

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

Te  
UVG  
Qui  
E25v  
1985

EXTRACCION, EVALUACION QUIMICA-NUTRICIONAL  
Y UTILIZACION DE JUGO DE CHIPILIN  
(Crotalaria longirostrata)  
EN ALIMENTACION HUMANA

LUIS ALFREDO GARCIA VELA

Guatemala

1985

EXTRACCION, EVALUACION QUIMICA-NUTRICIONAL  
Y UTILIZACION DEL JUGO DE CHIPILIN  
(Crotalaria longirostrata)  
EN ALIMENTACION HUMANA

Universidad del Valle de Guatemala  
Facultad de Ciencias y Humanidades

EXTRACCION, EVALUACION QUIMICA-NUTRICIONAL  
Y UTILIZACION DEL JUGO DE CHIPILIN  
(Crotalaria longirostrata)  
EN ALIMENTACION HUMANA

Luis Alfredo García Vela

Trabajo de Investigación presentado  
para optar al grado académico de

Licenciado en Química

Guatemala

1985

Mi gratitud infinita

A Dios

A mis padres

Agradezco sinceramente al Dr. Ricardo Bressani por su invaluable ayuda en consejos, orientación y estímulo, sin los cuales no habría sido posible realizar este trabajo, a la Ing. María Lillian Paiz por su acertada asesoría y al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá por el uso de sus laboratorios y equipo.

## RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo principal elaborar un alimento humano, rico en proteína y otros nutrientes, a base de Chipilín (Crotalaria Longirostrata), en la forma de un jugo de verduras.

Se encontró un contenido de proteína de 4.7% en la planta fresca de Chipilín. Esta proteína demostró en ensayos biológicos en ratas que, aunque es deficiente en metionina, es de calidad adecuada al utilizarla como complemento proteínico en dietas de maíz y frijol. Asimismo, se comprobó que el Chipilín es buena fuente de calcio, fósforo y hierro.

Se optimizaron las condiciones de extracción del jugo de las hojas y peciolo de la planta, en lo concerniente a la relación biomasa/volumen de solvente, tiempo de extracción y solvente. La relación biomasa/volumen de solvente más adecuada fue de 1 a 3 (g/g) con un tiempo no mayor de 4 minutos en una licuadora. El solvente de mayor eficiencia de extracción fue una solución de sulfito de sodio 0.004M a pH 9 ( $\mu = 0.012$ ), con la cual se obtuvo 41.8% de proteína extraída. Este jugo contenía un promedio de 1.5% de proteína.

El alimento a base de jugo de Chipilín se formuló con jugo de Tomate, jugo de Limón, sal y azúcar. A pesar de los aditivos, el sabor no fue del todo aceptable.

Durante el desarrollo del trabajo se obtuvieron diferentes subproductos: los tallos y peciolo gruesos y el residuo de extracción. Los tallos y peciolo gruesos contenían 2.0%

y 6.1% de proteína y fibra cruda respectivamente. El residuo de extracción acusó 5.5% y 6.7% de proteína y fibra. Lo anterior sugiere que ambos subproductos pueden ser utilizados en la alimentación de rumiantes. El jugo de Chipilín se deproteinizó y sirvió como sustrato para el crecimiento de microorganismos productores de proteína. Esto dio dos productos, la proteína del jugo y la proteína producida por el microorganismo.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	8
III. OBJETIVOS	23
IV. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION	24
V. MATERIALES Y METODOS	25
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	37
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. SUGERENCIAS PARA ESTUDIO FUTURO	51
X. BIBLIOGRAFIA	52

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO		Página
1	Resumen de resultados de análisis de diferentes investigadores sobre el Chipilín	60
2	Contenido de aminoácidos esenciales en microorganismos	61
3	Comparación de contenidos de aminoácidos en diferentes fuentes de proteína	61
4	Composición química de diferentes partes del Chipilín	62
5	Extracciones de jugo de Chipilín bajo diferentes condiciones	63
6	Composición química del extracto liofilizado y del residuo	64
7	Resultados de evaluación biológica de dietas conteniendo harina de Chipilín y extracto liofilizado como complemento de una dieta basal de maíz y frijol	65
8	Resultados de evaluación biológica de dietas conteniendo harina de Chipilín y extracto liofilizado como única fuente de proteína y efecto complementario a una dieta de maíz/frijol de una mezcla liofilizada de jugos de Chipilín y tomate.	66
9	Precipitación de proteína por cambio en el pH	67
10	Balance de Materiales	68
11	Composición química de tres plantas consumidas en Guatemala	69
FIGURA		
1	Representación gráfica de precipitación de proteína según el pH	67
2	Balance de Materiales	68

## I. INTRODUCCION

La malnutrición a nivel mundial alcanza una magnitud asombrosa, la cual, además es cada día mayor. El problema de personas deficientemente o mal alimentadas es antiguo. Siempre han existido las grandes masas que, por diversas razones, no poseen los medios para agenciarse una buena alimentación. El Dr. Arnold E. Schaefer, en una conferencia celebrada en la Universidad de Tulane en 1963, manifestó: "Varias autoridades han calculado que entre una tercera parte y la mitad de la población mundial está deficientemente o mal alimentada y que la malnutrición mata 25 millones de personas al año." (55)

El porcentaje de población mal alimentada aumenta si solo se analizan los países "en vías de desarrollo". En estos lugares existe una gran necesidad de alimentos ricos en proteína a bajo costo pues, los alimentos de origen animal, fuentes de la mejor proteína, son sumamente escasos por la poca producción de los mismos.

A principios de la década de los sesenta, la mayoría de los países en desarrollo tenían un suministro de proteínas inferior a sus necesidades.

Cerca de 1970, en la región de Africa, al sur del Sahara, la diferencia entre las necesidades de proteínas y los suministros se calculaba en unas 270,000 toneladas (66).

Como resultado de la malnutrición, se observa una alta y creciente tasa de mortalidad infantil. Es la niñez, por su edad, el grupo poblacional más vulnerable.

Según encuestas publicadas en la década de los setentas, en 1977 aproximadamente cien millones de niños menores de cin-

co años estaban desnutridos moderada o severamente (61).

No solo los países en vías de desarrollo sufren las consecuencias de la desnutrición. En 1967 se reveló, en el congreso de los Estados Unidos de América, una incidencia inesperadamente alta de hambre y desnutrición en ese país (53).

Conforme el tiempo pasa, las causas de la desnutrición cambian muy poco, siempre teniendo como denominador en común la falta de recursos económicos suficientes para obtener una alimentación completa.

Se han señalado varios factores causantes de la desnutrición:

1) En 1965, gran parte de los recursos agrícolas de las naciones en vías de desarrollo se dedicaban a los cultivos de exportación, los cuales producían divisas importantes para su economía. Por eso, las políticas gubernamentales tendían a fomentar los cultivos comerciales de exportación a expensas de los cultivos de alimentos (55).

2) Según Shaw, en 1965 la mayoría de la población de las naciones mencionadas, no podían comprar alimentos de buena calidad protéica. Algunos países de Centro América exportaban grandes cantidades de carne en vista que los consumidores locales no tenían recursos económicos para comprarlas. De esta forma se perdía una fuente importante de proteínas (55).

En la actualidad, el problema sigue siendo el mismo. En 1983 hubo una producción bruta de 131.4 millones de libras de carne en canal en Guatemala (8). Según el Banco de Guatemala, de esa producción, el mercado interno consumió 86.8 millones de

libras. Si se agrega que se consumieron 25.1 millones de libras de vísceras y menudos, el consumo per cápita fue de 14.7 libras de carne al año, es decir, poco más de media onza diaria. Aunque la cantidad exportada, solo a los Estados Unidos de América, fue de 18.9 millones de libras, a un precio promedio de Q.O.81 la libra, los guatemaltecos no consumieron más de lo que sus recursos económicos les permitieron pues, en ese año, el precio por libra de carne, en las carnicerías locales, no era menor que el mencionado precio de exportación (8).

Sanjur (53) menciona otras causas de malnutrición, que son: la producción, distribución y preparación de la comida.

Según él, la producción de la comida depende de:

1. El ambiente natural, clima del país.
2. Desarrollo tecnológico del país.
3. Fuerzas económicas (economía de subsistencia, nivel de poder adquisitivo).
4. Fuerzas sociales (nivel de educación, sistema de tenencia de la tierra).

El aspecto de la distribución de la comida lo divide Sanjur en cuatro niveles (53):

1. Distribución de comida entre naciones.
2. Distribución de comida entre regiones de un país.
3. Distribución de comida en una comunidad.
4. Distribución de comida en una familia.

Flores, en 1976, (26), afirmó que en Centro América, cuando las familias pobres tenían carne, ésta era consumida por los adultos mientras que, la leche y los huevos, eran exclusivamente para los niños.

En lo que se refiere a preparación de comida, es sencillo notar que los métodos utilizados en preparar un plato influyen directamente en la aceptabilidad del mismo (53).

La ausencia o falta de aplicación de normas de calidad ha agudizado el problema (55). Debido a que, a la fecha, no existe un estricto control de la calidad de los alimentos, muchas fábricas y empresas se dedican a manufacturar y/o envasar productos que no son fieles, en su contenido nutricional, a lo que se ofrece en el envase de ellos. De esa cuenta, muchas familias gastan un alto porcentaje de sus ingresos en alimentos de mala calidad nutricional.

Por estas razones es que el problema de la desnutrición se ha tratado de resolver a nivel mundial.

Proporcionando una mejor atención médica pueden lograrse mejoras importantes, pero en última instancia, el futuro de los niños en los países en desarrollo depende de los alimentos de que puede disponerse para sostenerlos durante su infancia y en su madurez (66).

Por un lado se han desarrollado métodos adecuados para una mejor producción agrícola, en calidad y cantidad y por otro lado, diferentes investigadores, como nutricionistas y otros, han contribuido utilizando combinaciones de proteínas vegetales para elaborar fórmulas alimenticias de alto valor nutritivo. Todas las mezclas desarrolladas tienen el fin de suplementar la dieta normal, nunca de suplirla.

Se ha conseguido convertir residuos de semillas oleaginosas, como maní, soya, algodón, en alimentos de alto valor nutritivo, adecuados al consumo humano. Sin embargo, en 1970, dichos pro-

ductos eran empleados prácticamente solo para alimento animal (66).

Al alimentarse de vegetales, los animales transforman la proteína vegetal en una proteína de mejor calidad. Además, en la forma de carne, el producto resulta más deseable para el humano.

Lo lamentable en el caso de las semillas oleaginosas no es tanto que la proteína extraída de ellas fuera utilizada para la alimentación de animales, sino que sus exportaciones constituyen una merma considerable de las proteínas disponibles en las zonas necesitadas(66).

Algunos países urgentemente necesitados de proteína para su población y con acceso al mar, se han interesado en los pescados y crustáceos como fuente de proteína, convirtiéndolos en harinas, generalmente. Se han producido concentrados, para alimento humano, que puedan ser añadidos a los alimentos corrientes para compensar las deficiencias en aminoácidos, pero su uso ha sido limitado.

