano al punto isoelectrico de las proteínas, la extracción proteica es muy baja.

Los molinos de hojas, de gran capacidad, producen un jugo con fibras en suspensión y una masa de fibra húmeda que ha absorbido gran parte del jugo; esta fibra húmeda debe, pues, someterse a un proceso de exprimido, procedimiento para el cual se ha descrito una prensa continua, que comprime el material entre una faja y una polea perforada.⁽⁸⁾ Otra prensa usada con éxito es una de platina circular rotatoria, que funciona en un ciclo continuo de carga, prensa y descarga. El jugo obtenido del molino de hojas, por un lado, y del exprimidor, por el otro, se mezclan y se tamizan al grueso de 100 mallas; es más conveniente separar las fibras por tamizado o en una centrífuga decantadora continua, ya que si se intentara realizar una buena separación del líquido en el molino de hojas, sólo podría hacerse a costa de la velocidad de separación del jugo.

La proteína extraída, presente en el jugo de hojas, se separa por cualquiera de los sistemas de coagulación como son calentamiento, acidificación y envejecimiento, o bien por procedimientos en los que combinan estos tres métodos. Cada uno produce un precipitado de características diferentes; el calentamiento lo produce más denso y en grumos grandes, mientras que la acidificación y el envejecimiento rinden un precipitado gelatinoso de textura suave y de menor densidad.⁽²⁵⁾

El precipitado obtenido por acidificación es más puro, pero de muy difícil filtración, por lo que es necesario separarlo por centrifugación; en cambio, el obtenido por calentamiento es fácil de filtrar pero durante su formación ocluye o absorbe algunos compuestos que de otro modo permanecerían en el licor remanente. Este precipitado es más difícil

de purificar en vista de que los grumos son impermeables a los solventes de extracción de grasa y pigmentos.

Por razones económicas siempre es más ventajoso coagular la proteína por calentamiento, con el entendido que el pH del jugo sea menor de 6.⁽²⁵⁾ Sin embargo, si éste excede de 6, o si se han usado solventes alcalinos, es indispensable acidificar ajustando el pH al punto isoelectrico de las proteínas para efectuar la precipitación, y calentándolo después a la temperatura de 75 a 80°C para aglutinar el precipitado. Quedan todavía por determinar las condiciones y métodos que producen la precipitación más completa de un producto, de pureza conveniente y de una textura que permita fácil filtración, para cada variedad de planta y para cada proceso y condición económica.

La separación del precipitado proteico es un caso de filtración de un sólido amorfo gelatinoso; para efectuar esta operación, Morrison y Pirie⁽²⁵⁾ recomiendan el uso de filtros-prensa, para grandes capacidades, y filtros de tela para capacidades medias, siempre haciendo énfasis en la estrecha dependencia existente entre las condiciones de coagulación y la dificultad relativa de filtración. Byers⁽⁴⁾ notifica que las plantas mucilaginosas son especialmente difíciles de elaborar en esta etapa. Sin embargo, no se presenta dificultad alguna —aún con precipitados gelatinosos o mucilaginosos— si se separan en una centrífuga continua.

Para la separación de los precipitados proteicos en trabajo de laboratorio, se ha usado la filtración en tela y la centrifugación, adaptando estos métodos para resolver los problemas de cada extracción en particular.

Tanto en los trabajos de laboratorio como en los de escala piloto se detallan métodos de purificación que abarcan desde el simple lavado con agua, hasta tratamientos sucesivos con solventes⁽³⁷⁾ para remover pigmentos y grasa que podrían disminuir la estabilidad del concentrado proteico.

Morrison y Pirie⁽²⁵⁾ informan acerca de la purificación hecha en el producto de su planta piloto, consistente en lavados con agua ácida (pH de 3.4 a 4) de la torta molida

de la filtración inicial, seguidos de una segunda filtración de la cual se obtiene una torta que se exprime para disminuir la humedad; esto da bloques de 30 a 40% de materia seca, los cuales se envuelven en pliegos de polietileno y se almacenan a -10°C . Si el almacenamiento bajo congelación se prolonga mucho tiempo, la textura cambia a una consistencia arenosa que —antes de la preparación de los alimentos— hace necesario molerlo para que recupere la textura original. El ligero “sabor a hoja” que se manifiesta después del almacenamiento prolongado, puede eliminarse casi por completo mediante lavado con agua caliente.

Los ensayos hechos para secar el concentrado proteico por varios métodos, evaluando el producto resultante, señalan que el calor —y por lo tanto los métodos que incluyen, por ejemplo el secado en horno o en rodillos— produce un deterioro del valor nutritivo de los concentrados foliares.⁽¹⁸⁾ A este respecto Duckworth y Woodham⁽¹⁰⁾ establecen que el secado al horno no produce daños si la temperatura se mantiene suficientemente baja, siendo lo más importante que el material a secar no alcance temperaturas mayores de 80°C . No se ha informado acerca de los efectos del tiempo de calentamiento, ni de las reacciones químicas que ocurren, así como tampoco de los compuestos que intervienen para bloquear la digestibilidad y disminuir el valor biológico. Sin embargo, los resultados indican que los concentrados proteicos secados por calentamiento a baja temperatura en una corriente de aire no sufren ninguna merma en su valor nutritivo. No obstante, la exposición prolongada del concentrado proteico a estas condiciones, produce un endurecimiento superficial de los gránulos que altera su textura, dándole una sensación arenosa aún después de molido. El secado por suplimación produce resultados similares cuando la congelación se hace lentamente; si ésta es rápida el producto seco presenta la textura suave característica de los productos secados por sublimación.⁽²⁵⁾

En el caso de que los concentrados sean usados inmediatamente o dentro de un período de tiempo corto, no se

recomienda secarlos ni desgrasarlos, pues esto resulta anti-económico. En cambio, si el concentrado va a ser transportado o almacenado durante un largo tiempo, es preferible secarlo; lo mismo cabe decir con respecto a la extracción de materia grasa, ya que siendo alto el porcentaje de ácidos grasos no saturados, esta fracción de grasa es inestable en el almacenamiento y ello da origen al enranciamiento que deteriora el sabor del concentrado proteico.⁽²¹⁾

Lima y colaboradores⁽²¹⁾ dieron cuenta de un estudio de ácidos grasos en concentrados proteicos de nabo, apazote, gramas, trébol y maíz. En general, dichos autores encontraron que los concentrados contenían alrededor de 3 a 8% de ácidos grasos, de los cuales de 75 a 80% eran ácido linoleico, palmítico y linoleico, presentando pequeñas cantidades de ácido oleico, palmítico y esteárico que constituían del 12 al 17% del total de ácidos grasos. Además, detectaron cantidades mínimas de otros ácidos grasos, tanto saturados como no saturados. No pudieron establecer grandes diferencias cualitativas en la composición de ácidos grasos entre las especies estudiadas.

En lo que respecta al contenido de aminoácidos de las proteínas foliares, debe señalarse que Valli, Rao y Vijayaraghavan⁽³⁷⁾ investigaron el contenido de lisina y metionina de los concentrados proteico de hojas de caña de azúcar, bambú, remolacha, banano, mango, sesbania y otras hojas, usando para el caso, procedimientos microbiológicos. Según pudieron constatar, la metionina de las plantas estudiadas varió entre 1.3 y 2.2g, y el de lisina de 3 a 44g por 16 gramos de nitrógeno. En base al contenido de estos aminoácidos, dichos investigadores sugieren que varios de los concentrados proteicos de las hojas estudiadas podrían usarse para suplementar dietas de cereales deficientes en los aminoácidos citados.

Kelley y Baum⁽¹⁹⁾ han informado de un estudio sobre los aminoácidos de las hojas frescas y de los concentrados preparados de hojas de remolacha, maíz, arveja, ruibarbo, espinaca y nabo. Las determinaciones de aminoácidos fueron

hechas por métodos microbiológicos, estimándose, además de los aminoácidos esenciales, arginina e histidina. Se encontró que los preparados de hojas frescas contenían cantidades similares de estos aminoácidos en una proporción que se consideró nutricionalmente bien balanceada. El contenido total de aminoácidos en los preparados de hojas frescas fue de más o menos 75% del determinado en los concentrados proteicos.

Wilson y Tilley⁽⁸⁸⁾ realizaron un estudio de aminoácidos en concentrados proteicos y hojas frescas de alfalfa cosechadas en seis diferentes etapas de maduración. Los resultados indicaron una diferencia notable entre el contenido de aminoácidos de las hojas frescas y de los concentrados correspondientes, debido a que en la alfalfa alrededor del 30% del nitrógeno es soluble en agua. Los autores llegaron a esta misma conclusión en una investigación similar realizada en gramas, encontrando, asimismo, que el contenido de aminoácidos de los concentrados proteicos de alfalfa y de gramas era bastante parecido. En este estudio se encontró, además, que la composición de aminoácidos en la alfalfa no variaba mucho con la edad de la planta.

Gerloff y colaboradores⁽¹⁴⁾ también determinaron contenidos similares de aminoácidos en los concentrados proteicos de nueve plantas cosechadas en diferentes estados de madurez y cultivadas bajo diferentes condiciones de fertilización. Los autores indican que a juzgar por su contenido de aminoácidos, los concentrados podrían ser una fuente balanceada de proteína siempre que se suplementen con metionina, aminoácido en el que éstos son deficientes.

Henry y Ford⁽¹⁸⁾ verificaron estudios del valor nutritivo de concentrados proteicos de hojas, en ratas en proceso de crecimiento. En general los hallazgos clasifican a la proteína de hoja como de buena calidad. El valor nutritivo fue también estudiado microbiológicamente y se llegó a la misma conclusión; además se determinó la disponibilidad de algunos aminoácidos esenciales en muestras seleccionadas, encontrándose en todas ellas, que la metionina era menos

disponible que en el huevo. Se observó que el valor biológico y la digestibilidad aumentan con la maduración de las hojas debido al incremento en cuanto a la disponibilidad de metionina.