La necesidad de solucionar el problema ha dado lugar a que muchos investigadores dediquen su tiempo al uso de proteína vegetal. Existen muchas plantas ricas en proteína y algunas son explotadas comercialmente como fuentes de ella, tal el caso de las oleaginosas ya mencionadas, soya, maní, semilla de algodón, como también la alfalfa y otras leguminosas.

Se han logrado adelantos en el conocimiento de los requerimientos de proteínas y de aminoácidos, en particular en el concepto del papel fundamental que la composición de aminoácidos

desempeña como determinante del valor biológico de una proteína (13).

De esa forma, se sabe de diferentes científicos que han desarrollado mezclas vegetales para alimento humano, como Sénecal en Africa Occidental (trabajó con maicillo y maní), de Maeyer en el Congo Belga, Dean en Uganda (usando soya y banana), los científicos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP (usando diversos recursos vegetales), y otros.

Se ha conseguido formular alimentos muy buenos y baratos (de consumo popular) como la INCAPARINA, desarrollada en el INCAP, cuya fórmula original es: harina de maíz 28%, levadura torula 3%, harina de semilla de algodón 38%, maicillo molido 28% y harina de kikuyú deshidratado 3% (12).

Profundizando más en el tema de la proteína vegetal, algunos experimentos han mostrado que las hojas pueden ser una nueva fuente de proteína de alta productividad (11).

Según Chrispeels (18), la proteína de hojas es actualmente, en el mundo, la fuente más grande de proteína fácilmente disponible.

Finalmente, es el consumidor el juez final en los actuales esfuerzos por proporcionar más proteínas. En todos los países suele comerse algo debido a toda clase de "debilidades" y preferencias. De esa forma, un cereal altamente nutritivo puede no resultar aceptado si la población prefiere uno ya conocido, aunque sea de mala calidad.

Claro está que, cuanto más costoso y difícil de obtener sea un alimento, mayores serán los grupos que tengan que pasar sin él.

Pensando particularmente en la realidad guatemalteca, se sabe que existen varias plantas ricas en nutrientes y que no son utilizadas de una forma tal que dichos nutrientes sean aprovechados. Una de estas plantas es el Chipilín (Crotalaria longirostrata), el cual ha sido motivo de investigación, arrojando resultados muy esperanzadores en cuanto a su utilización como alimento humano.

En base a las consideraciones anteriores, y con el propósito de obtener una fuente de proteína adicional y económicamente asequible al pueblo de Guatemala, en este estudio se considerarán las posibilidades de utilización del Chipilín para la obtención de un jugo rico en nutrientes, para consumo humano y de subproductos para consumo animal.

## II. REVISION DE LITERATURA

### A. Chipilín (Crotalaria longirostrata)

#### 1. Descripción y distribución geográfica

El Chipilín es una planta ampliamente conocida en el territorio guatemalteco, donde es utilizada como condimento en diferentes comidas.

Según Standley y colaboradores (57), el Chipilín es tal vez la especie de *Crotalaria* más utilizada como comida. Las hojas tiernas son cocidas y comidas como la espinaca y otras hierbas. En todos los mercados se consiguen manojos de la planta ya que, además de crecer silvestre, también es cultivada específicamente.

La planta del Chipilín es descrita por Standley y colaboradores (57) como esencialmente anual pero a menudo persistente más de un año; erecta, a veces muy ramificada y muchas veces de un metro o más. Es sembrada en toda Guatemala, México occidental y sur y el resto de los países centroamericanos. Existe en ambos hemisferios, más que todo en regiones tropicales.

#### 2. Taxonomía

División: Spermatophyta

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Género: Crotalaria

Especie: longirostrata

(Hook and Arn) (57)

## B. Composición química y valor nutritivo del Chipilín

El Chipilín ha sido motivo de investigación en los Estados Unidos (40,57) y, principalmente, en Guatemala en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (3,21).

Todos los autores coinciden en asignar un alto contenido de nitrógeno al Chipilín así como también están de acuerdo al afirmar que es rico en otros nutrientes.

Arroyave y colaboradores(3) mencionan que las hojas verdes del Chipilín son una buena fuente de carotenos y ácido ascórbico, además de mostrar un alto contenido en calcio, hierro y niacina.

Es importante hacer notar que, tener un contenido alto de un nutriente dado, no implica que el alimento sea una buena fuente de ese nutriente, pues se debe tomar en cuenta la cantidad del alimento que se consume o puede consumirse ordinariamente; asimismo la biodisponibilidad de los nutrientes debe tomarse en consideración. Por otra parte, un alimento con un contenido relativamente bajo en un nutriente puede contribuir apreciablemente a llenar los requerimientos del mismo, si es posible consumirlo en cantidades suficientemente grandes.

De León (21) efectuó la evaluación biológica del Chipilín utilizando una dieta con la siguiente composición: 34.85% de Chipilín, 55.15% de almidón de maíz, 4% de minerales, 5% de aceite de semilla de algodón, 1% de aceite de hígado de bacalao y 5 ml de solución de vitaminas. Con esto obtuvo un índice de eficiencia protéica (PER) de 1.33. Al agregar un 0.2% de metionina a la misma dieta, el PER fue de 2.46. Su conclusión fue que la proteína del Chipilín es deficiente en metionina y que vale la pena hacer otros estudios de suplementación en los cuales se

agreguen diferentes niveles de metionina o de otros aminoácidos con el objeto de establecer la posibilidad de obtener mejoras en el valor nutritivo de la proteína de Chipilín.

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos por diferentes investigadores para el análisis químico del Chipilín.

El patrón de aminoácidos del Chipilín reportado por De León en 1966 (21) es el siguiente:

<u>Aminoácido</u>	<u>g/gN</u>
Leucina	0.44
Isoleucina	0.33
Lisina	0.42
Metionina	0.03
Fenilalanina	0.20
Treonina	0.26
Triptofano	0.11
Valina	0.45

C. Factores antinutricionales en especies del género Crotalaria

Se ha demostrado (19, 48, 50) que algunas especies del género Crotalaria son tóxicas. Entre ellas se encuentran las siguientes: C. spectabilis roth, C. sagittalis, C. juncea, C. burkeam, C. retusa, C. dura y C. globifera.

El principio tóxico de estas plantas es la monocrotalina (C H O N), un alcaloide que disminuye la presión sanguínea en <sup>16 23 6</sup> perros (19,48).

Es posible aislar este alcaloide de todas las partes de plantas tiernas y maduras aunque las semillas contienen la concentración más alta (19).

Además de la monocrotalina, se han encontrado en todas las partes de la planta, taninos, esteroides insaturados y ácidos orgánicos (19).

La especie longirostrata no ha sido sujeta a estudios químicos pero se sabe que causa sueño en personas (57).

#### D. Métodos para extracción de proteínas

Un concentrado protéico identifica a un producto por su alto contenido de proteína mientras que un asilado protéico se refiere a proteína químicamente aislada (1). Luego de decidir cuál de estos dos productos es el que se busca, puede procederse a elaborar un método apropiado para la extracción de la proteína de la materia prima utilizada en particular.

El diseño de este método requiere la consideración cuidadosa de varios factores: los de carácter químico y los de carácter económico (1).

La actividad biológica de una proteína depende de su conformación molecular completa, por lo que, los métodos utilizados deben ser muy eficientes sin llegar a su desnaturalización. Como principios básicos se tiene que : las proteínas son sensibles al calor, a los extremos de pH y a las concentraciones altas de solventes orgánicos o detergentes (22).

En el aislamiento o concentración de la parte protéica de un material vegetal, se han utilizado diferentes procedimientos, coincidiendo todos en la técnica de utilización de un solvente como agua, acetona, acetato de etilo, etanol y muchos otros.

Cuando la materia prima tiene un alto contenido en lípidos, éstos deben ser separados previamente con un solvente adecuado.

Para la separación de la proteína de semillas oleaginosas, previa separación de los lípidos, Hanson (31) menciona un método que consiste en extraer inicialmente con una solución de una sal de un catión polivalente como  $MgCl_2$  ó  $CaCl_2$  0.008M y luego una extracción con hidróxido de sodio 0.015N. También sugiere que se evite el uso de solventes como los hidrocarburos cíclicos, clorados y otros, dañinos al personal que los manipula o que puedan dejar residuos indeseables.

Con el propósito de preparar un aislado protéico y/o un concentrado protéico de soya, Austin (6) menciona un método con los siguientes pasos:

- rompimiento y descascaramiento de las semillas
- ajuste del contenido de humedad
- extracción de los lípidos con hexano
- clarificación con alcohol diluido
- acidificación para precipitar la proteína
- lavado y secado

Wolf (67) menciona que para la extracción de proteínas de material desgrasado de soya, los solventes más eficientes son: agua - álcali diluido (pH 7-9) y cloruro de sodio acuoso (0.5 - 2.0 M). Ya que éstos son solventes "suaves", no desnaturalizan la proteína. La mejor proporción materia prima: solvente es de 1:10, seguido, no necesariamente, de una segunda extracción en proporción 1:5, ambas a temperatura ambiente (20-25°C).

En concentrados de proteínas de origen animal, el pescado es una materia prima que ha sido objeto de mucha investigación.

El mayor problema de reducir el pescado a un concentrado protéico consiste en desgrasar y desodorizar el mismo. Muchas

harinas de pescado no-desgrasadas son inestables debido a la oxidación de los lípidos que contiene. Por eso, es conveniente separar los lípidos, para lo cual se propone el uso de solventes como hexano, etanol, isopropanol y dicloruro de etileno, cuya eficacia ha sido ya comprobada (69).

En cuanto a proteína vegetal, se sabe que las hojas son una buena fuente de proteína, por lo que se han experimentado varios métodos para extraer dicha proteína de la materia cruda. Los diferentes procedimientos pueden incluir extracción con solventes, expresión del "jugo" foliar o una combinación de ellos.

Bressani y Elías (14) mencionan los que, según su opinión, son pasos esenciales para la preparación de proteína de hojas:

- molienda de las hojas con un molino de martillos y/o cuchillas
- extracción con solventes: agua, sales acuosas, agua saturada con éter, carbonato de sodio al 2% o una combinación de los anteriores
- precipitación de la proteína por ajuste del pH al punto isoeléctrico, seguido de coagulación a 80°C
- separación del precipitado por centrifugación y secado con aire caliente

Más adelante, los mismos autores opinan, sin embargo, que este método es de alto costo, rendimiento relativamente bajo y además el precipitado protéico contiene pigmentos que le dan mal sabor.

En realidad, la extracción de proteína de hojas presenta dos problemas a resolver: el proceso a nivel de laboratorio y el diseño de maquinaria capaz de procesar grandes cantidades de follaje (16).

El tratamiento convencional para el proceso de grandes cantidades de hojas frescas es secar la materia o agregarle agua. Ambos procedimientos tienen desventajas: el secado resulta caro y produce una pérdida de proteína por desnaturalización por lo que requiere extracción con álcali. Bajo estas condiciones los porcentajes de extracción son bajos. El agregar agua, presenta el problema de que la cantidad de agua que se necesita es de cuatro o cinco veces el peso de materia húmeda, lo cual dificulta también la posterior coagulación y separación del precipitado del líquido (52).

El secado artificial de gramas ofrece la posibilidad de producir, comercialmente, un concentrado rico en proteína. Sin embargo, la calidad de las gramas secas y el valor nutritivo de su proteína dependen de las técnicas de secado. La temperatura y duración del secado son factores importantes que pueden dañar el valor biológico de la proteína (70).

Por otro lado, se ha observado que los forrajes verdes son fuentes de nutrientes como provitamina A, mientras que los secados al sol son relativamente pobres en estos nutrientes. La misma proteína puede sufrir una degradación hidrolítica si el material es secado al sol (1).

Por estas razones, es conveniente evitar el secado y trabajar directamente con el material fresco. Altschul (1) menciona diferentes maneras de extraer proteína de materia fresca:

- macerar el material fresco, previamente cortado en pedazos pequeños, con agua y bajo presión, se puede agregar éter para liberar la proteína de los cloroplastos
- extracción con buffers alcalinos suaves en presencia de

alcohol o con álcali muy diluidos

- extracción con ácidos minerales diluidos calientes o ácido fórmico al 90%

Hanson (31) menciona un método para la extracción de proteína de alfalfa. Se mezcla la alfalfa con una solución acuosa de una base que no deje un residuo que afecte el sabor o utilidad del producto, y la mezcla se somete a digestión. El extracto acuoso resultante es tratado con pancreatina para convertir almidones a carbohidratos solubles, digerir lípidos y liberar hidrolisados protéicos. Después de separar los lípidos y lipoproteínas, la solución acuosa puede ser agregada a alimentos directamente o concentrada por eliminación de agua. El producto puede ser agregado prácticamente a cualquier tipo de alimento: frutas, jugos de vegetales, productos de almidón, comidas chocolatadas, carnes, sopas, galletas, dulces y otros.

Procedimientos más fáciles consisten en obtener la proteína por expresión de la materia cruda. Chrispeels y Sadava (18) afirman que si las hojas son machacadas en agua, las proteínas pueden separarse y procesarse para dar un polvo libre de celulosa: concentrado protéico de hojas.

Byers (16), por su parte, realizó un experimento con 60 especies tropicales de plantas que crecen en Ghana. Su procedimiento fue: cortar la materia en pedazos pequeños y presionar la pulpa resultante a través de una tela de algodón. A veces se agregó agua para facilitar la expresión y, en algunos casos, se repitió el proceso de extracción dos y hasta tres veces. Se prepararon muestras de la proteína extraída calentando cien mililitros del primer extracto a 80°C. El precipitado se centrifugó y lavó varias

veces con agua destilada hasta obtener un sobrenadante claro. La proteína fue secada y molida antes de su análisis cuali y cuantitativo. El porcentaje de proteína extraída varió bastante, desde 17% hasta 81.7% del contenido total de proteína, según la especie experimental.

Heath (32) menciona detalladamente lo que él llama "proceso de fraccionamiento de materia verde". Este proceso consiste en la separación de diferentes partes, de un forraje entero. El primer paso consiste en separar la materia prima en dos partes: forraje presionado o exprimido y un jugo que contiene la proteína soluble. Usando ácido o calor, la proteína del jugo puede ser precipitada para luego separarse por filtrado, produciendo un concentrado protéico de hojas, (LPC) Leaf Protein Concentrate. Puede obtenerse, comercialmente, un LPC de hasta 60% de proteína, conteniendo además, 10-15% de carbohidratos, 20-25% de lípidos y ceniza. El LPC puede ser incorporado de inmediato en la dieta humana mientras que el forraje exprimido puede darse a animales rumiantes.

Para maximizar los rendimientos de LPC debe conocerse la correcta manipulación agronómica de la planta, así como los factores de maquinaria industrial apropiados. Se sabe que la acumulación de proteína en hojas varía con la edad de la planta. Las concentraciones aumentan con la edad fisiológica hasta un punto máximo para luego disminuir. Es inmediatamente antes de este punto que debe efectuarse el corte (32).

Es de básica importancia el macerado de las hojas para una mejor eficiencia al prensarse. Se ha utilizado comúnmente un molino de martillos pero, tanto el macerado como el prensado pue-

den hacerse en una sola máquina, usando una prensa de tornillos. Es importante disminuir el contenido de agua del LPC por medios mecánicos, ya que es mucho más barato que el secado con calor (32).

Se ha sugerido que el LPC sea utilizado, sin fraccionar, directamente en la dieta humana, aprovechando así, todo su contenido, incluso el precursor de vitamina A B-caroteno. Sin embargo, se ha criticado su color verde y sabor grasoso y amargo (32).

#### E. Producción de proteína por microorganismos

El uso y el consumo de microorganismos por el hombre ha sucedido por mucho tiempo, si se considera las bebidas alcohólicas, los quesos y otros.

Debido a la escasez de alimentos en el mundo, la materia microbiana puede ser una fuente valiosa de alimento, particularmente en lo que respecta a proteínas y vitaminas.

Se sabe que el contenido de proteína en microorganismos es mayor que en las plantas. En muchas células microbianas, el contenido de proteína puede llegar al 50-60% en base seca. Dichas células son ya un concentrado protéico y no necesitan ningún proceso posterior para concentrarla (23).

Según Enebo (23), el organismo a ser empleado en la producción requiere satisfacer las siguientes propiedades:

1. Alto contenido de proteína y alto porcentaje de aminoácidos esenciales
2. No tóxico
3. Alta digestibilidad
4. Buen sabor
5. Alto contenido de otros nutrientes

6. Contenido de grasa de alta calidad
7. Crecimiento rápido en medios simples
8. Tolerancia a compuestos tóxicos en el medio .
9. Resistencia a la contaminación

Se ha experimentado la producción de proteína con especies de pseudomonas, con Escherichia coli y otras (15).

En 1970, Enebo informó los resultados mencionados en el cuadro 2 (23).

#### Polyporus Squamosus

El Polyporus Squamosus cepa 64 (PS64) es un hongo capaz de producir proteína de excelente calidad. Su medio de cultivo común es el siguiente:

Glucosa	20 g/l	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3 g/l	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l	
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g/l	
ZnSO <sub>4</sub>	0.01 g/l	
CoCl <sub>2</sub>	0.01 g/l	(64)

El PS64 crece rápidamente en medios simples. Contiene un porcentaje de proteína de 52-58%, en base seca, según el medio en que crezca (64). El cuadro 3 muestra la composición de aminoácidos del PS64 y otros productos.

#### F. Evaluación biológica de proteínas

La proteína contenida en la dieta tiene como función primaria suministrar al organismo una mezcla de aminoácidos cuyo balance sea apropiado para la síntesis y el mantenimiento de la proteína de los tejidos (13). O sea que, la calidad o clase de

proteína de una ración puede ser tanto o más importante que la cantidad.

No debe confundirse el valor biológico de una proteína con el valor nutritivo de la misma en la dieta. El primer concepto efectúa el análisis cuantitativo de aminoácidos esenciales disponibles al organismo animal para la satisfacción de sus requerimientos durante la situación fisiológica en que se encuentra. El segundo concepto se refiere a la aplicación de los resultados del primero, y su propósito es evaluar la capacidad de la proteína, juntamente con otros nutrientes (13).

Existen varios métodos para la evaluación nutritiva de la proteína presente en un alimento. Comúnmente se determina la digestibilidad de la proteína en animales de una especie dada.

Luego de ser ingeridas, las proteínas en el estómago son atacadas por la pepsina, una enzima del jugo gástrico, que las descompone en proteosas y peptonas, las cuales pasan al intestino delgado, donde son descompuestas en aminoácidos por la tripsina, enzima del jugo pancreático.

La digestibilidad de un alimento dado se determina por medio de experimentos de digestión. Primero se determina químicamente el porcentaje de cada elemento nutritivo contenido en el alimento. Luego se dan al animal cantidades previamente pesadas y analizadas (46).

Se llama coeficiente de digestión o coeficiente de digestibilidad de un elemento nutritivo, el porcentaje medio de cada elemento nutritivo digestible existente en el alimento (46).

Los alimentos que contienen poca celulosa, como el maíz y el trigo, son muy digestibles por especies animales, porque sus

paredes celulares son delgadas y fácilmente atacadas por los jugos digestivos (46).

Los métodos biológicos para evaluación de proteínas utilizando ratas se dividen en dos grupos:

1. Los basados en ganancia de peso, como por ejemplo índice de eficiencia protéica, PER, o la razón protéica neta, NPR.
2. Los basados en contenido corporal de nitrógeno tal como valor biológico, BV, o utilización protéica neta, NPU.

Índice de eficiencia protéica , PER

Comúnmente se determina el índice de eficiencia protéica pues se ha demostrado que, optimizando condiciones, se obtienen resultados reproducibles. Es aceptado que el índice de crecimiento de ratas destetadas, bajo condiciones estandarizadas, proporciona una medida confiable del valor de una proteína (24).

El índice de eficiencia protéica se define como:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganancia de peso corporal}}{\text{Cantidad de proteína ingerida}}$$

El PER se ve afectado por varios factores (13,24) que son: la edad inicial de la rata, sexo y raza de la rata, duración del ensayo y nivel de proteína en la dieta. Se sabe que mientras mayor es el tiempo de experimentación, menor es el PER obtenido.

Este método de evaluación es ventajoso por cuanto muestra la existencia de efectos tóxicos en un alimento ya que el crecimiento es extremadamente sensible a factores tóxicos. Siempre que persiste un crecimiento retardado, aún después de la suplementación con los aminoácidos limitantes, existe una fuerte sospecha sobre la presencia de una sustancia tóxica (44).

### Razón proteínica neta, NPR

La razón proteínica neta se define como:

$$\text{NPR} = \frac{\text{Ganancia peso gpo.muestra} + \text{pérdida peso gpo.control}}{\text{Proteína consumida gpo. muestra}}$$

Tanto el PER como el NPR requieren el uso de un grupo control; en el caso del PER, el grupo control se alimenta con una dieta que contiene caseína, mientras que para determinar el NPR debe mantenerse un grupo control de ratas alimentado con una dieta libre de nitrógeno. A los catorce días se calcula el NPR de cada dieta según la ecuación dada anteriormente (24).

Una dieta libre de nitrógeno, puede componerse así: (% en peso) aceite de maíz 15, glucosa 15, mezcla mineral USP 5, carbohidratos vitaminados 5, almidón de maíz 60. La dieta completa, libre de proteína, debe contener menos del 0.1% de nitrógeno (49).

### Utilización proteínica neta, NPU

Por definición, el NPU es igual al nitrógeno retenido que se obtiene por la diferencia entre valores obtenidos de animales alimentados con o sin nitrógeno en la dieta.

El NPU se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{NPU} = \frac{\text{Nc. gpo. muestra} - \text{Nc.gpo. LN+N consumido gpo. LN}}{\text{N consumido por el grupo de muestra}} \quad (13)$$

donde, Nc= Nitroógeno del carcás  
LN= Libre de notrógeno

La utilización proteínica neta se ve afectada por el contenido de lisina de las proteínas deficientes en este aminoácido, así como por los aminoácidos azufrados (13).