Los concentrados proteicos de trigo, cebada, alfalfa y nabo fueron estudiados por Akenson y Stahmann.⁽¹⁾ El valor biológico determinado fue en general más bajo que el del huevo, pero más alto que el de la caseína, soya, levadura, harina de trigo, zeína y gelatina.

Sur⁽³⁵⁾ determinó el valor nutritivo de la hoja de alfalfa completa, cortando ésta antes de que floreciera la planta. Llegó a la conclusión de que la harina de dicha hoja también era de valor nutritivo bajo. Además estudió su valor biológico y el coeficiente de digestibilidad, los cuales fueron de 66 y 74%, respectivamente, y el índice de eficiencia proteica, de 1.01. Los estudios de suplementación con arroz, realizados por el mismo autor, tuvieron como resultado una mezcla con un valor biológico de 88 y un índice de eficiencia proteica de 2.5, ya que, en pequeñas cantidades, la alfalfa incrementa la eficiencia proteica de dicho cereal, de 2.1 a 2.5, pero la adición de mayores cantidades no produce ningún otro aumento.

Rogers y Milner⁽³⁴⁾ compararon el valor nutritivo de los concentrados proteicos de hojas de yuca (*Manihot esculenta*) de Jamaica y del Brasil con su composición de aminoácidos. El contenido de aminoácidos reveló únicamente una notable deficiencia de metionina, mientras que el alto contenido de lisina sugiere su posible utilización como suplemento en la elaboración de algunas dietas a base de cereales. Durante el estudio del valor nutritivo que hicieron en ratas, dichos investigadores observaron que las dietas que contenían las hojas sin cocer y desecadas por liofilización, eran rechazadas aún en el caso de niveles tan bajos como de 10% de proteína foliar. Según los mismos autores esto no parece estar relacionado al contenido de cianuros de la hoja de yuca.

Duckworth y Woodham⁽¹⁰⁾ estudiaron la posibilidad de usar concentrados proteicos foliares de cebada, trigo, col rizada, gramas y tares como fuentes de suplementación proteica en raciones para ratas y polluelos en proceso de crecimiento. Llegaron a la conclusión que los cinco concentrados eran, uniformemente, de alto valor nutritivo, siendo comparables a la harina de soya como fuentes de proteínas.

Un concentrado proteico hecho de hojas de trigo fue sometido a prueba como suplemento de una dieta para cerdos por Duckworth y colaboradores.⁽⁹⁾ Pudieron observar que cuando la dieta tenía alrededor de 7% de proteína de hoja, el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento por los cerdos era tan buena como cuando usaban una dieta que contenía 8% de harina de pescado. Al aumentar el porcentaje a 10% o más, no se constató un mejor crecimiento aún cuando la eficiencia de utilización del alimento mejoró notablemente.

Waterlow⁽³⁹⁾ llevó a cabo un estudio sobre la absorción y retención del nitrógeno proveniente de la proteína de hoja en niños desnutridos en vías de recuperación.

Los resultados revelaron que el promedio de aumento de peso de los niños alimentados con una mezcla de leche y proteína foliar era muy semejante al de los niños que recibieron sólo leche. Se obtuvo evidencia de que el nitrógeno de la proteína de hoja había sido menos absorbido que el de la leche, pero la retención de nitrógeno de ambas fuentes no demostró diferencia alguna.

Al considerar los concentrados de proteína foliar como posible fuente de proteína para aliviar la escasez mundial de este nutriente, se debe tener en cuenta que la aceptación depende en mucho de la presentación y de la similitud que tengan los alimentos preparados con alimentos ya aceptados. Así, Byers⁽⁵⁾ ensayó mezclas de concentrados proteicos de hojas con salsas condimentadas, o con frutas y verduras, preparando pasteles, frituras y sopas a modo de contrarrestar cualquier sabor extraño.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Hojas

Para los estudios de extracción, preparación de proteínas foliares y evaluación del valor nutritivo de algunas de ellas, se emplearon tres grupos de hojas. En el primero se usó solamente kikuyú como ejemplo de plantas gramíneas. En el segundo grupo se estudiaron los bagazos de citronela y de té de limón, y en el tercero se incluyeron las hojas de bleo, soya, macuy (llamado también quilete o hierbamora), ramio, maíz (milpa), chipilín, verdolaga y quixtán.⁽³⁸⁾ Tanto el kikuyú como las hojas del tercer grupo se seleccionaron para los estudios de extracción por contener cantidades relativamente altas de proteína cruda, según lo indica la cuarta edición de la Tabla de Composición de Alimentos para Centro América y Panamá publicada por el INCAP en 1960,⁽³⁶⁾ y teniendo en cuenta su disponibilidad durante la mayor parte del año. Las muestras de citronela y té de limón se estudiaron por ser subproductos de la industria de aceites esenciales y por encontrarse asequibles en cantidades apreciables. Poco uso se le ha dado a estos materiales después de la extracción del aceite.

B. Recolección de las Hojas

Las hojas utilizadas en el estudio fueron recolectadas personalmente en el campo o en los mercados locales. Las muestras de citronela y de té de limón se obtuvieron de las

fábricas que procesan estas plantas para extracción de su aceite. El kikuyú provenía de parcelas experimentales o de siembras bajo explotación, como pasto. Las muestras se depositaron en los laboratorios de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) almacenándose bajo refrigeración, a 4°C, hasta el momento de su empleo para los estudios respectivos. Una muestra representativa de cada material fue utilizada para determinar su composición química proximal.

C. Preparación de las Hojas

En todos los experimentos que formaron parte de esta investigación, el material foliar fue tratado con agua fría para liberar materia extraña y tierra. En seguida el material se cortó en pedazos hasta de aproximadamente una pulgada, usando un cuchillo de acero inoxidable o de madera a fin de evitar el deterioro del color por oxidación de pigmentos en presencia de metales. Se utilizó de inmediato o bien se guardó en bolsas de polietileno, las que se almacenaron en un congelador hasta el momento de proceder a la extracción del nitrógeno. Parte de las muestras utilizadas en los experimentos con citronela y té de limón fue empacada en bolsas de polietileno tal como se recibió, procurando compactar el material en la medida posible, para excluir el aire y lograr así la fermentación con los microorganismos presentes en las hojas. Los bagazos empacados en esta forma se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 semanas. Al cabo de este tiempo se había desarrollado ya el olor característico de la fermentación, por lo que se procedió a realizar los ensayos de extracción de compuestos nitrogenados.

D. Extracción de Compuestos Nitrogenados

Para la extracción del nitrógeno de las hojas se utilizaron dos métodos. El primero, que se aplicó solamente una

vez, requirió una prensa hidráulica para separar el jugo de las hojas. Se colocaron alrededor de 250g en el recipiente de la prensa aplicándose una presión continua de 15,000 libras por pulgada cuadrada durante 24 horas. El jugo fue recolectado en un matraz y el residuo se disolvió en agua, colocándose de nuevo en la prensa para otra extracción y recolección del jugo así obtenido. Debido a la poca eficiencia de este método, se descartó en favor de otro más efectivo en romper la estructura celular y permitir la extracción de mayores cantidades de nitrógeno.

El segundo procedimiento utilizado fue tratando el material foliar en una licuadora Waring. En este caso se colocaba un peso conocido de hojas en el recipiente de la licuadora, con los solventes sometidos a ensayo en cantidades que duplicaban o triplicaban el peso de las hojas. Después de separar el primer extracto, por filtración en tela, el residuo fue extraído nuevamente de dos a tres veces más, juntando los extractos contenidos en un solo volumen, el cual se midió. El residuo fue deshidratado y pesado. En ambos productos se determinó nitrógeno total. Los solventes empleados en los diferentes experimentos para las diversas hojas fueron: a) agua destilada; b) soluciones de hidróxido de sodio de diferente concentración y, por consiguiente, de diferente pH; c) soluciones al 10% de ácido bórico; y d) solución de sulfato de cobre (0.014 M), sulfito de sodio (0.004 M) e hidróxido de sodio (10.05 N). Varios investigadores han empleado solventes iguales o similares para extraer, tanto proteínas foliares^(87, 11) como de cereales.⁽²³⁾ En el trabajo de que aquí se da cuenta, la extracción con licuadora produjo mucha espuma en ciertas ocasiones, por lo que con el fin de eliminarla, se empleó el antiespumante de silicona Merck No. 78.

E. Precipitación de Proteínas

Una vez separado el material foliar residual del solvente, lo que se hizo por filtración en tela, se procedió en algu-

nos casos a la precipitación de las proteínas del extracto. En aquellos casos en los que hubo necesidad de concentrar el extracto, esto se realizó colocándolo en un balón rotatorio de evaporación al vacío. El material ya concentrado se trató con una solución de ácido clorhídrico, llevándolo al punto isoeléctrico de la proteína, pH 4.5 a 5.5, para precipitarla. Cabe señalar que con el fin de obtener una mejor precipitación, el extracto ajustado a pH 4.5, fue calentado en baño de María a 70°C. Si el volumen del extracto no requería concentración, el pH se redujo hasta 4.5 para precipitar las proteínas, siempre con la ayuda de calor a una temperatura de 70°C.

El precipitado fue separado del sobrenadante por centrifugación; seguidamente este último se deshidrató por liofilización, y el precipitado, por secamiento a temperatura ambiente y en horno a 37°C.

Se determinó luego el nitrógeno total de ambos productos para calcular el balance o la distribución del nitrógeno.