### Valor Biológico, VB

Por definición, el valor biológico es igual al nitrógeno absorbido menos la diferencia entre el nitrógeno urinario y el nitrógeno endógeno urinario, todo esto dividido entre el nitrógeno absorbido según se indica en la siguiente fórmula:

$$VB = \frac{Ni - (Nf - Nm) - (Nu - Ne)}{Ni - (Nf - Nm)} \times 100$$

donde, Ni= nitrógeno ingerido

Nf= nitrógeno fecal

Nm= nitrógeno fecal metabólico

Nu= nitrógeno urinario

Ne= nitrógeno endógeno urinario (13)

Los resultados obtenidos en diferentes experimentos indican que, en general, los métodos de evaluación proteínica están relacionados entre sí, clasificando la proteína en el mismo orden, al menos para el mismo animal experimental. Aun así, persiste la duda sobre la real aplicabilidad de esos resultados en una especie animal diferente, en particular entre el animal y el ser humano (13).

### III. OBJETIVOS

#### A. Objetivo General

Elaborar un alimento humano, rico en proteína y otros nutrientes a base de Chipilín.

#### B. Objetivos Específicos

1. Desarrollar un método para la extracción y recuperación de las proteínas del Chipilín.
2. Caracterizar química y biológicamente la proteína del extracto y el residuo de la extracción del Chipilín.
3. Evaluar biológicamente el efecto complementario de la proteína del extracto de Chipilín a dietas de maíz y frijol.

#### IV. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION

Como lo indican investigaciones anteriores, mencionadas en secciones precedentes de este trabajo, el Chipilín tiene un alto contenido de proteína, así como de fósforo y de hierro.

Previo a la utilización de esta planta en alimentación humana, es necesario hacer estudios en animales de laboratorio como ratas. Este ensayo biológico, complementado con un análisis químico de la planta, permitirá sacar conclusiones sobre las ventajas y desventajas del uso de la misma como suplemento en dietas para el humano.

Dado que en Guatemala el Chipilín es bastante conocido y consumido como condimento, su introducción como un suplemento a la dieta normal se facilitaría. Por otra parte, el hecho de que existan en el mercado jugos de vegetales, muy aceptados pero poco nutritivos, abre la posibilidad de producir un alimento de constitución similar pero de alto valor nutritivo; además, se plantea la oportunidad de utilizar de diferentes formas, como alimentación animal por ejemplo, todos los subproductos del proceso de extracción del jugo de Chipilín.

## V. MATERIALES Y METODOS

### A. Materiales

Se utilizó Chipilín (Crotalaria Longirostrata) comprado en un mercado local. De la planta se obtuvieron las siguientes muestras para su evaluación química y biológica:

1. Planta completa
2. Hojas, peciolo y flores ("jalado")
3. Peciolo grueso y tallo ("sobrante")

A la muestra compuesta por hojas, peciolo y flores, se le denominó "jalado". Para obtener esta muestra se toma la rama de Chipilín por su extremo inferior con una mano y con la otra se jala, con fuerza, hacia arriba, arrancando hojas, peciolo y flores.

Se le llama "sobrante" a lo que queda (tallos y peciolo grueso) después de haber obtenido el "jalado".

El "jalado" se utilizó para la extracción del jugo de Chipilín, el cual fue liofilizado para luego evaluarse química y biológicamente. El residuo de extracción se deshidrató para ser analizado químicamente.

### B. Metodología

#### 1. Análisis Químico

El análisis químico proximal se realizó según los métodos del AOAC (5), e incluyó lo siguiente: Humedad(7.003)<sup>1</sup> extracto etéreo (7.048)<sup>1</sup>, fibra cruda(7.053-7.057)<sup>1</sup>, proteína(2.052)<sup>1</sup>, cenizas(7.010)<sup>1</sup> calcio(3.011)<sup>1</sup>, fósforo(3.062)<sup>1</sup>, hierro(3.009)<sup>1</sup>.

El contenido de carbohidratos fue obtenido por diferencia.

---

<sup>1</sup> Número de análisis en AOAC (5).

2. Extracción de proteína utilizando licuadora, bajo diferentes condiciones.

Se hicieron extracciones de jugo de Chipilín, variando el volumen de solvente, el tiempo de extracción y el solvente.

El procedimiento seguido fue el siguiente: se colocó el Chipilín y el solvente, en proporciones conocidas, en una licuadora y se procedió a licuar durante un tiempo también conocido. El producto licuado se filtró a través de tela de manta haciendo presión con las manos para obtener la mayor cantidad posible de extracto.

Para determinar el porcentaje de proteína extraída se determinó el porcentaje de proteína en el residuo y se restó del total de proteína en la muestra sin extraer.

- a. Manteniendo constante el tiempo de extracción, se varió el volumen de agua respecto de una cantidad dada de Chipilín fresco.
- b. Con la proporción óptima Chipilín: agua, se varió el tiempo de extracción.
- c. Se experimentaron los siguientes solventes: NaOH pH 9,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.004M y  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.004M pH 9. ( $\mu = 0.01201$ ).

Hay que mencionar que todas las extracciones se iniciaron a temperatura ambiente, notándose que después de efectuada la extracción la temperatura de la mezcla aumentaba hasta aproximadamente 35-50°C dependiendo del tiempo de extracción. Además, las extracciones con solvente básico (pH9) no conservaron el pH, sino que éste se redujo.

### 3. Caracterización de la proteína del Chipilín

Se realizó una curva de pH contra precipitación de proteína en el extracto de Chipilín para determinar el punto isoeléctrico a temperatura ambiente (23°C). Para tal efecto, se tomaron nueve alícuotas de igual volumen del extracto de Chipilín, y se ajustaron a pH 9 con Hidróxido de Sodio 6N. Luego cada una se llevo al pH requerido (9,8,7,6,5,4,3,2,1) con ácido clorhídrico 6N. Se dejó reposar durante media hora y se centrifugó para separar el precipitado. El contenido de nitrógeno se determinó en el sobrenadante.

### 4. Evaluación biológica

#### 4.1. Razón Proteínica Neta, NPR

Para evaluar biológicamente la calidad de la proteína del Chipilín, se utilizaron ratas de la raza Wistar, de la colonia del INCAP, de 21 días, separadas en grupos de ocho (4 hembras y 4 machos), las cuales se alimentaron durante catorce días, administrando agua y alimento ad libitum, siendo pesadas cada siete días.

La dieta basal está compuesta de la siguiente manera:

<u>Ingredientes</u>	<u>% en la dieta</u>
Proteína	10
Minerales USP (34)	4
Aceite de Bacalao	1
Aceite de Algodón	5
Almidón csp - ajustar a	100

Además, se agregan 5 ml de solución de vitaminas (42) por cada 100g de dieta.

Se hicieron dos ensayos, utilizando en uno, la harina y el extracto liofilizado de Chipilín como suplemento de una dieta basal de maíz y frijol, y en el otro, utilizándolos como única fuente de proteína.

En el primer ensayo se tuvieron 6 grupos de ratas, las cuales consumieron las dietas descritas a continuación:

Ingredientes	1	2	3	4	5	6
Maíz	72.0	-	61.2	50.3	61.2	-
Frijol	18.0	-	15.3	12.6	15.3	-
Harina de Chipilín	-	-	4.0	8.0	-	-
Extracto Liofilizado	-	-	-	-	3.5	-
Caseína	-	-	-	-	-	10.0
Otros*	10.0	100.0	19.5	29.1	20.0	90.0
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

\* Minerales, aceite de bacalao, aceite de algodón, almidón. Además, se agregaron 5 ml de solución de vitaminas por cada 100g de dieta.

En un segundo ensayo, se hicieron evaluaciones nutricionales, del mismo tipo y procedimiento que en el primer ensayo, con dietas de la siguiente composición:

Ingrediente	7	8	9	10	11	12	13
Maíz	72.0	-	-	-	61.2	-	-
Frijol	18.0	-	-	-	15.3	-	-
Harina de Chipilín	-	29.4	-	-	-	-	-
Har. de Chip. + 0.2% metionina	-	-	29.4	-	-	-	-
Extracto liof.	-	-	-	26.1	-	-	-
(Jugo de Chip. + Jugo de Tomate) liofilizado	-	-	-	-	6.0	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	10.0	-
Otros*	10.0	70.6	70.6	73.9	17.5	90.0	100.0
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

\* Minerales, aceite de bacalao, aceite de algodón, almidón.

Además, se agregaron 5 ml de solución de vitaminas por cada 100g de dieta.

#### 4.2 Prueba de digestibilidad verdadera

Para determinar este porcentaje, se recolectaron las heces de las ratas durante los últimos siete días del ensayo. Estas fueron secadas en horno a 60°C con aire caliente, pesadas y molidas. Posteriormente se determinó el contenido de nitrógeno en ellas. Fue necesario utilizar una dieta libre de nitrógeno cuya composición se muestra en el cuadro anterior, dieta No. 13.

Se calculó el porcentaje de digestibilidad verdadera según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Dig. Verd.} = \frac{\text{Niap} - (\text{Neap} - \text{Neac})}{\text{Niap}}$$

donde, Niap = Nitrógeno ingerido animal prueba

Neap = Nitrógeno excretado animal prueba

Neac = Nitrógeno excretado animal control

## 5. Desarrollo del producto

Para mejorar el sabor y el olor del jugo de Chipilín se siguieron varios procedimientos.

- a. Se hicieron diferentes mezclas del jugo de Chipilín con jugo de tomate, apio, chile pimiento, hierbabuena, azúcar, sal y jugo de limón.
- b. Como recomienda Valli (65), para extraer el sabor amargo y el olor, se dejó el Chipilín en remojo en una solución al 3% de carbonato de amonio durante una noche. Al día siguiente, se le extrajo el jugo conforme el procedimiento descrito anteriormente.
- c. Se agregaron también saborizantes industriales de chocolate, canela, menta y cola champán; cada uno por separado.
- d. Para tener una idea de la aceptabilidad del producto preparado se hizo una evaluación preliminar de la siguiente forma: la mezcla a evaluar se suministró en vasos plásticos a 15 personas, quienes describieron su olor, su sabor su apariencia y su textura calificándola de 1 a 5 según la consideraran muy mala (1), mala (2), regular (3), buena (4) o muy buena (5).

El análisis estadístico incluyó un análisis de varianza de una vía, utilizando la distribución de F y luego se usó la diferencia honestamente significativa de Tukey. El nivel de significancia se estableció en 0.05.

## VI. RESULTADOS

### A. Composición química proximal de diferentes partes del Chipilín

En el cuadro 4 se muestran los resultados del análisis químico en diferentes partes del Chipilín.

Se observa que el contenido de proteína en la planta completa es de 30.0% en base seca y aumenta en la muestra de "jalado" a 42.2%.

El contenido de fibra cruda en la planta completa es de 31.4% en base seca, mientras que en el "jalado" es de 9.9% y en el "sobrante" es de 42.7%.

En el contenido de otros componentes no se observan grandes cambios entre las diferentes muestras analizadas.

### B. Extracciones de jugo de Chipilín

#### 1. Efecto del volumen de solvente

Variando el volumen de solvente respecto de una cantidad constante de Chipilín y un tiempo de extracción también constante, se obtuvo como resultado que la mejor proporción Chipilín: solvente es de 1:3. En todas las extracciones, el volumen de filtrado coincidió en  $\pm$  5 ml con el volumen de solvente inicialmente utilizado. El extracto fue una mezcla verde oscuro con bastantes sólidos (ver cuadro 5).

#### 2. Efecto del tiempo de extracción

Utilizando una proporción de Chipilín: agua de 1:3, se varió el tiempo de extracción.

Se observó un leve incremento en el porcentaje de proteína extraída al aumentar de 1.5 a 4 minutos el tiempo de extracción (de 34.2% a 35.5%). Sin embargo, al continuar aumentando este tiempo, se produjo una caída drástica en la extracción de proteína (hasta 29.9% y 20.7% de proteína extraída con 8 y 12 minutos de extracción respectivamente).

El mejor tiempo de extracción fue de 4 minutos. (Ver cuadro 5).

### 3. Efecto del solvente

Utilizando tres solventes básicos se incrementó el porcentaje de proteína extraída hasta 41.8%. Este rendimiento se obtuvo con una solución 0.004M a pH 9 de sulfito de sodio (Ver cuadro 5).

Hay que señalar que las extracciones con solvente básico produjeron más espuma que las efectuadas con agua.

### C. Caracterización de la proteína del Chipilín

Se determinó el punto isoeléctrico de la proteína del Chipilín. El cuadro 9 y la figura 1 indican que éste se encuentra muy cercano a pH 4.

### D. Balance de materiales

La figura 2 y el cuadro 10 muestran datos importantes obtenidos durante el presente estudio, en cuanto al balance de materiales en los diferentes procesos.

Se observa que el "jalado" constituye el 45.7% de la planta, lo cual equivale a poder extraer (en proporción 1:3, Chipilín: solvente) 1.4 litros de jugo por cada kilogramo de Chipilín.

De cada litro de jugo puede obtenerse por calentamiento, centrifugación y lavados, aproximadamente 6.6g de proteína purificada.

El "sobrante", con un contenido de proteína de 2% en base húmeda, constituye el 54.3% de la planta completa, y el residuo de extracción (5.0% de proteína en base húmeda), constituye el 55.6% del "jalado", o sea, el 25.4% de la planta completa.

#### E. Composición química proximal del extracto liofilizado y del residuo de extracción

El jugo extraído del Chipilín, en las condiciones óptimas, se liofilizó y se analizó. Es importante notar que, el contenido de proteína es de 45.6% y el de fibra cruda de 1.2%.

El análisis químico del residuo de extracción dio como resultado 21.4% y 28.6%, en base seca, de proteína y fibra cruda respectivamente. (Ver cuadro 6 ).

#### F. Evaluación de la calidad nutricional del Chipilín

En el primer ensayo, utilizando harina de Chipilín y extracto liofilizado como complemento de una dieta basal de maíz y frijol, se obtuvo un NPR de 3.2 y de 3.0 para las dietas que contenían 4% y 8% de harina de Chipilín, respectivamente. La dieta que contenía extracto liofilizado acusó un valor de NPR de 3.2 y la dieta basal, de maíz y frijol, dio como resultado un NPR de 3.1. Únicamente la dieta que contenía caseína como fuente de proteína, con un NPR de 4.2, fue significativamente diferente a las demás. Las otras no tuvieron diferencias significativas. (Ver cuadro 7).

Debido a que las dietas que contenían harina de Chipilín no mostraron un NPR tan alto como se esperaba, se pensó en una posible anemia provocada por algún factor presente en el Chipilín. Para determinar la existencia de anemia, se decapitaron dos ratas, una hembra y un macho, de cada grupo y se hizo análisis de hemoglobina en su sangre. Los resultados aparecen en el cuadro 7 y muestran que no existió problema de anemia.

En el segundo ensayo, utilizando harina de Chipilín y extracto liofilizado como única fuente de proteína, se observaron diferencias significativas entre varias dietas ( $p < 0.05$ ). Los animales alimentados con la dieta sin suplemento de metionina dieron un NPR de 2.2, mientras que aquellos que consumieron la dieta con metionina dieron un NPR de 3.1 igual que los que comieron la dieta basal de maíz y frijol (NPR = 3.1).

La diferencia en el aumento de peso en los animales alimentados con dietas con harina de Chipilín fue grande. Para el grupo 8, dieta sin suplemento de metionina, el aumento promedio fue de 17.6g en las dos semanas de ensayo; para el grupo 9, dieta suplementada con metionina, el aumento promedio fue de 46.5g en las mismas dos semanas. Además de eso, los animales del grupo 8 tuvieron una ingesta promedio de 118.9g de alimento, contra 170.3g de alimento en el grupo 9. Es decir que una dieta mal balanceada en sus aminoácidos y/o poco nutritiva, es consumida en menor cantidad por las ratas.

Los animales que comieron la dieta 10, de extracto liofilizado como única fuente de proteína, sufrieron una diarrea severa. Este grupo dio el NPR más bajo, 1.7, el aumento promedio de peso más bajo, 9.8g, y la ingesta promedio de alimento más baja,

103.6g, en las dos semanas de ensayo. Estos datos corroboran lo expresado anteriormente en relación a que las ratas ingieren menos cantidad de un alimento poco nutritivo.

Los animales del grupo 11, con dieta que contenía una mezcla liofilizada de jugo de Chipilín y jugo de tomate, en proporción 1:1, tuvieron la mayor ingesta promedio de alimento, 197.7g pero el aumento de peso fue relativamente bajo, 46.1g, lo que dio un NPR de 2.7.

En el cuadro 8 aparecen los datos y resultados correspondientes a este ensayo.

Se recolectaron las heces de los últimos siete días de todos los grupos, con excepción del que contenía harina de Chipilín suplementada con metionina, para determinar el porcentaje de digestibilidad verdadera de la dieta correspondiente. Los valores encontrados oscilan entre 84% para la dieta con harina de Chipilín sin suplemento de metionina y 96% para la dieta con caseína. El porcentaje de digestibilidad verdadera encontrado para la dieta basal de maíz y frijol fue de 86%, (Ver cuadro 8).

#### G. Desarrollo del producto

1. Utilizando condimentos naturales, los resultados, a juicio de diferentes personas que probaron el producto, fueron malos. Se notó que el chile pimiento, el apio y la hierbabuena no contribuían a un apreciable cambio en el sabor de la mezcla.

Las mezclas que, por su sabor y olor, resultaron más aceptadas, aunque sin convencer totalmente, tenían la siguiente composición:

mezcla	ml jugo Chipilín	ml jugo Tomate	ml jugo Limón	sal (g)	azúcar (g)	% proteína (Nx6.25)
1	20	30	1	0.3	0.2	0.91
2	20	20	1	0.5	0.4	1.03

2. Dejando en remojo el Chipilín en una solución al 3% de carbonato de amonio durante una noche, el resultado fue que, tanto el sabor como el olor del jugo de Chipilín, fueron reducidos en una mínima cantidad, casi imperceptible.

3. Utilizando saborizantes industriales, el mejor resultado se obtuvo con la esencia de menta, pues el olor desagradable desapareció completamente; el sabor cambió bastante aunque permaneció desagradable por falta de condimentos naturales. Con las otras esencias, especialmente con la de chocolate, no hubo grandes cambios.

Para evaluar biológicamente una mezcla que representara lo mejor posible un producto comercial, se liofilizó una mezcla de partes iguales de jugo de Chipilín y de tomate y se preparó una dieta con 6% de ella (ver dieta #11). Los resultados de NPR y de digestibilidad se muestran en la sección anterior (NPR = 2.7, % digestibilidad verdadera = 87.0).

## VII. DISCUSION DE RESULTADOS

### A. Composición química del Chipilín

Es importante hacer énfasis en que no se contó con un suministro uniforme, en cuanto a origen, edad y calidad del Chipilín. Las muestras fueron compradas en un mercado local, sin saber datos específico sobre ellas. Esto justifica en gran parte las diferencias encontradas en los valores para los contenidos de diferentes componentes químicos de la planta, respecto de los valores reportados por otros investigadores (3, 21, 40, 62, 63, 68).

El contenido de extracto etéreo en la planta completa de Chipilín, encontrado en este estudio fue de 0.8% en base húmeda; el cual es igual al reportado por Wu Leung (68), es mayor que el que reportan Arroyave, 0.5% (3), y De León, 0.54% (21), y es menor que el informado por el INCAP, 1.0% (63). Lo anterior indica que el contenido de extracto etéreo del Chipilín oscila entre el 0.5% y el 1.0%, en base húmeda, siendo las variaciones pequeñas y justificables si se toman en cuenta las condiciones de vida de las plantas usadas en cada caso.

Debe notarse que el contenido de extracto etéreo disminuye considerablemente en la muestra de tallos y peciolo gruesos ("sobrante"), el cual acusó un valor de 0.39%.

El contenido de fibra cruda informado por otros investigadores, oscila entre 1.8% y 2.0%, en base húmeda (3, 68) y es menor que el encontrado en el presente trabajo, 4.9%. Sin embargo, el porcentaje de fibra cruda obtenido para la muestra de "jalado", 1.6% en base húmeda, sí es comparable a los límites mencionados antes. En cambio, la muestra de "sobrante" dio un contenido de fibra cruda de 6.1% en base húmeda. Esto se debe a que la muestra

estaba constituida, principalmente, de tallos y peciolo-  
sos.

En cuanto al contenido de proteina, otros investigadores reportan en un intervalo de 6.2-7.6% en base húmeda (3, 21, 68), mientras que el obtenido en este estudio es de 4.3% para la planta completa en base húmeda. Para tallos y hojas, los porcentajes de proteina difieren considerablemente, siendo ellos 1.8% y 7.9% en base húmeda, respectivamente.

Respecto al contenido de cenizas, el INCAP reportó 1.4%, en base húmeda, en 1953 y Wu Leung 1.5%, en base húmeda, en 1961 (62, 68). En la muestra de la planta completa de Chipilín, se encontró en el presente trabajo, un contenido de 1.2% de cenizas, en base húmeda. La diferencia fue muy pequeña con los valores obtenidos para las muestras de "jalado" y "sobrante" (1.3% y 1.0%, en base húmeda, respectivamente).

En lo que respecta a contenido de fósforo y hierro, las cantidades encontradas 71.0 y 5.4 mg/100g, en base húmeda, respectivamente, fueron semejantes a las reportadas por otros autores (3, 21, 40, 62, 63, 68); mientras que el contenido de calcio encontrado, 155.9 mg/100g, en base húmeda, fue menor que el que informan otros investigadores (3, 21, 40, 62, 63, 68).

La ingesta diaria recomendada para humanos de 11 años en adelante, es de 800-1200 mg de fósforo, 800-1200 mg de calcio y 10-18 mg de hierro (47). El Chipilín es buena fuente en especial de fósforo y hierro, ya que, pequeñas cantidades del mismo, pueden contribuir en gran parte a satisfacer los requerimientos sugeridos, especialmente si se consumiera harina de Chipilín deshidratado, pues los contenidos de estos minerales aumentan considera-

blemente (455,1 y 34.6 mg/100g, para fósforo y hierro respectivamente).