F. Preparación de Proteína Foliar para Ensayos Biológicos

En este ensayo se empleó la hoja de bledo, aplicando una adaptación del método descrito por Valli, Rao y Vijayaraghavan⁽⁸⁷⁾ y por Fowden.⁽¹¹⁾ Se realizaron varias extracciones usando, para cada una, 400g de bledo, 1,000cc de agua destilada y 137cc de hidróxido de sodio 0.2 N, para mantener un pH de 9.0. Para cada carga de 400g se hicieron dos extracciones separando el residuo por filtración en tela de algodón. Los dos extractos obtenidos en esta forma y mezclados en un solo volumen, se concentraron por pervaporación o diálisis contra aire,⁽¹⁶⁾ en un horno con aire circulante a 70°C, y usando durante la concentración, ácido ascórbico al 0.2%, como preservativo.⁽¹²⁾ Además, a intervalos de 4 a 8 horas la superficie externa de los tubos de diálisis se frotaba con toallas de papel humedecidas en agua destilada, para limpiarla de los cristales de sales y favorecer así la diálisis a

través de la membrana. La precipitación proteica se logró acidificando el extracto concentrado con ácido clorhídrico hasta el punto isoeléctrico de las proteínas, que en este caso se consideró ser pH 4.5. Luego se sometió a coagulación en baño de María a 70°C. El precipitado proteico, de color verde-café, se separó del licor remanente por centrifugación a 3,500 r.p.m., usándose copas plásticas de 250cc de capacidad.

La purificación del precipitado se hizo en las mismas copas, lavándolo tres veces con agua para eliminar el ácido y seguidamente con acetona, cinco veces consecutivas, para descartar más o menos en su totalidad el agua, los pigmentos y la grasa.⁽³⁷⁾ Para preservarlo del sabor dulzón característico de la acetona, el precipitado proteico fue lavado con éter de petróleo. A partir del licor remanente, se trató de obtener un segundo precipitado, ciñéndose, para el caso a los tratamientos siguientes: envejecimiento a 37°C por 24 horas; acidificación hasta un pH de 3.5, coagulación por calor, y envejecimiento a 4°C durante 24 horas. No se logró ninguna precipitación, permaneciendo el licor remanente color ámbar claro.

El secamiento del precipitado proteico obtenido se realizó en dos etapas. La primera consistió en descartar el éter de petróleo a la temperatura ambiente, y la segunda en eliminar la humedad, a 37°C.

Se obtuvo un concentrado proteico abundante, color pardo claro, con poca fibra y de alto contenido en nitrógeno, inodoro y de gusto no perceptible.

G. Preparación de Harinas de Hojas para Estudio de su Valor Nutritivo

Las hojas escogidas para este propósito fueron las de bledo, (100 libras) chipilín, quixtán y macuy (50 libras de cada uno).

El bledo fue deshidratado por medio de liofilización y utilizando una corriente de aire caliente a la temperatura de 70°C, mientras que para el macuy, el chipilín y el quixtán

sólo se usó aire caliente. La liofilización se llevó a cabo en una liofilizadora Virts y durante un período de 72 horas.

El procedimiento de deshidratación al horno se efectuó colocando capas finas del material foliar (chipilín, bledo, quixtán y macuy) en bandejas-canasta a modo de favorecer la circulación del aire en el horno, a una temperatura de 70°C. Después de una hora de secado, el material se sacó y fue redistribuido en las bandejas a fin de lograr un secamiento uniforme en corto tiempo. Al término de dos horas las hojas estaban ya completamente deshidratadas.

A continuación, éstas fueron molidas a un grueso de 40 mallas en un molino Wiley, almacenándose en un cuarto refrigerado a 4°C.

Las harinas de hojas destinadas a los estudios biológicos, así como el concentrado proteico de bledo, se sometieron a análisis para determinar su contenido de humedad, grasa y fibra cruda, empleándose para ello los métodos de la A.O.A.C.⁽²⁷⁾ El nitrógeno se analizó según la técnica de Hamilton y Simpson.⁽¹⁵⁾

H. Estudio de Aminoácidos

Se determinó el contenido de aminoácidos esenciales del concentrado proteico de bledo obtenido por extracción alcalina, y de las harinas foliares utilizando para ello métodos microbiológicos.⁽¹³⁾ En las determinaciones de lisina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, fenilalanina y valina se usó *Leuconostoc mesenteroides* P-60 y medio sintético Difco. El contenido de triptofano en hidrolizados alcalinos se analizó usando *Lactobacillus arabinosus* 17-5 y medio sintético Difco.

I. Ensayos Biológicos

El valor nutritivo de las harinas foliares y del concentrado proteico del bledo se determinó mediante un ensayo en ratas jóvenes en proceso de crecimiento, el cual se desarrolló en tres etapas sucesivas. Se emplearon en total 56 ratas blan-

cas de la cepa Wistar de la colonia animal del INCAP, de 4 semanas de edad, asignándose 4 hembras y 4 machos a cada dieta. Se prepararon 7 dietas basales, cuya composición se describe en el Cuadro No. 1.

Los animales se alojaron en jaulas individuales de alambre con fondos elevados de tela metálica, suministrándoseles *ad libitum* tanto el agua como la ración durante todo el tiempo que duró el experimento. Se pesaron cada 8 días, anotándose su aumento de peso, y llevándose también un registro de peso del alimento consumido⁽²⁶⁾ en ese período.

Las ocho ratas integrantes del grupo que recibió el concentrado proteico de bledo fueron alimentadas durante 4 semanas, determinándose el índice de eficiencia proteica (PER*) de dicho concentrado.

Los grupos de ratas alimentadas con las harinas de hojas (chipilín, macuy, bledo, quixtán y bledo liofilizado) y el grupo testigo (caseína libre de vitaminas), consumieron estas dietas tres semanas, al final de las cuales se determinó también su eficiencia proteica. Luego cada grupo se dividió en dos subgrupos, A y B. El subgrupo A formado por 2 hembras y 2 machos se usó como control; las dietas para las ratas del subgrupo B fueron suplementadas con metionina, con el objeto de establecer si la adición de este aminoácido esencial, tenía resultados benéficos. Al término de las tres semanas siguientes se varió la dieta del subgrupo A duplicando el porcentaje proteico foliar; el objeto de este cambio fue observar si ello hacía innecesaria la suplementación con aminoácidos. El subgrupo B, en cambio, continuó sujeto a la misma dieta, usándose en este caso como control. En cuanto a los animales alimentados con bledo, al grupo que recibía la dieta del bledo liofilizado se le administró —en la última etapa—, la dieta de bledo secado al horno, para determinar si este cambio se traducía en una mejora del crecimiento. Este experimento duró tres semanas más. El período total del ensayo abarcó así 9 semanas.

* PER = "Protein Efficiency Ratio".

IV. RESULTADOS

A. *Composición Química*

El análisis proximal, en base fresca, de las hojas escogidas para esta investigación se detalla en el Cuadro No. 2. Como puede apreciarse, el contenido de humedad osciló entre un valor mínimo de 14.1% y uno máximo de 87.4%, y el de nitrógeno entre un porcentaje mínimo de 0.58 y uno máximo de 1.92, correspondiente al kikuyú y a la citronela, respectivamente. En base seca el contenido de nitrógeno varió de 3.67 a 9.37%.

B. *Extracción*

La eficiencia de extracción de las proteínas, usando varios métodos, se presenta en los Cuadros Nos. 3, 4 y 5 para el kikuyú, el té de limón y la citronela, en el mismo orden. En el Cuadro No. 3 se indican, asimismo, los resultados de varios experimentos realizados con kikuyú. Según revelan las cifras, el uso de maceración con el solvente de sulfato de cobre y sulfito de sodio a un pH de 12, y de una solución de hidróxido de sodio a pH 9, produjeron los mejores resultados en cuanto a porcentajes de extracción de compuestos nitrogenados siendo éstos de 83.40 en el primer caso, y de 62.90 en el segundo. Los rendimientos de proteína cruda obtenidos en base del contenido proteico de la materia prima fueron de 57 y 30%, respectivamente. Evidentemente pues, el pro-

ceso de licuación produjo mejores extracciones que el prensado. Aunque una concentración baja de NaOH es favorable, una concentración excesiva parece reducir la extracción del nitrógeno.

En lo referente a los ensayos realizados con bagazo de té de limón (Cuadro N° 4), los resultados revelan nuevamente que el solvente de CuSO_4 , Na_2SO_3 en solución, a pH 12, proporciona una extracción de compuestos nitrogenados precipitables de 12.13% en el material no fermentado. Cabe señalar que con el té de limón fermentado se obtuvieron menores extracciones con todos los solventes. El Cuadro N° 5 muestra los experimentos hechos con bagazo de citronela. Aquí las mejores extracciones se obtuvieron por medio de solventes alcalinos simples (NaOH a un pH 9) o complejos (como el solvente de CuSO_4 , Na_2SO_3 a un pH 12), tanto de la hoja fermentada como de la no fermentada. Sin embargo, con este material foliar, el porcentaje de extracción no fue consistente y siempre se mantuvo relativamente bajo.

Los resultados de la extracción proteica de varias hojas, usando agua como solvente, constan en el Cuadro N° 6. En este caso la mejor extracción de compuestos nitrogenados precipitables obtenida fue de 21.60%, correspondiente a la hoja de bledo. En las otras hojas las extracciones fueron de menor cuantía, pero parece ser que en general el agua no es un buen solvente, por lo menos para algunas de ellas.

Los experimentos realizados con bledo usando como solvente proteico, agua y solución de NaOH a un pH 9, y sus resultados se presentan en el Cuadro N° 7. En este caso el porcentaje de extracción de compuestos nitrogenados fue de 76.2% cuando se empleó la solución de NaOH, en contraste con 27.6% al utilizarse agua.

El Cuadro N° 8 ilustra la distribución de nitrógeno y aminoácidos de la hoja de bledo en los productos resultantes de la fase de extracción, usando para el caso, la solución de NaOH a un pH de 9. El contenido de aminoácidos del precipitado proteico, de las proteínas no precipitables, y del residuo de la extracción, presenta diferencias, siendo este

último el más pobre en concentración de los aminoácidos estudiados. El mismo cuadro muestra también que el contenido de aminoácidos de los productos analizados es inferior al de la caseína.