El cuadro 11 muestra los datos de análisis proximal para otras plantas, no necesariamente leguminosas, cuyas hojas se utilizan como alimento.

#### B. Extracciones del jugo de Chipilín

Se variaron las proporciones de Chipilín: agua. Aunque no hubo grandes diferencias en los contenidos de proteína del jugo con las diferentes proporciones usadas, se eligió trabajar con mezclas en proporción 1:3, Chipilín: agua, por facilidad de manejo principalmente.

Luego de esto, se procedió a variar el tiempo de licuado, observándose que, a medida que se aumentaba el tiempo, disminuía el porcentaje de proteína extraída. Esto se puede justificar ya que, al aumentar el tiempo de licuado, empiezan a suceder diversas reacciones químicas entre proteínas y otros compuestos especialmente taninos como ha sido sugerido (10). De esta forma, la proteína queda "atrapada", disminuyendo el porcentaje de extracción de la misma. Además, conforme avanza el tiempo de extracción, la temperatura de la mezcla sube paulatinamente a causa de la fricción entre cuchillas y muestra; esto también contribuye, aunque en menor grado, a un menor rendimiento en la extracción de proteína pues, parte de ésta precipita. El tiempo de licuado que dio el mejor resultado fue de cuatro minutos.

Por último se hicieron extracciones con diferentes solventes. Se sabe que las soluciones diluídas de sales polivalentes (31) y las soluciones levemente básicas (67), son solventes re-

comendados para extraer proteína de hojas. La mejor extracción (41.8% de proteína extraída) se consiguió utilizando una solución 0.004M a pH 9 de sulfito de sodio. Aunque, según la literatura revisada (16), se pueden conseguir mejores resultados, el obtenido se consideró aceptable para los propósitos del estudio, por lo que se prosiguió con la evaluación biológica y química del extracto.

Hay que señalar que implementando mejor las condiciones mecánicas de la extracción, se puede conseguir un mejor rendimiento. Por ejemplo, se puede optimizar la clase de tela a utilizar como filtro, de tal forma que no permita el paso de fibra pero que tenga poros suficientemente grandes para dejar pasar otro tipo de sólidos. Además, es necesario contar con una prensa adecuada que extraiga la mayor cantidad de líquido posible.

#### C. Caracterización de la proteína del Chipilín

En los resultados que aparecen en el cuadro 9 se observa que el punto isoeléctrico de la proteína del Chipilín se encuentra muy cercano a, o en, pH 4. La mayoría de las proteínas vegetales tienen un punto isoeléctrico en el rango de pH 4 a pH 6 (31), por lo que el resultado fue el esperado.

#### D. Balance de materiales

La figura 2 muestra la forma en que es factible aprovechar la planta del Chipilín. Todos los productos obtenidos en los diferentes procesos pueden ser de mucha utilidad como alimentos para humanos o para animales por su alto contenido de proteína de buena calidad. Además, los procesos son relativamente baratos

y podrían adaptarse a una industria en gran escala, con una inversión baja, considerando los resultados que se pueden obtener.

Las fracciones de "sobrante" y de residuo de la extracción pueden utilizarse directamente o ensilarse ( en bolsas plásticas para fermentación anaeróbica). El jugo producto del "jalado" se puede utilizar, previo tratamiento para mejorar sus propiedades organolépticas, como bebida, o puede deproteinizarse para servir de sustrato en el crecimiento de un microorganismo productor de proteína.

En un estudio preliminar, se ensayó el crecimiento del *Polyporus Squamosus* 64 (PS64) en jugo de Chipilín previamente deproteinado. Para el efecto se inoculó con PS64 el siguiente medio de cultivo:

Jugo de Chipilín deproteinado	3 litros
Agua	3 litros
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	18 gramos
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9 gramos

Después de dejar la mezcla en un fermentador durante aproximadamente 72 horas, el producto se deshidrató y se obtuvieron 400g de PS64. Como se mencionó antes, el PS64 contiene un porcentaje de proteína de 52-58%, de muy buena calidad, según el medio en que crezca (64).

Falta, sin embargo, hacer un estudio del rendimiento agrícola del Chipilín y el sistema óptimo de cultivo. Con esto se tendría una idea concreta de cuánto Chipilín puede producirse por hectárea de terreno. Esto queda como sugerencia para un estudio futuro.

E. Composición química del extracto liofilizado y del residuo de extracción

Con el objeto de tener una idea de la composición química del extracto de Chipilín, éste se liofilizó y se analizó. Los resultados obtenidos de este análisis son bastante altos en todos sus componentes como era de esperarse. Sin embargo, su utilidad es relativa, pues siguiendo el objetivo general de este estudio, no se puede incluir en un proceso de bajo costo una liofilización en gran escala.

En lo que se refiere al residuo, la situación es diferente, ya que podría ser utilizado como alimento animal directamente en la forma que se obtiene. El contenido de fibra cruda, 6.7%, en base húmeda, no es tan alto para un rumiante, mientras que el de proteína 5.0%, en base húmeda, es adecuado como un suplemento a la dieta normal. Por otra parte, las cantidades que contiene de calcio, fósforo y hierro, 283.8, 47.8 y 8.1 mg/100g, en base húmeda, son suficientemente altas como para satisfacer con una ingesta pequeña, los requerimientos de un animal de cualquier edad y tamaño.

La evaluación biológica del residuo, en conejos por ejemplo, daría una buena idea de la utilización de este producto como alimento animal.

F. Evaluación de la calidad nutricional del Chipilín

Se evaluó la calidad nutricional del Chipilín como complemento en una dieta a base de maíz y frijol. Asimismo, se evaluaron dos dietas, una con harina de Chipilín "jalado" y otra con extracto liofilizado de Chipilín. La harina se agregó en

un porcentaje del 4% en una dieta y del 8% en la otra. El extracto liofilizado se agregó en un porcentaje del 3.5%, el cual, por motivo de comparación, corresponde, en cantidad de proteína a la dieta con 4% de harina de Chipilín.

Se esperaba que las dietas con harina de Chipilín tuvieran una mejor calidad nutricional, o sea, un NPR más alto. Sin embargo, no fue así. El NPR de la dieta basal de maíz y frijol fue de 3.1, el de la dieta con 4% de harina de Chipilín fue de 3.2 y el de la que contenía harina de Chipilín en un 8% fue de 3.0. Las diferencias son estadísticamente no-significativas ( $p > 0.05$ ).

Aparte de lo anterior, una dieta constituida únicamente por maíz y frijol en proporción 72:18 (4:1 u 80:20) en base a peso, contiene aproximadamente 11.1% de proteína, mientras que, una conteniendo maíz-frijol-harina de Chipilín en proporciones de 61.2:15.3:4.0 (4:1:0.3 ó 76:19:5) contiene aproximadamente 12.5% de proteína. Esto indica que la dieta es más rica en proteína y obviamente, también más rica en los nutrientes provenientes del Chipilín.

Durante las dos semanas de experimentación, las ratas no mostraron físicamente signo alguno de toxicidad o enfermedad por consumir el Chipilín. Sin embargo, las ratas que comieron dietas con Chipilín, sí ingirieron menos alimento. Indudablemente el sabor, color y olor de las dietas fueron distintos, lo cual pudo ser la causa de la menor ingesta de alimento.

Seguidamente, se procedió a evaluar la harina de Chipilín

"jalado" como única fuente de proteína. Los resultados se complementan bien con los del ensayo anterior.

Utilizando una dieta con harina de Chipilín "jalado" como única fuente de proteína y otra igual pero suplementada con un 0.2% de metionina, se observó la alta deficiencia del Chipilín en este aminoácido. De esto se deduce que la harina de Chipilín debe ser suplementada con metionina si se le quiere usar como única fuente de proteína.

Las heces de los animales del grupo con diarrea, que comió extracto liofilizado de Chipilín, eran de color negro, posiblemente por la gran cantidad de pigmentos que contenía la dieta. Indudablemente no es recomendable consumir grandes cantidades del jugo de Chipilín que representen la mayor parte de una dieta normal. Sería interesante que, en un estudio futuro, se determine qué es lo que causa la diarrea, pues es algo muy importante si se quiere usar el Chipilín a nivel de alimento humano. Aparte de la diarrea, los animales no mostraron señales de enfermedad o intoxicación.

De los resultados obtenidos en la dieta que contenía la mezcla liofilizada de jugo de Chipilín y jugo de tomate, solo puede deducirse que el tomate fue la causa de que el NPR no haya sido más alto, ya que la dieta contenía proteína proveniente de maíz y frijol en la misma proporción que la dieta con harina de Chipilín al 4% en el ensayo anterior. Como el porcentaje de proteína en cada dieta se determinó como  $\left[ \frac{\% \text{ de nitrógeno} \times 6.25}{100} \right]$ , es posible que gran parte del nitrógeno encontrado en el jugo de tomate sea nitrógeno no-protéico. Es decir que la dieta en realidad, o tenía menor contenido de proteína, o fue de inferior calidad debido a la adición de jugo de tomate.

Los porcentajes de digestibilidad verdadera encontrados son todos aceptables. Incluso la dieta con extracto liofilizado como única fuente de proteína, que produjo diarrea, tuvo un porcentaje de digestibilidad relativamente alto, 89%. Esto indica que la diarrea fue producida por factores ajenos a la proteína de la dieta, pues ésta fue digerida casi en su totalidad por los animales.

Es interesante hacer mención de tres puntos importantes:

1. Se sabe que otras especies del género Crotalaria contienen alcaloides de diferentes grados de toxicidad (19, 48, 50) y que el Chipilín es conocido como un somnífero en Guatemala (53).
2. Otras especies de leguminosas contienen inhibidores de tripsina, algunos de ellos termolábiles, así como también hemaglutininas y/o saponinas (10, 37, 41).
3. Existen variedades de Chipilín, como el "Chipilín de caballo", que producen niveles altos de transaminasas séricas (36).

Es muy posible que la causa de la baja calidad nutricional de la harina de Chipilín se deba a razones involucradas directamente con los puntos mencionados anteriormente. Como estudio futuro se puede hacer un análisis de metabolitos secundarios (alcaloides, saponinas y otros) e inhibidores de enzimas, como la tripsina por ejemplo, en la harina de Chipilín.

Referente al poco efecto del extracto de Chipilín y de la harina deshidratada, ambos como complemento, hay que hacer notar que esto se puede deber a que el frijol es también deficiente en metionina, por lo que el efecto negativo de esta deficiencia

en la dieta se hace mayor. Una mezcla de maíz y harina de Chipilín, rica en lisina, habría demostrado de mejor manera el efecto suplementario de los productos de Chipilín.

#### G. Desarrollo del producto

No se consiguió una mezcla, a base de jugo de Chipilín, con características organolépticas aceptables, ya que el jugo de Chipilín tiene sabor y olor muy fuertes a pasto, a grama.

Al mezclar el jugo de Chipilín con otros vegetales, los resultados fueron malos. El jugo de tomate, el de limón y la sal, mejoraron bastante el sabor de la mezcla, pero aún sin dar un producto realmente aceptable. El apio, la hierbabuena y el chile pimiento no alteraron en nada el sabor de la mezcla.

El dejar el Chipilín en remojo en carbonato de amonio prácticamente no contribuyó a establecer diferencia en sabor y olor, ya que ésta fue casi imperceptible; no vale la pena llevar a cabo este proceso.

Después de utilizar las esencias naturales de menta, chocolate, canela y cola champán, se notó que sí es posible mejorar considerablemente el olor y el sabor del jugo de Chipilín. La esencia de menta eliminó totalmente el olor y mejoró su sabor al eliminar lo amargo. Se considera que los saborizantes experimentados no son los más indicados para un jugo de vegetales, pero lo importante del experimento fue demostrar que sí se pueden adecuar las propiedades organolépticas del jugo de Chipilín al gusto del humano.

El problema de conseguir el sabor y el olor apropiados consumirá suficiente tiempo como para que sea un estudio aparte.

En lo que se refiere a la calidad nutricional del jugo de Chipilín mezclado con jugo de tomate, se obtuvo un NPR aceptable (2.7) utilizando la mezcla como complemento de una dieta a base de maíz y frijol. La mezcla utilizada contenía jugo de Chipilín diluido al 50% con jugo de tomate, lo que al comparar con el NPR (3.2) de la dieta que contenía jugo de Chipilín al 100% como complemento, indica que es posible conseguir un mejor resultado si en la mezcla final se usa jugo de Chipilín menos diluido.

Según los resultados apuntados, el contenido de proteína de una mezcla de jugo de Chipilín y jugo de tomate, en las proporciones indicadas (1:1), está alrededor del 1%. Tomando en cuenta que se trata de proteína de buena calidad, se tiene la factibilidad de preparar un suplemento muy nutritivo para la dieta diaria. El problema estriba, como se dijo antes, en mejorar tanto el sabor como el olor del jugo de Chipilín; salvando este obstáculo, se estaría preparando un alimento humano, nutricionalmente bueno, a bajo costo, dado el proceso simple que se requiere.

Resumiendo lo expresado en esta sección, se puede decir que se está ante una planta que presenta muchas alternativas en cuanto a su utilización como alimento. Primeramente se cuenta con el "sobrante" que puede ser administrado como forraje a rumiantes. Luego se tienen dos productos de extracción: el jugo y el residuo. El residuo, 25.4% de la planta, es rico en proteína y otros nutrientes, por lo que puede también ser utilizado sin más procesamiento en la alimentación de bovinos y

otras especies. En cuanto al jugo obtenido por extracción de una parte de "jalado" y tres partes de solvente, éste debe ser aún trabajado para mejorar su sabor y olor para poder emplearlo como una bebida para el humano. Además de este uso, el jugo puede deproteinizarse por calentamiento para producir un concentrado protéico, para uso humano adicionándolo a la dieta corriente, y un jugo libre de proteína que puede emplearse en el cultivo de organismos como el PS64, capaces de producir proteína de la mejor calidad y en gran cantidad. De esta forma, aprovechando al máximo todos los productos y subproductos del Chipilín, se estarían produciendo varias fuentes de proteína de buena calidad nutricional, tan necesarias en la alimentación actual de países como Guatemala.

## VIII. CONCLUSIONES

El contenido de proteína en la planta de Chipilín es alto, y es mayor en las hojas y peciolo, de acuerdo con los análisis efectuados. Además, tiene un alto contenido de fósforo y hierro, no así de cenizas y extracto etéreo.

Es posible extraer jugo de Chipilín rico en proteína y otros nutrientes por simple licuado y posterior prensado contra tela. En este estudio, el solvente que extrajo la mayor cantidad de proteína fue una solución de sulfito de sodio 0.004M a pH9. El hidróxido de sodio a pH9 y el agua fueron solventes de poco rendimiento.

Mediante los procesos llevados a cabo en este estudio, se comprobó que se puede utilizar toda la planta del Chipilín, ya que productos y residuos tienen alto potencial nutritivo.

Los resultados biológicos de complementación indicaron que la calidad proteínica de la harina de Chipilín es comparable a la de una mezcla de maíz y frijol en la relación 4 a 1, ya que los valores de NPR de la dieta basal (maíz-frijol) fueron similares a los valores de NPR de la dieta basal con 4% y 8% de harina de Chipilín. Asimismo, el extracto proteínico de Chipilín liofilizado dio un valor proteínico complementario similar al obtenido con la harina deshidratada. Por ser la proteína de Chipilín deficiente en metionina, se requiere suplementarla con este aminoácido si se desea usar como única fuente proteínica en una dieta. Su porcentaje de digestibilidad verdadera es aceptable (84.0%).

La ingesta de jugo de Chipilín liofilizado, en cantidades considerables y como única fuente de proteína, causa diarrea en ratas por motivos aún desconocidos.

Es posible preparar una mezcla de vegetales, a base de jugo de Chipilín, complementada con saborizantes comerciales, de propiedades organolépticas aceptables.

Una mezcla, en partes iguales, de jugo de Chipilín y jugo de tomate, dio resultados biológicos un poco más bajos que solo el jugo de Chipilín, como complemento de una dieta a base de maíz y frijol. Sin embargo el sabor fue más aceptable, a juzgar por la ingesta de dieta que fue la más alta en todos los estudios biológicos. El NPR y el porcentaje de digestibilidad verdadera de la dieta de maíz, frijol y mezcla de jugos de Chipilín y tomate es de 2.7 y 87% respectivamente (Caseína, 4.0 y 96%, NPR y porcentaje de digestibilidad respectivamente).

Dadas las características nutricionales de los productos y subproductos que se pueden obtener del Chipilín, se considera que es una planta que puede ayudar a resolver el problema nutricional de Guatemala.

## IX. SUGERENCIAS PARA ESTUDIO FUTURO

Es de importancia la realización de futuras investigaciones encaminadas hacia los siguientes puntos:

1. Mejorar las propiedades organolépticas del jugo de Chipilín.
2. Determinar las causas de la diarrea provocada por el jugo de Chipilín. Hacer análisis de metabolitos secundarios e inhibidores de enzimas en la harina de Chipilín.
3. Evaluar en conejos la calidad nutricional del residuo de extracción.
4. Efectuar un estudio agronómico de la planta de Chipilín.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Altschul, Aaron, 1978. Processed Plant Protein Foodstuffs. Academic Press Inc., New York, U. S. A.
2. Anderson, M. E. and Williams, H. 1951. Microbiological Evaluation of Protein Quality. J. Nutr. 44:335.
3. Arroyave, G., S. Pizzati, R. Bressani & J. Méndez. 1954. Arch. Ven. Nutr. 5:61-70.
4. Arthur, Jett C. Jr. 1953. Peanut Protein, en: Advances in Protein Chemistry, Vol III, Academic Press, Inc., New York, U. S. A.
5. Association of Official Analytical Chemists. 1970. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11th. Ed., Washington, D. C., U. S. A.
6. Austin, J. E. 1977. Global Malnutrition and Cereal Fortification. Vol II, Harvard University, U. S. A.
7. Banco de Guatemala. 1983. Perspectivas de producción y exportación de carne de bovino. Informe económico, Año XXX enero-marzo, Guatemala.
8. Banco de Guatemala. 1984. Informe sobre productos de exportación correspondiente al año 1983. Informe Económico, Año XXX, abril-junio, Guatemala.
9. Berg, Alan. 1973. The Nutrition Factor. The Brookings Institution, Washington, D. C., U. S. A.
10. Blanco de Araya, Adriana. 1983. Importancia de algunos factores sobre la digestibilidad de las proteínas del frijol (Phaseolus vulgaris) y de sus aminoácidos en humanos adultos. Tesis, Curso de Postgrado de Ciencias y Tecnología de Alimentos, CESNA/INCAP/ Univ. de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

11. Borgstrom, Georg. 1973. World Food Resources. Intext Educational Publishers, New York, U. S. A.
12. Bressani, R., J. E. Braham, R. Jarquín y L. Elías. 1962. Arch. Ven. Nutr. 12:229-244.
13. Bressani, Ricardo. 1971. Evaluación Biológica de las Proteínas, en : Recursos Proteínicos en América Latina. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala.
14. Bressani, R. y Elías, L. 1968. Processed Vegetable Protein Mixtures for Human Consumption in Developing Countries. Advances in Food Research, 16:1.
15. Bunker, H. J. 1968. Sources of single-cell protein: perspective and prospect, en: Single-cell Protein. Mateles & Tannenbaum ( eds.) The MIT Press, U. S. A.
16. Byers, M. 1961. Extraction of Protein From the Leaves of Some Plants Growing in Ghana. J. Sci. Food Agri., 12: 20-30.
17. Chakravarty, P. R. y Guha, B. C. 1960. Leaf Protein Technology. Proc. Symposium on Proteins, p. 257-259. Aug. 14-16. India.
18. Chrispeels, M. S. and Sadava, D. 1977. Plants, Food, and People. Library of Congress, U. S. A.
19. Cox, Dennis H., Harris, D. & T. Richard, 1958. Chemical Identification of Crotalaria Poisoning in Horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 133: 425-6.
20. Cox, D. H. 1957. Isolation and Identification of Strychnine and other Alkaloids in Veterinary Toxicology. Am. J. Vet. Res. 18; 929-931.
21. De León Zúñiga, Hilda. 1966. Preparación y Evaluación Química y Biológica de Algunas Proteínas de Origen Foliar. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

22. Elmore, D. T. 1968. Peptides and Proteins. Cambridge University Press, London, England.
23. Enebo, L. 1970. Single-cell protein, en : Evaluation of novel protein products. Bender et al. (eds.). Pergamon Press. Hungary.
24. Evaluation of Protein Quality. 1963. Report of an International Conference. National Academy of Sciences-National Research Council Washington, D.C., U. S. A.
25. Fernell, W. R., and Rose, G. D. 1956. Microbiological evaluation of protein quality with *T. Pyriformis* W. The British Journal of Nutrition, 10:143.
26. Flores, Marina. 1976. Disponibilidad y Utilización de Alimentos de Uso Convencional como Fuentes de Proteína y Calorías. Artículo presentado en la Conferencia Internacional de Nutrición, San José, Costa Rica, Agosto de 1976.
27. Ford, J. E. 1960. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. British J. of Nutr. 14:485.
28. Frank C., H. Baker, S.H. Hunter, I. I. Rusoff, and R. A. Morek. 1975. Evaluation of protein quality with the phagotrophic protozoan *Tetrahimena*, en : Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman, M. (ed.). Marcel Dekker, Inc., U.S.A.
29. Guggenheim, K. 1970. Protein Evaluation by Micro-organisms, en: Evaluation of Novel Protein Products. Bender et al (eds.). Pergamon Press Ltd., Hungary.
30. Hackler, L. Ross, 1975. In Vitro Indices: Relationships to Estimating protein value for the human, en : Evaluation of Proteins for Humans. Bodwell, C.E. (ed.). The Avi Publishing Company, Inc., U. S. A.