El análisis proximal y de aminoácidos de las harinas foliares usadas para los ensayos biológicos se dan a conocer en el Cuadro N° 9. El examen de dichos datos revela que las harinas acusan un contenido de nitrógeno que fluctúa entre 4.59 y 5.85%. El contenido de aminoácidos, expresado en g/gramos de nitrógeno de las diferentes hojas es muy similar, existiendo entre ellas pequeñas diferencias únicamente. Por otro lado, todas las hojas presentan cantidades pequeñas de metionina y parecen ser buena fuente de lisina. Tampoco se constataron diferencias en cuanto al contenido de aminoácidos entre el bledo deshidratado con aire caliente y el deshidratado por liofilización.

C. Ensayos Biológicos

Los hallazgos correspondientes a la primera fase del ensayo biológico se detallan en el Cuadro N° 10 y en las Figuras 1*, 2* y 3**.

Se pudo establecer que de todas las dietas experimentales utilizadas, la que produjo mayores aumentos de peso e índices de eficiencia proteica más favorable fue el concentrado de la proteína del bledo. En este caso el incremento de peso obtenido alcanzó 52 gramos y el PER, 2.15, en comparación con el de 3.63 observado en el grupo control cuya ración era a base de caseína. En lo referente a las dietas preparadas con hojas deshidratadas, las cifras de incremento ponderal fueron: 24, 19 y 6 para el bledo, chipilín y quilete, respectivamente. En el mismo orden se obtuvieron los siguientes índices de eficiencia proteica: 1.56, 1.33 y 0.53. Se comprobó, además, un pequeño aumento, tanto en el crecimiento de los animales como del PER, con la dieta de ble-

* Las figuras 1 y 2 representan el crecimiento observado con las dietas de concentrado proteico de bledo, bledo secado al horno y bledo liofilizado.
** La Figura 3 representa el crecimiento con las dietas de chipilín, quilete y quixtán. Las tres gráficas ilustran el crecimiento logrado con caseína, como dieta control.

do secado al horno, en contraste con las que contenían bledo liofilizado. De las hojas utilizadas en estos ensayos, únicamente el quixtán indujo pérdidas de peso; sin embargo, no hubo mortalidad en los animales alimentados con ésta ni con ninguna de las otras hojas.

Los datos obtenidos al suplementar las dietas experimentales con el aminoácido metionina (Cuadro N° 11 y Figuras 1 a 3), corresponden a la segunda etapa del estudio biológico. Era, pues, de esperar que los pesos iniciales no fueran iguales entre las diferentes hojas. Como claramente se aprecia, el agregado de metionina a la dieta de chipilín produjo un aumento ponderal de 68 gramos, en contraste con el de 27g que acusó el grupo alimentado con la dieta libre de suplementación. El índice de eficiencia proteica ascendió de 1.37 a 2.46. Con el bledo secado al horno la ganancia de peso fue de 37 gramos, mientras que ésta alcanzó sólo 10 gramos en el grupo control alimentado con la dieta sin suplemento del aminoácido. En este caso la eficiencia proteica subió de 1.05 a 1.88.

En lo concerniente a las dietas de hojas de quilete y de quixtán, aparentemente la adición de metionina no tuvo ningún efecto benéfico. Asimismo, la única muerte registrada ocurrió en el grupo que recibió la dieta preparada a base de quilete.

El Cuadro N° 12 y las Figuras 1 a 3 sumarizan en cifras, y gráficamente, los resultados correspondientes a la última etapa del ensayo, cuyo propósito fue comparar el efecto del nivel proteico y de la suplementación con aminoácidos en las mismas dietas experimentales utilizadas en las pruebas anteriores. Según se aprecia, el alza del nivel proteico obtenido con el chipilín tuvo como resultado una menor ganancia en peso (54 g) y un índice de eficiencia proteica más bajo (1.09), en contraste con la dieta suplementada con metionina; en este caso, se obtuvieron 68 y 1.87 de incremento ponderal y eficiencia proteica, respectivamente.

En el caso de la dieta a base de bledo, el aumento en peso y el PER obtenidos con 20% de proteína, fueron me-

jores en comparación con los resultantes de la dieta suplementada con metionina.

Con el bledo liofilizado no se comprobó mayor cambio en cuanto a ganancia en peso al comparar la dieta con un nivel proteico alto (20%) y la dieta suplementada.

Al igual que en los experimentos anteriores, el grupo alimentado con quilete acusó mortalidad, aunque el agregado de metionina disminuyó el número de muertes entre estos animales. Con respecto al quixtán, no hubo ninguna diferencia entre el grupo de ratas alimentadas con aproximadamente 20% de proteína, y el que recibió la ración con 10% de proteína más el suplemento de metionina.

V. DISCUSION

Los resultados del presente estudio indican, como ya lo han expresado otros investigadores^(2, 16, 24), que las fases más importantes de un procedimiento de extracción de proteína foliar son la de asegurar la destrucción de la estructura celular, y el uso de un reactivo que extraiga la mayor parte del material proteico.

En las tentativas conducentes al establecimiento de una técnica de rompimiento de la estructura celular, sólo se tuvieron en cuenta los métodos mecánicos por ser los más fáciles de aplicar. De los dos procedimientos empleados en este trabajo, el método de prensa resultó ser poco eficaz, mientras que, según se pudo comprobar, el de licuación puede dar buenos rendimientos cuando se acompaña de solventes proteicos efectivos o, en el caso de ciertas hojas, de solventes simples, como el agua. Dos son las razones que pueden ofrecerse para explicar el por qué de la poca eficiencia del método de extracción por prensa. La primera está relacionada con el movimiento del jugo foliar que contiene la proteína, el cual es lento a través de la fibra y de la estructura foliar. La segunda, y más factible, concierne al pH del jugo y a la acción que las enzimas de la hoja y otros componentes celulares ejercen sobre el mismo. Puesto que las hojas contienen cantidades relativamente altas de ácidos orgánicos, el pH del jugo foliar se reduce posiblemente hasta el punto isoeléctrico de la proteína, nulificando su solubilidad y, por lo tanto, la posibilidad de su obtención. Es probable que un alto porcentaje del nitrógeno extraído fuese del tipo no proteico.

La licuación, por el contrario, produce una destrucción más efectiva de la membrana celular, y el solvente favorece la solubilidad de la proteína.⁽¹¹⁾ Los solventes alcalinos, además de aumentar la solubilidad de la proteína también mantienen el pH del jugo celular del lado alcalino, no permitiendo que éste baje y reduzca la solubilidad de la proteína. Ello podría explicar, pues, por qué las extracciones con solventes alcalinos logradas en el trabajo aquí descrito, fueron siempre mayores que las obtenidas con agua destilada.

Asimismo, los resultados señalan, como también lo describieron ya varios autores,⁽³⁷⁾ que no todas las hojas permiten un alto grado de extracción con agua. En el presente estudio, el bleo, el chipilín, la soya y el quixtán rindieron cierta cantidad de proteína que, aunque pequeña, fue mayor que la obtenida con el macuy, el ramio y el kikuyú. Esta baja eficiencia de extracción proteica, utilizando agua, puede explicarse en base a los cambios del pH durante el propio proceso, ocasionados por los ácidos de la hoja y también a causa del estado de madurez de la hoja. Es posible que, como Byers y Sturrock lo han postulado,⁽³⁾ las hojas adultas tengan menos proteína y nitrógeno soluble que las hojas tiernas. Puede ser también que en las hojas maduras, la proteína se encuentre ligada a otros componentes foliares en las estructuras celulares, y que el nitrógeno libre de las hojas tiernas sea movilizado por la planta a otras regiones de la misma donde desempeñen funciones metabólicas específicas.

Además, los resultados indican que la extracción con reactivos de acción severa, libera más compuestos nitrogenados precipitables por acidificación, que la extracción con agua, posiblemente a causa de cierta selectividad de extracción de cada reactivo. Sin embargo, esta hipótesis no se investigó en este trabajo, en vista de que, en realidad, ello corresponde más bien a las técnicas de separación analítica citadas en la literatura.⁽¹⁶⁾

Las extracciones hechas con soluciones de hidróxido de sodio dieron porcentajes de extracción cada vez menores

conforme aumentaba el pH, debido a una posible desnaturalización de las proteínas al haber mayor alcalinidad.

Los datos también señalan que no todo el nitrógeno extraído era proteína, ya que con su precipitación a pH de 4.5 - 5.5, y con temperatura de 70°C, se detectaron cantidades relativamente altas de nitrógeno en el sobrenadante. Es posible que este nitrógeno esté presente en forma de aminoácidos libres y de otros compuestos nitrogenados solubles. Los resultados indican, pues, que en el caso de las hojas, no es correcto multiplicar el porcentaje de nitrógeno determinado por el método Kjeldahl por el factor 6.25 para calcular su contenido proteico. Por consiguiente, salta a la vista la necesidad de establecer un factor aplicable a las hojas para estos propósitos.⁽²⁵⁾

Son de interés los resultados obtenidos con los bagazos de té de limón y de citronela. Como ya se sabía, toda la proteína de los bagazos se encontraba desnaturalizada por el calor que se emplea para la extracción de los aceites de estas hojas. Debido a esta circunstancia, ni siquiera el uso de solventes tan fuertes como son los alcalinos dieron buenas extracciones de nitrógeno ni de proteína. Es un hecho reconocido que, además de desnaturalizar la proteína, el calor cataliza la reacción entre carbohidratos y proteína, y hace esta última muy insoluble. La fermentación de los bagazos se hizo bajo el supuesto de que la actividad enzimática de los microorganismos podría degradar la proteína coagulada a una forma más soluble, destruyendo también la estructura celular formada por celulosa. Sin embargo, los resultados indicaron lo contrario, ya que el porcentaje de extracción de los compuestos precipitables disminuyó en forma notable, en comparación con el porcentaje que se logró de los bagazos sin fermentar. Puede ser que la fermentación indujera cierta liberación del nitrógeno, siendo este el factor responsable de los bajos rendimientos obtenidos. Sería, pues, conveniente, estudiar el uso de otros solventes semejantes a los utilizados en este trabajo, en el caso de materiales folia-

res, ya que abunda la disponibilidad de estos productos que, lamentablemente se pierden por falta de utilización.

La textura de los precipitados obtenidos por extracción, según el procedimiento de Mertz y Bressani,⁽²³⁾ era dura y granulosa, siendo imposible purificarlos hasta eliminar el color azul-cobre que todos presentaban. Esta circunstancia obligó a desechar este solvente para futuros ensayos, ya que cuando se trata de obtener un concentrado proteico a utilizar con fines nutricionales, es condición indispensable que éste se obtenga puro o en una forma fácil de purificar. Sería interesante ensayar —en futuros experimentos—, la otra posibilidad que ofrece el método y que consiste en eliminar las sales por diálisis, con lo cual se lograría una proteína mucho más pura.

Las hojas de maíz, té de limón y citronela, además de ser muy fibrosas, rindieron, por acidificación del extracto, un precipitado insignificante. El kikuyú, también fibroso, tuvo un rendimiento muy bajo; el chipilín y la verdolaga, por ser hojas mucilaginosas, dan un extracto muy difícil de filtrar; en el caso de la verdolaga, por ejemplo, fue prácticamente imposible separar el residuo. El procesamiento de estas hojas produjo un olor desagradable, muy penetrante, que se hizo aún más notorio al acidificar el extracto de chipilín. El precipitado obtenido conservó este olor, lo que hizo necesario aumentar los lavados con agua, acetona y éter, sin que se lograra eliminarlo por completo.

El quixtán se encontró menos mucilaginoso pero muy difícil de manipular en vista de que el haz y envés de las hojas está recubierto de espinas duras. Además, se encontró sólo como planta silvestre, lo que dificultó su obtención en esta zona de la República, en las cantidades requeridas para el presente trabajo.

Las hojas de bledo, soya, macuy y ramio son de textura suave. El extracto obtenido del macuy fue difícil de filtrar, y el precipitado aún más difícil de lograr, ya que todavía después de someterse a calentamiento, a la temperatura de 70°C, permaneció como una suspensión gelatinosa. Las ho-

jas de soya y de ramio, aunque no presentaron mucha dificultad durante el tratamiento, dieron rendimientos de precipitados bajos.

Teniendo en cuenta las dificultades a que se alude, se llegó a la conclusión de que el bledo era la planta cuyas hojas se adaptaban mejor a los fines de este trabajo, según el procedimiento escogido. No menos importante, se le encuentra tanto en forma silvestre como cultivada, y en cantidades suficientes, en cualquier época del año.

La comparación entre el contenido de aminoácidos del concentrado proteico del bledo y el de la caseína, reveló que, expresados en g/g de N, para todos ellos éste era más o menos la mitad que la caseína, notándose solamente una ligera deficiencia de metionina. Varios investigadores han informado^(14,20,33), que el aminoácido metionina es el más deficiente en la proteína foliar, principalmente si las hojas son de plantas leguminosas.

Las harinas de varias hojas fueron también analizadas para determinar su contenido de aminoácidos, encontrándose que éste era más bajo que el del concentrado proteico. Digno de notar es el hecho de que la metionina de las harinas se encontró presente en un porcentaje, en peso, de la mitad del determinado en el concentrado proteico. La composición de aminoácidos de las harinas de bledo secadas al horno y por liofilización fue bastante similar al expresar los resultados en g/100g de muestra. Esto era de esperar, puesto que el proceso no causa destrucción de los aminoácidos, sino solamente disminuye en cuanto a la disponibilidad biológica, reducción, esta última, imposible de detectar con los métodos empleados en este estudio.

Los ensayos biológicos demostraron que, desde el punto de vista nutricional, el concentrado proteico del bledo acusó una eficiencia proteica bastante buena, comparada con la caseína. Sin embargo, sería de interés averiguar cuáles son las condiciones óptimas de extracción de este material como fuente de proteínas desde los puntos de vista económico y práctico. La pequeña diferencia observada a favor del bledo

lío-filizado, en contraste con el ble-do secado al horno, bien puede deberse a que en el primer caso la proteína sufrió menos daño, en vista de que la liofilización es un tratamiento más suave para la propia proteína.

Según los resultados de estas pruebas biológicas, el ble-do es deficiente en metionina, ya que el agregado de este aminoácido mejoró el peso de los animales y los índices de eficiencia proteica. En este caso, se considera que valdría la pena investigar, en futuros experimentos, el efecto de la adición de niveles más altos de este aminoácido. Asimismo, el agregado de otro u otros aminoácidos podría revelar la existencia de otras posibles deficiencias, en vista de que al subir el nivel proteico de 10 a 20%, el PER mejoró en comparación con el de la dieta suplementada con metionina. Este hallazgo sugiere, pues, que al elevar el nivel de proteínas en la dieta, se lograría aumentar también la cantidad de otros aminoácidos esenciales, alzas éstas que se traducirían en una proteína mejor balanceada. Es también de interés hacer notar, como se indicara anteriormente, que no es apropiado multiplicar el porcentaje de N por 6.25 para el cálculo de proteína, en vista de que no todo el nitrógeno presente en la hoja es de origen proteico.

De todas las dietas preparadas a base de hojas deshidratadas, la de chipilín reveló la deficiencia más ostensible de metionina. Esta deficiencia pudo comprobarse no sólo por la respuesta obtenida al agregar este aminoácido, sino también al comparar la dieta que contenía 20% de proteínas con la ración exenta de suplementación. En ambos casos el incremento de peso de los animales, así como el índice de eficiencia proteica del alimento mejoraron notoriamente. Valdría la pena emprender otros estudios de suplementación en los cuales se agregara diferentes niveles de metionina o de otros aminoácidos, con el objeto de establecer la posibilidad de obtener nuevas mejoras en el valor nutritivo de esta proteína.

Se pudo comprobar que el quilete y el quixtán contienen proteínas de bajo valor nutritivo, especialmente el qui-

lete, pues los animales que recibieron esta dieta, perdieron peso, y hasta hubo casos de mortalidad. Aparentemente la metionina no ocupa el primer lugar en términos de deficiencia en estas dos proteínas, ya que la adición de este aminoácido no tuvo ningún efecto benéfico. Es posible que otro u otros aminoácidos sean más limitantes, por lo que la autora se permite sugerir que en la continuación de estos experimentos, la suplementación se haga utilizando diferentes aminoácidos.

En lo que a la deficiencia de aminoácidos se refiere, los hallazgos del presente trabajo parecen corroborar datos obtenidos previamente por algunos investigadores que estudiaron otras fuentes de proteínas derivadas de hojas.⁽¹⁷⁾ Por otro lado, algunos informes en la literatura a este respecto destacan que ciertas proteínas de hojas son buenas fuentes de metionina y lisina, hecho indicativo de que el contenido de aminoácidos varía no solamente con la clase de hojas usadas, sino también con otros factores^(7, 9, 20, 26, 27) tales como tiempo de maduración, procedimiento de extracción, métodos de cultivo y uso de fertilizantes.

Ajeno a la posible deficiencia de aminoácidos de los materiales usados, no debe descartarse la presencia de otros factores capaces de afectar el valor nutritivo de las proteínas foliares investigadas en el curso de este trabajo.

Desde el punto de vista práctico, el conocimiento de la disponibilidad de los aminoácidos esenciales en estos materiales, así como del contenido de proteína pura y de la clase y cantidad de nitrógeno proteico, permitirá su aplicación como fuente de complementación de cereales y leguminosas y, en general, para el logro de una mejor alimentación humana.

VI. RESUMEN

En el transcurso del trabajo de tesis aquí descrito se desarrolló un método general para la preparación de un concentrado de proteína foliar. En este proceso la meta fue tratar de obtener el más alto rendimiento posible, evitando un grado de extracción muy severo que pudiese disminuir el valor nutritivo de la proteína del concentrado. Para este propósito se sometieron a ensayo varios solventes que, aún cuando conforme aumentaban en actividad química, incrementaban su poder de extracción, producían al mismo tiempo un concentrado proteico cada vez más impuro, de consistencia granulosa y de apariencia poco favorable para un alimento.

En vista de estos resultados, se escogió como solvente, hidróxido de sodio en agua, a un pH de 9, con la masa de hojas molidas. Este solvente acusó cualidades de extracción que, en esencia, pueden considerarse como un ajuste entre la calidad y el rendimiento del precipitado proteico obtenido por acidificación del extracto.

Se estudiaron varias hojas, habiéndose seleccionado la hoja del bledo como la más apropiada para preparar un concentrado proteico debido a que es de suave textura, carnosa y de alto contenido de nitrógeno.

Teniendo en cuenta el elevado contenido de nitrógeno de las hojas de base seca, se prepararon harinas de hojas de bledo desecadas, para uso en un estudio de evaluación bioló-

gica de calidad proteica, en el cual se comparó la calidad de la proteína de un concentrado, con la proteína no extraída, presente en las harinas.

Se prepararon además, harinas de otras hojas, caracterizadas por contener una alta concentración de nitrógeno, con las cuales se llevó a cabo un estudio biológico cuyo propósito era determinar si la calidad proteica de estas hojas justificaba o no futuros trabajos de experimentación, encaminados a la búsqueda de un método más apropiado para extraer su proteína.

Se hicieron determinaciones de los aminoácidos esenciales en el concentrado proteico del bledo y en las harinas de hojas usadas en los ensayos biológicos. También se hicieron estos análisis en los productos de extracción del bledo, para establecer su distribución de aminoácidos, teniendo en mientes la posibilidad de utilizar los subproductos con fines alimenticios.

La comparación de los resultados de los ensayos biológicos, con su contenido de aminoácidos reveló que la proteína de las hojas de bledo era de buena calidad, y que con el mismo contenido de nitrógeno en la dieta, la proteína del concentrado es más eficiente que la proveniente de las harinas de hojas desecadas. También se encontró que con excepción del chipilín, en términos de su composición de aminoácidos, las harinas de hojas desecadas tenían un bajo índice de eficiencia proteica. En el caso del chipilín, la suplementación con metionina produjo una mejora apreciable.

En síntesis, en el desarrollo de este trabajo de tesis se logró explorar inicialmente varios aspectos de la utilización de la proteína de hojas que crecen abundantemente en esta región, siendo la finalidad del estudio, aportar información que pudiese ser de utilidad en el desarrollo de futuras investigaciones de esta naturaleza.

VII. RECONOCIMIENTOS

La autora agradece la valiosa colaboración del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), por haberle proporcionado las facilidades de laboratorio necesarias para la elaboración de este trabajo.

Muy especialmente, hace público su reconocimiento al Dr. Ricardo Bressani, Jefe de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos de dicha Institución, quien, con sus brillantes y originales sugerencias y guía, hizo posible la realización de los ensayos que sirvieron de base a esta tesis.

Asimismo, deja constancia de su agradecimiento al Dr. J. Edgar Braham, Jefe Asistente de la misma División, por su valiosa asesoría en el desarrollo de las diversas fases del trabajo, y al Lic. Luis G. Elías, Sra. Marta Monzón de Muñoz, Srta. Ana María Barrera, y Sr. Carlos Urrutia, todos ellos miembros de esa dependencia, por la desinteresada cooperación que tuvieron a bien prestarle en esta tarea.

VIII. REFERENCIAS

1. AKENSON, W. R. y M. A. STAHMANN. Nutritive Value of Leaf Protein Concentrate, and in vitro Digestion Study. *J. Agr. and Food Chem.*, 13: 145-148, 1965.
2. BONNER, J. *Plant Biochemistry*. Academic Press Inc., New York 10, N. Y., pp. 167:215, 245-279, 1950.
3. BYERS, M. y S. W. STURROCK. The Yields of Leaf Protein Extracted by Large Scale Processing of Various Crops. *J. Sci. Food Agr.*, 16:341-355, 1965.
4. BYERS, M. Extraction of Protein from the Leaves of some Plants Growing in Ghana. *J. Sci. Food Agr.*, 12-20-30, 1965.
5. BYERS, M., S. H. GREEN y N. W. PIRIE. The Presentation of Leaf Protein on Table II. *Nutrition* 19:63-70.
6. CHAKRAVARTY, P. R. y B. C. GUHA. Leaf Protein Technology. *Proc. Symposium on Proteins*, p. 257-259, Aug. 14-16, 1960. (Chem. Res. Com. & Soc. Biol. Chem. India).
7. DAVYS, M. N. G. y N. W. PIRIE. Batch Production of Protein from Leaves. *J. Agr. Eng. Res.*, 70-73, 1963.
8. DAVYS, M. N. G. y N. W. PIRIE. A Belt Press for Separating Juices from Fibrous Pulps. *J. Agr. Eng. Res.*, 142-145, 1965.
9. DUCKWORTH, J., W. R. HEPBURN y A. A. WOODHAM. Leaf Protein Concentrates. II. The Value of a Commercially Dried Product for Newly Weaned Pigs. *J. Sci. Food Agr.*, 12-16-20, 1961.

10. DUCKWORTH, J. y A. A. WOODHAM. Leaf Protein Concentrates. I. Effect of Source of Raw Materials and Method of Drying on Protein Value for Chicks and Rats. *J. Sci. Food Agr.*, 12:5-15, 1961.
11. FESTENSTEIN, G. N. Extraction of Proteins from Green Leaves. *J. Sci. Food Agr.*, 12:305-311, 1961.
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO, CFAL. Current Food Additives Legislation. No. 91, 11a., 1386, 1388, 1350, 1392. Antimicrobial preservatives.
13. FRUTON, J. S. y Sofia SIMMONDS. General Biochemistry, 2nd. ed. New York, John Wiley, p. 124-125, 1954.
14. GERLOFF, E. D., Iracema H. LIMA y M. A. STAHMANN. Amino Acid Composition of Leaf Protein Concentrates. *J. Agr. and Food Chem.*, 13:139-143, 1965.
15. HAMILTON, L. F. y S. G. SIMPSON. Talbot's Quantitative Chemical Analysis, 9th. ed. New York MacMillan Co., p. 355-359, 1946.
16. HAUROWITZ, F. The Chemistry and Function of Proteins, 2nd. ed. New York and London, Academic Press. p. 6-22, 62-91, 234-2441, 1963.
17. HEGSTED, D. M., R. C. MILLS, C. A. ELVEHJEM y E. B. HART. Choline in the Nutrition of Chicks. *J. Biol. Chem.*, 138:459, 1941.
18. HENRY, KATHLEEN M. y J. E. FORD. The Nutritive Value of Leaf Protein Concentrates Determined in Biological Test with Rats and Microbiological Methods. *J. Sci. Food Agr.*, 16:425-432, 1965.
19. KELLEY, E. G. y R. R. BAUM. Protein Amino Acid Content of Vegetable Leaf Proteins. *J. Agr. and Food Chem.*, 1:680-683, 1953.
20. KULKARNI, LEELA y KAMALA SOHONIE. Non-Protein Nitrogen in Vegetables. *Indian J. Med. Res.*, 44:511-518, 1956.
21. LIMA, IRACEMA H., T. RICHARDSON y M. A. STAHMANN. Fatty Acids in some Leaf Protein Concentrates. *J. Agr. and Food Chem.*, 13:143-145, 1965.
22. MANNA, L., y S. M. HAUGE. A Possible Relationship of Vitamin B13 to Orotic Acid. *J. Biol. chem.* 202:91-96, 1953.

23. MERTZ, E. T. y R. BRESSANI. Studies on Corn Proteins. I. A. New Method of Extraction. *Cereal Chem.*, 34:63-68, 1957.
24. MEYER, Lilliam HOUGHLAND. Food Chemistry, New York, Reinhold Publishing Corporation, pp. 115, 138, 139, 140, 223, 358, 1960.
25. MORRISON J. E. y N. W. PIRIE. Large Scale Production of Protein from Leaf Extracts. *J. Sci. Food Agr.*, 12:1-5, 1961.
26. National Academy of Sciences - National Research Council. Evaluation of Protein Quality. Washington, D. C., Capítulo III, p. 23-37, 1963 (Publication 1100).
27. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 7th ed. Washington, D. C. pp. 320, 346, 1950.
28. OOMEN, H. A. P. C. Vegetable Greens, A Tropical Undevelopment. *Chronica Horticulturae*, 4:3-5, 1964.
29. ORR, M. y B. K. Watt. Amino Acid Content of Foods. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C., 1957 (Home Economics Research Report No. 4).
30. PIRIE, N. W. The Selection and Use of Leafy Crops as a Source of Protein for Man Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry. Oxford, England, Pergamin Press, p. 53-60, 1963.
31. PIRIE, N. W. Non-conventional Protein Sources. Papers read at the Advances Study Course, Cambridge, September 1962. In: Recent Advances in Food Science. London, Butterwarthe, vol. 3, p. 87-99, 1963.
32. PIRIE, N. W. The Need for New Thinking on Food Production. *J. Agr. Soc. Univ. Coll. Wales*, p. 44, 1963.
33. ROJAS, U. Elementos de Botánica General. Guatemala, C. A., Tipografía Nacional, pp. 1148, 440, 577, 1174, 1175, 578, 1936.
34. ROGERS, D. J. y M. MILNER. Aminoacid Profile of Manioc Leaf Protein in relation to Nutritive Value. *Economic Botany*, 17:211-216, 1963.

35. SUR, B. K. Nutritive Value of Lucerne-Leaf Proteins. Biological Value of Lucerne Proteins and their Supplementary relations to Rice Proteins Measured by Balance and Rat-Growth Methods. Brit. J. Nut., 15:419-424, 1961.
36. FLORES, Marina, con la colaboración de Zoila Flores, Berta García y Yolanda Gularte: Tabla de Composición de Alimentos de Centro América y Panamá. 4a. ed. Guatemala, C. A., Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Talleres Gráficos de IN-CAP, enero de 1960.
37. VALLI, A. DEVI, N. A. N. RAO y P. K. VIJAYARAGHAVAN. Isolation and Composition of Leaf Protein from Certain Species of Indian Flora. J. Sci. Food. Agr., 16:116-120, 1965.
38. WILSON, R. F. y J. M. A. TILLEY. Aminoacid Composition of Lucerne and of Lucerne and Grass Protein Preparations. J. Sci. Food Agr., 16:173-178, 1965.
39. WATERLOW, J. C. The absorption and Retention of Nitrogen from Leaf Protein by Infants Recovering from Malnutrition. Brit. J. Nut., 16:531-540, 1962.

CUADRO No. 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS USADAS EN LOS EXPERIMENTOS BIOLOGICOS¹

Ingredientes	Dietas No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Bledo secado al horno	30.60	—	—	—	—	—	—
Quilete	—	27.40	—	—	—	—	—
Chupilin	—	—	34.85	—	—	—	—
Quixtán	—	—	—	29.40	—	—	—
Precipitado de blédo	—	—	—	—	17.10	—	—
Bledo liofilizado	—	—	—	—	—	33.80	—
Caseína (libre de vitaminas)	—	—	—	—	—	—	11.20
Minerales ²	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Aceite de semilla de algodón	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Aceite de hígado de bacalao	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Almidón de maíz	59.40	62.60	55.15	60.60	72.90	56.20	78.80
TOTAL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Solución de vitaminas ³	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

¹ Las dietas con un contenido proteico de 20% tenían la misma composición; la proteína se elevó al nivel deseado a expensas del almidón.

² Hegsted et al (17).

³ Manna y Hauge (22).

Medio de extracción	Muestra		% de distribución del nitrógeno					
	Peso g	N %	N %	g	Extraído	En residuo	Perdido	Precipitado 2
Prensa	254.0	0.58	1.47	15.64	80.35	4.01	—	—
Prensa y licuadora	59.0	2.03	1.20	15.84	52.17	16.35	—	—
Licuadora agua	370.0	0.58	2.15	30.80	42.30	26.90	5.58	5.58
Licuadora NaOH 0.33%	126.0	0.70	0.88	46.59	47.72	5.69	—	—
Licuadora NaOH 1%	50.0	0.80	0.40	35.00	62.50	2.50	—	—
Licuadora H ₂ BO ₄ 10%	75.0	0.72	0.54	27.80	68.51	3.69	—	—
Licuadora Na ₂ SO ₃ + CuSO ₄ a pH 12	65.0	0.58	0.38	83.40	11.60	5.00	57.0	57.0
Licuadora NaOH a pH 9	0.519	0.58	3.57	62.90	35.70	1.40	30.0	30.0

1 Residuo de la prensa hidráulica usado como muestra.
2 % en peso de N precipitado en base al peso del nitrógeno total.

CUADRO No. 3 DISTRIBUCION DEL NITROGENO DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA EXTRACCION

CUADRO No. 3

ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DE LAS PLANTAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

CUADRO No. 2

Hoja	Nombre científico 1	Humedad %	Extracto etéreo %	Fibra cruda %	Nitrógeno total 2 %	Nitrógeno total 3 %
Kikuyú	<i>Pennisetum clandestinum</i>	84.2	0.60	4.35	0.58	3.67
Bledo	<i>Amaranthus dubius</i>	87.4	0.70	1.30	0.78	6.19
Té de limón	<i>Citrus andropogon</i>	71.3	1.02	9.70	1.87	6.52
Macay	<i>Solanum nigrum</i>	80.7	0.60	1.60	1.40	7.25
Chipilín	<i>Crotalaria longirostrata</i>	81.9	0.54	1.80	1.21	6.69
Milpa	<i>Zea mays</i>	85.4	0.60	9.80	0.92	6.30
Soya	<i>Glycine max</i>	87.3	0.83	1.45	0.82	6.46
Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i>	85.1	0.89	1.80	1.39	9.33
Ramio	<i>Boehmeria nivea</i>	80.4	0.55	1.30	0.85	4.34
Citronela		72.4	1.19	7.60	1.92	6.96
Quixtán		85.8	0.97	5.86	1.33	9.37
Bagazo de citronela		14.1	10.5	22.7	1.08	1.26
Bagazo de té de limón		14.5	3.6	32.4	1.18	1.38

1 Vaseo referencia (33).

2 En base fresca.

3 En base seca.

1 Véase nota 2 al pie del Cuadro No. 3.

Condición de la muestra	Medio de extracción	Muestra		% de distribución del nitrógeno		
		Peso g	N %	En residuo y no precipitable	En precipitado 1	
Fermentada	Agua	248	0.27	0.67	97.02	2.98
	NaOH a pH 9	273	0.27	0.74	89.19	10.81
	CuSO ₄ + Na ₂ SO ₃ a pH 12	213	0.27	0.58	94.83	5.17

Condición de la muestra	Medio de extracción	Muestra		% de distribución del nitrógeno		
		Peso g	N %	En residuo y no precipitable	En precipitado 1	
No fermentada	Agua	422	1.08	4.56	94.08	5.92
	NaOH a pH 9	495	1.08	5.34	94.38	5.62
	CuSO ₄ + Na ₂ SO ₃ a pH 12	495	1.08	5.34	89.71	10.29

EXTRACCION DE COMPUESTOS NITROGENADOS DEL BAGAZO DE CITRONELA

CUADRO No. 5

CUADRO No. 4

EXTRACCION DE COMPUESTOS NITROGENADOS DEL BAGAZO DE TE DE LIMON

Condición de la muestra	Medio de extracción	Muestra		% de distribución del nitrógeno		
		Peso g	N %	En residuo y no precipitable	En precipitado 1	
No fermentada	H ₂ O	190	1.18	2.24	94.64	5.36
	NaOH a pH 9	270	1.18	3.19	97.49	2.51
	CuSO ₄ + Na ₂ SO ₃ a pH 12	215	1.18	2.54	87.87	12.13
Fermentada	H ₂ O	195	0.27	0.53	96.23	3.77
	NaOH a pH 9	255	0.27	0.69	96.65	4.35
	CuSO ₄ + Na ₂ SO ₃ a pH 12	220	0.27	0.59	96.61	3.39

1 Véase nota 2 al pie del Cuadro No. 3.

1 Véase nota 2 al pie del Cuadro No. 3.

Solvente	Muestra seca		% de distribución del nitrógeno				Distribución del N extraído	
	Peso g	N %	Extraído	En residuo	Perdido	En precipitado 1	No precipitado	
Agua	170.00	5.5	27.6	71.2	1.2	22.1	5.5	
NaOH a pH 9	155.35	4.48	76.2	21.7	2.1	61.1	15.1	

DISTRIBUCION DEL NITROGENO DE LA HOJA DE BLEDO EN LOS PRODUCTOS DE EXTRACCION

7 CUADRO No. 7

6 CUADRO No. 6

EXTRACCION DE LA PROTEINA FOLIAR DE VARIAS PLANTAS, UTILIZANDO AGUA

Hoja	Muestra fresca			% de distribución del nitrógeno		
	Peso g	N %	N g	En residuo y no precipitable	En precipitado 1	
Bledo	169.0	0.78	1.30	78.40	21.60	
Soya	498.0	1.82	9.06	83.50	16.50	
Macay	440.0	1.32	3.81	98.71	1.29	
Rarnie	200.0	0.85	1.70	98.85	1.15	
Chipilín	200.0	1.21	2.42	89.70	10.30	
Kikuyú	250.0	0.58	1.45	99.29	0.71	
Quixán	200.0	1.33	2.66	87.20	12.80	

1 Véase nota 2 al pie del Cuadro No. 3.

	Harinas de			
	Quixtán	Chipilín	Quilote	Bledo**
	g/100gN			
Humedad	13.20	10.20	8.90	11.10
Extracto etéreo	6.70	4.40	4.50	4.30
Fibra cruda	11.70	12.10	10.40	10.00
Nitrógeno	5.45	4.59	5.85	5.16
Leucina	0.36	0.44	0.46	0.37
Isolucina	0.26	0.33	0.28	0.28
Lisina	0.28	0.42	0.36	0.34
Metionina	0.03	0.03	0.04	0.04
Fenilalanina	0.17	0.20	0.19	0.18
Treonina	0.14	0.26	0.21	0.14
Triptofano	0.09	0.11	0.06	0.07
Valina	0.34	0.45	0.42	0.26

* Secado al horno.
** Liofilizado.

ANÁLISIS PROXIMAL Y CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LAS HARINAS FOLIARES
6 CUADRO No. 8

CUADRO No. 8

CONTENIDO DE NITRÓGENO Y DE AMINOÁCIDOS DE LA HOJA DE BLEDO EN LOS PRODUCTOS DE EXTRACCIÓN¹

Aminoácidos	Precipitado desecado ²			Licor remanente			Residuo desecado			Caseína ³	
	g/100g	g/gN	g/100g	g/100g	g/gN	g/100g	g/gN	g/100g	g/100g	g/gN	
Leucina	2.78	0.30	0.57	0.19	0.14	0.08	10.04	0.63			
Isolucina	1.64	0.18	0.97	0.33	0.02	0.01	6.55	0.41			
Lisina	2.27	0.24	0.79	0.27	0.23	0.13	8.01	0.50			
Metionina	0.46	0.05	0.12	0.04	0.03	0.02	3.08	0.19			
Fenilalanina	1.38	0.15	0.53	0.06	0.15	0.08	5.39	0.34			
Treonina	1.35	0.14	0.53	0.06	0.14	0.08	4.27	0.27			
Triptofano	0.58	0.06	0.24	0.03	0.03	0.02	1.33	0.08			
Valina	2.19	0.23	0.83	0.28	0.34	0.19	7.39	0.46			
Nitrógeno	9.37	—	2.96	—	1.77	—	16.00	—			

¹ Solvente: solución de NaOH, a un pH de 9.

² El concentrado proteico de bledo mostró la siguiente composición química proximal: humedad, 6.16%; extracto etéreo, 1.88%; fibra cruda 3.92%, y nitrógeno 9.37%.

³ Véase referencia (29).

CRECIMIENTO E INDICE DE EFICIENCIA PROTEICA DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS A BASE DE HARINAS DE HOJAS DESHIDRATADAS Y CON UN CONCENTRADO PROTEICO FOLIAR DE BLEDO^{1, 2}

CUADRO No. 10

Proteína	% de proteína en dietas		Peso promedio, g		Alimento consumido, g		Proteína consumida, g		Indice de eficiencia proteica ³	Mortalidad
	Inicial	Final	Inicial	Final	Incremento	Incremento	g	g		
Bledo (horno)	9.6	53	77	24	160.4	15.39	1.56	0/8		
Bledo (liofilizado)	9.3	52	81	28	182.1	16.94	1.65	0/8		
Quilete (horno)	9.3	54	60	6	122.3	11.37	0.53	0/8		
Chipilín (horno)	10.2	53	72	19	140.9	14.37	1.33	0/8		
Quixtán (horno)	9.8	53	48	—	105.0	10.29	—	0/8		
Concentrado proteico del bledo	10.0	53	105	52	241.6	24.16	2.15 ⁴	0/8		
Caseína (usada como control)	9.9	53	153	100	277.8	27.50	3.63	0/8		

¹ No. de animales por grupo = 8: 4 o y 4 +. ³ PER = $\frac{\text{Aumento de Pese}}{\text{Proteína consumida}}$; 3 semanas.

² Duración del experimento: 21 días.

⁴ El PER del concentrado proteico de bledo obtenido a los 28 días fue de 1.91.

EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON METIONINA SOBRE EL CRECIMIENTO E INDICE DE EFICIENCIA PROTEICA DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS A BASE DE HARINAS DE HOJAS DESHIDRATADAS^{1, 2}

CUADRO No. 11

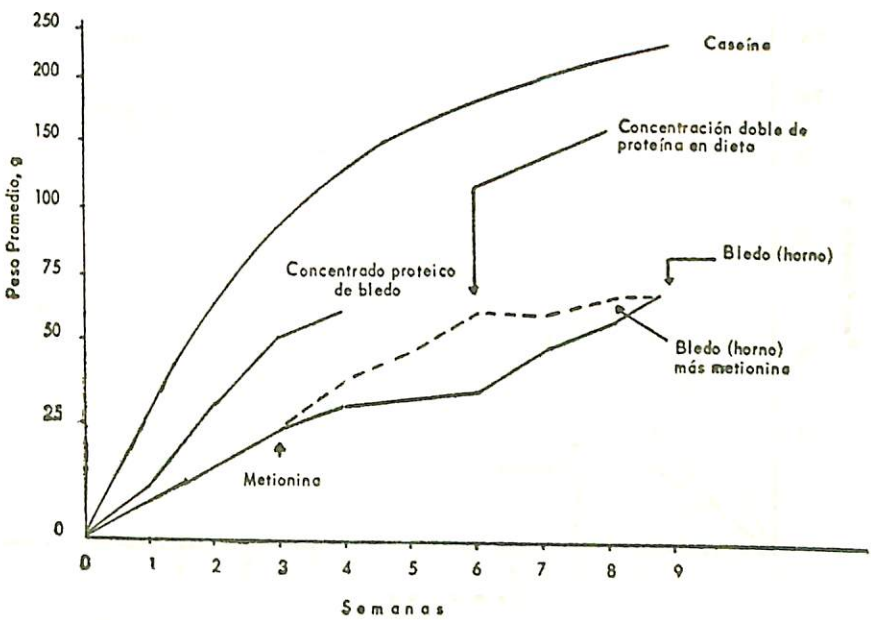
Ingredientes	% de proteína en dietas		Peso promedio, g		Alimento consumido, g		Proteína consumida, g		Indice de eficiencia proteica ³	Mortalidad
	Inicial	Final	Inicial	Final	Incremento	Incremento	g	g		
Bledo (horno) + 0.2% metionina	9.6	78	115	37	20.50	19.68	1.88	0/4		
Bledo (horno)	9.6	77	87	10	168.1	—	1.05	0/4		
Bledo liofilizado + 0.2% metionina	9.4	82	100	18	171.9	16.13	1.12	0/4		
Bledo liofilizado	9.4	81	103	22	197.9	18.60	1.56	0/4		
Chipilín (horno) + 0.2% metionina	10.2	72	140	68	271.3	27.67	2.46	0/4		
Chipilín (horno)	10.2	72	99	27	192.5	19.64	1.37	0/4		
Quilete (horno) + 0.2% metionina	9.3	60	66	6	130.7	12.15	0.49	1/4		
Quilete (horno)	9.3	—	—	—	—	—	—	3/4		
Quixtán (horno) + 0.2% metionina	9.8	48	53	5	97.3	9.53	0.52	0/4		
Quixtán (horno)	9.8	49	53	4	100.9	9.80	0.41	0/4		
Caseína	10.0	153	234	81	371.6	37.16	2.18	0/8		

¹ Véase nota del mismo número al pie del Cuadro No. 10.

² Subgrupo A = Control: 2 o, 2o. Subgrupo B = Suplementación con metionina: 2¹ o, 2⁺ o.

³ Véase nota del mismo número al pie del Cuadro No. 10.

Figura 1
CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON PROTEINA FOLIAR Y
CONCENTRADO PROTEICO DE BLEDO*



* Gráfica trazada en papel semilogarítmico

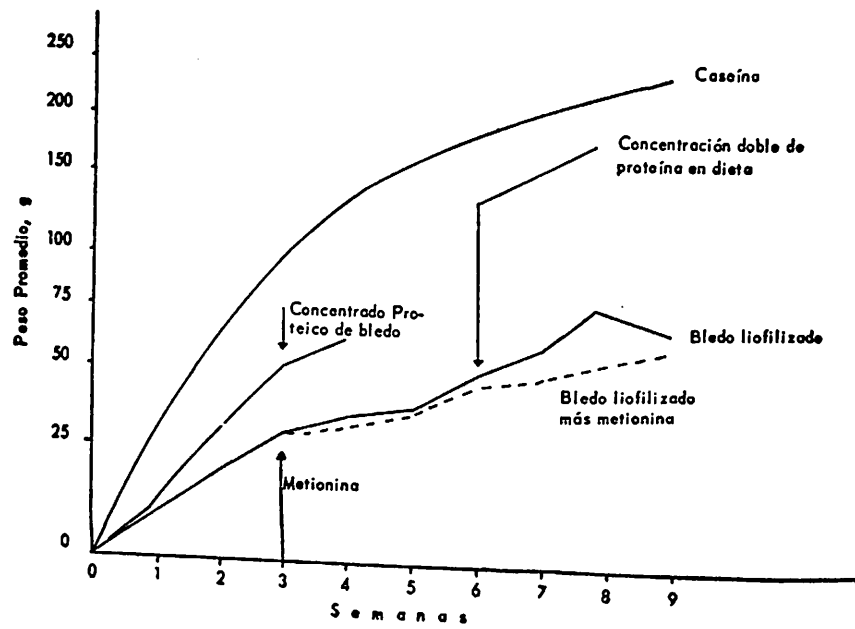
CUADRO No. 12

EFFECTO DEL NIVEL PROTEICO Y DE LA SUPLEMENTACION CON METIONINA SOBRE EL CRECIMIENTO E INDICE DE EFICIENCIA PROTEICA DE LAS RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS A BASE DE HARINAS DE HOJAS DESHIDRATADAS 1, 2

Ingredientes	% de proteína en dietas	Peso promedio, g			Alimento consumido, g		Proteína consumida, g		Indice de eficiencia proteica 3	Mortalidad
		Inicial	Final	Incremento	g		g			
Bledo (horno)	19.9	87	130	43	202.6	40.19	1.07	0/4		
Bledo (horno) + 0.2% metionina	9.6	116	126	10	217.8	20.90	0.49	0/4		
Bledo (horno)	20.1	102	118	16	256.6	51.57	0.32	0/4		
Bledo (horno) + 0.2% metionina	9.4	99	111	11	194.1	18.24	0.60	0/4		
Chipilín (horno)	19.4	99	153	54	254.6	49.39	1.09	0/4		
Chipilín (horno) + 0.2% metionina	10.2	140	208	68	359.8	36.70	1.87	0/4		
Quilete (horno)	19.8	—	—	—	—	—	—	3/4		
Quilete (horno) + 0.2% metionina	9.3	66	66	—	127.5	11.86	—	1/4		
Quixtán (horno)	19.7	53	71	18	126.1	24.46	0.73	0/4		
Quixtán (horno) + 0.2% metionina	9.8	53	72	19	126.8	12.42	1.54	0/4		
Caseína	10.0	234	292	58	375.1	37.51	1.54	0/8		

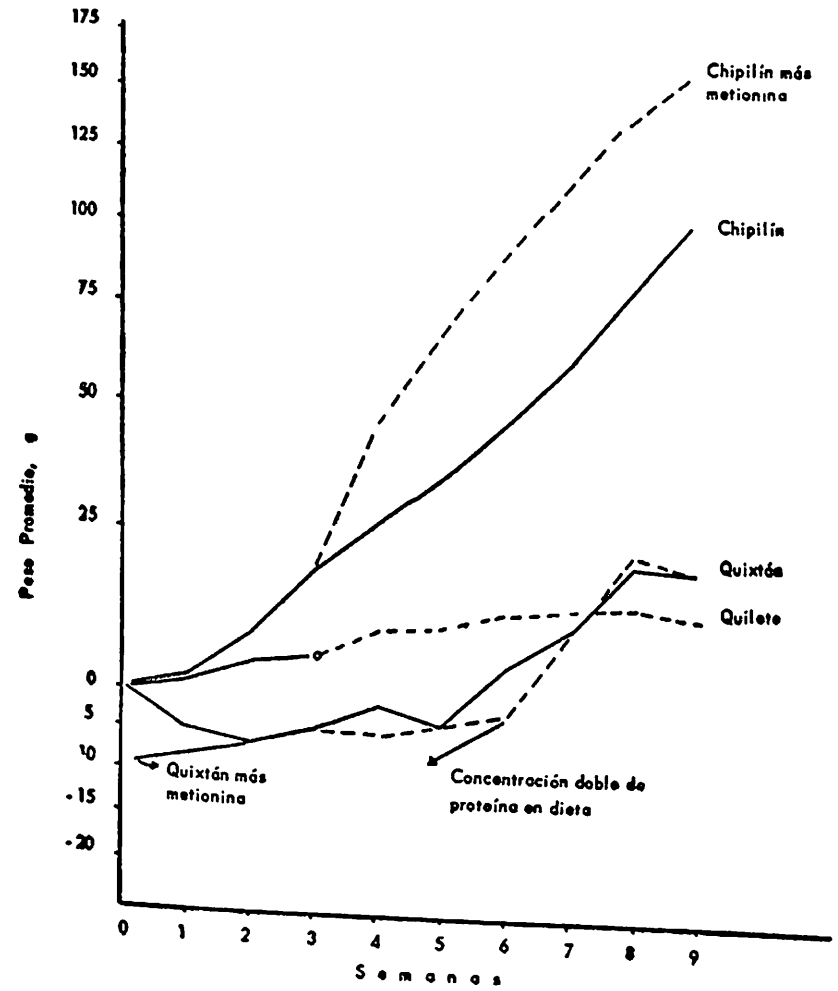
1, 2, 3 Véase notas del mismo número al pie del Cuadro No. 10.

Figura 2
 CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON
 PROTEINA FOLIAR DE BLEDO *



* Gráfica trazada en papel semilogarítmico

Figura 3
 CRECIMIENTO DE RATAS ALIMENTADAS CON PROTEINA
 DE VARIAS HOJAS *



* Gráfica trazada en papel semilogarítmico

HILDA DE LEON ZUNIGA.

Vo. Bo.,

Dr. Edgar Braham
Asesor.

Imprimase,

Lic. Rafael Letona Romero
Decano.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DECANATO

GUATEMALA, C. A.



BIBLIOTECA CENTRAL
USAC



4701112385