31. Hanson, L. P. 1974. Vegetable Protein Processing. Noyes Data Corporation, N. J., U. S. A.
32. Heath, S. B. 1978. The production of leaf protein concentrates from Forage crops, en : Plant Proteins, G. Norton, (ed.). Butterworths, Great Britain.
33. Helms, P. and Rölle, G. 1970. Nutritive Evaluation of Protein Quality with *Tetrahymena pyriformis* W., en: Evaluation of Novel Protein Products. Bender et al. (eds.). Pergamon Press Ltd., Hungary.
34. Hegsted, D. M., R. C. Mills, C.A. Elrehjem and E. B. Hart. 1941. J. Biol. Chem. 138: 459-66. Original no consultado, tomado de: Selle, Margarita. 1982. Evaluación química y nutricional de la almendra de semilla de hule (*Hevea brasiliensis*).
35. Horan Francis. 1966. Deffated and Full-fat Soy Flours by Conventional Processes, en : International Conference on Soybean Protein, U. S. Department of Agriculture, U. S. A.
36. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 1972. Informe Anual, enero-diciembre 1971. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala.
37. Jaffé, W. G. y Flores, M. E. 19 75. La cocción de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Lat. Nutr. 25(1): 79-90. Original no consultado, tomado de: Blanco de Araya, Adriana. 1983. Importancia de algunos factores sobre la digestibilidad de las proteínas del Frijol ( *Phaseolus vulgaris*) y de sus aminoácidos en humanos adultos.
38. Jones, J. G. W. 1973. The Biological Efficiency of Protein Production. Cambrigde University Press, Great Britain.

39. Kohler, G. and B. Knuckles. 1977. Edible Protein from leaves. *Food Technology*, 31(5):191-195.
40. Latin American Tables of Food Composition. 1974. Univ. of Florida, Gainesville, Florida, U. S. A.
41. Liener, I. E. 1973. Toxic Factor Associated with Legume Proteins, *Indian J. Nutr. Diet.*, 10:303. Original no consultado, tomado de: Blanco de Araya, Adriana. 1983. Importancia de algunos factores sobre la digestibilidad de las proteínas del Frijol (Phaseolus vulgaris) y de sus aminoácidos en humanos adultos.
42. Manna, L. and S. M. Hauge. 1953. J. Biol. Chem. 202; 91-6. Original no consultado, tomado de: Selle, Margarita. 1982. Evaluación química y nutricional de la almendra de semilla de hule (Hevea brasiliensis).
43. Mattson, A. M., Jensen, C. O. and Dutcher, R. A. 1947. Triphenyltetrazolium Chloride as a dye for vital tissues. *Science*, 106:294-5.
44. Mauron, J. 1973. The analysis of food proteins, aminoacid composition and nutritive value, en: *Proteins in Human Nutrition*, Porter, y Rolls (eds.), Academic Press, London, Great Britain.
45. Meyer, Edwin. 1967. Soy Protein Concentrates and Isolates, en: *International Conference on Soybean Protein Foods*. U. S. Department of Agriculture, U. S. A.
46. Morrison, F. B. 1943. Alimentos y Alimentación. Corporación de Fomento de la Producción, Santiago, Chile.
47. National Academy of Sciences. 1980. Recommended Dietary Allowances, Food and Nutrition Board-National Research Council. National Academy of Sciences, U. S. A.

48. Neal, W. M., Rusoff, L. L. , Ahmann, C. F. 1935. The Isolation and some properties of an alkaloid from Crotalaria Spectabilis Roth. J. Am. Chem. Soc., 57:2560-2561.
49. Pellet, P. L. 1973. Methods of Protein Evaluation with Rats, en: Proteins in Human Nutrition, Porter y Rolls, (eds,). Academic Press Inc., London.
50. Piercy, P. L., And Rusoff, L. L. 1946. Crotalaria Spectabilis Poisoning in Lousiana Livestock. J. Am. Vet. Med. Assoc., 108: 69-73.
51. Pilcher, H. and Williams, H. 1954. Microbiological evaluation of protein studies. J. Nutr. 53,589.
52. Pirie, N. W. 1966. Science, 152. : 1700-1705.
53. Sanjur, D. 1982. Social and Cultural Perspectives in Nutrition. Prentice-Hall, Inc., U. S. A.
54. Selle, Margarita. 1982. Evaluación química y nutricional de la almendra de semilla de hule ( Hevea brasiliensis). Tesis. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
55. Shaw, Richard. 1965. Incaparina: un alimento rico en proteínas para los países en desarrollo. Desarrollo económico, vol. 2, No. 2., Buenos Aires, Argentina.
56. Shorrocks, C. and Ford, J. E. 1973. An improved procedure for the determination of available lysine and methionine with Tetrahymena, en: Proteins in Human Nutrition, Porter and Rolls, (eds.). Academic Press, London.
57. Standley, P. and Steyermark, J. 1946. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum Press, U. S. A.
58. Stott, J. A., H. Smith and G.D. Rosen. 1963. Brit. J. Nutr. 17:227.

59. Stott, J. A., and Smith, H. 1966. Brit. J. Nutr. 20:663-673.
60. Sullivan, J.T. 1943. Science, 98:363.
61. Suskind, R. M. 1977. Characteristics and Causation of Protein Calorie Malnutrition in the Infant and Preschool child, en: Malnutrition, Behavior and Social Organization, Lawrence, S. Greene (ed.). Academic Press, London.
62. Tablade Composición de Alimentos de Centro América y Panamá. 1953. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 3a. ed., Guatemala.
63. Tabla de Composición de Alimentos. 1960. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 4a. ed., Guatemala.
64. Torev, Atanas. 1973. Industrial Technology for the Production of Higher Fungi Mycelum. Publishing House of the Bulgarian Academy of Sciences. Sofia, Bulgaria.
65. Valli, A., N. A. Rao and P. K. Vijayaraghavan. 1965. Isolation and Composition of Leaf Protein from certain species of Indian Flora. J. Sci. Food. Agr. 16:116-120.
66. Vidas en Peligro, Las proteínas y el niño. 1970. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), Italia.
67. Wolf, W. J. 1972. Purification and properties of the proteins, en: Soybeans: Chemistry and Technology. The Avi Publishing Company, Inc. U.S.A.
68. Wu Leung, Woot-Tsuen. 1961. Tabla de Composición de Alimentos para uso en América Latina. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá-ICNND, Guatemala.
69. Yáñez, E. 1970. Producción y Posible Utilización de Concentrados Proteínicos de Pescado. Conferencia sobre recursos protéicos

en la América Latina. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala.

70. Zimmermann, Gideon. 1954. The effect of heat treatment on the nutritive value of protein in food and feedstuffs. Biol. Abstr. 28::8804.

C U A D R O 1

Resumen de resultados de análisis de diferentes investigadores sobre el Chipilín

	Arroyave (3)	De León (21)	INCAP (62) crudo	INCAP (62) cocido	LAT (40) # *	INCAP (63)	Wu Leung (68)
Humedad g/100g	81.9	81.9	82.2	95.7	6.6	81.8	81.6
Extracto Etéreo g/100g	0.5	0.54	0.8	0.7	5.4	1.0	0.8
Fibra Cruda g/100g	1.8	1.80	1.9	0.4	14.0	1.9	2.0
Proteína g/100g	6.2	7.56	7.0	1.5	30.5	7.1	7.0
Cenizas g/100g	1.5	-	1.4	0.3	7.1	1.4	1.5
Calcio mg/100g	313	-	215	80	-	248	287
Fósforo mg/100g	71	-	77	17	-	74	72
Hierro mg/100g	5.9	-	4.2	1.4	-	4.9	4.7
Carotenos mg/100g	7.05	-	2.83	0.38	-	3.8	3.1
Tiamina mg/100g	0.29	-	0.33	0.08	-	0.3	0.3
Riboflavina mg/100g	0.34	-	0.47	0.12	-	0.52	0.5
Niacina mg/100g	2.07	-	1.86	0.45	-	2.02	2.0
Ac. Ascórbico mg/100g	124	-	108	7	-	112	100
Desgaste %	-	-	44	-	-	48	-
Calorías	-	-	54	16	-	57	56
Carbohidratos totales g/100g	-	-	8.6	1.8	-	8.7	9.1

# muestra deshidratada

\* muestra liofilizada

CUADRO 2

" Contenido de aminoácidos esenciales en microorganismos"  
Tomado de: Enebo, L. Single cell protein (23)

Bacteria	Contenido % en base seca	
	Aminoácidos esenciales	Proteína ( Nx6.25 )
Staphylococcus Aureus	22	67
Escherichia coli	33	82
Bacillus subtilis	24	63

CUADRO 3

Comparación de contenidos de aminoácidos en diferentes fuentes de proteína  
Tomado de: Torev, A. (64)

Cantidades en g/100g

Aminoácido	PS64	Carne	Caseína	Soya
Lisina	8.5	8.4	8.4	6.4
Treonina	5.3	4.0	5.0	3.8
Valina	6.0	5.7	7.4	5.0
Isoleucina	5.1	5.1	6.2	6.4
Leucina	7.2	8.4	9.4	6.6
Triptofano	1.4	1.1	1.2	1.2
Metionina	1.9	2.3	2.0	0.7
Cistina	0.9	1.4	0.3	-
Fenilalanina	3.9	4.0	5.1	4.8
Tirosina	3.4	4.0	6.4	3.1
Total de aminoácidos esenciales	43.6	44.4	51.4	38.0
Histidina	2.9	2.9	3.2	2.3
Arginina	5.8	6.6	4.2	6.0
Serina	4.9	3.8	6.4	-
Glutamina ácida	16.2	14.2	22.9	-
Prolina	4.0	5.4	10.9	-
Glicina	4.5	7.1	2.0	-
Alanina	7.5	5.4	3.3	-

C U A D R O 4

Composición química de diferentes partes del Chipilín

Muestra	Humedad g/100g	Extracto Etéreo g/100g	Fibra Cruda g/100g	Proteína Cruda (Nx6.25) g/100g	Cenizas g/100g	CHO <sup>*</sup> g/100g	Ca mg/100g	P mg/100g	Fe mg/100g
Planta Completa	84.4(0.4) Base seca	0.80 5.13(0.30)	4.9 31.4(0.5)	4.7 30.0(0.10)	1.2 7.7(0.2)	2.7 17.3(0.3)	155.9 999.4(10.0)	71.0 455.1(5.6)	5.4 34.6(0.9)
"Jalado"	83.9(0.3) Base seca	0.85 5.28(0.25)	1.6 9.9(0.4)	6.8 42.2(0.08)	1.3 8.1(0.2)	5.6 34.8(0.4)	158.4 983.9(9.5)	72.0 447.2(2.1)	5.8 36.0(1.1)
"Sobrante"	85.7(0.3) Base seca	0.39 2.73(0.29)	6.1 42.7(0.5)	2.0 14.0(0.10)	1.0 7.0(0.3)	4.8 33.6(0.5)	85.8 600.0(8.4)	56.8 397.2(1.9)	4.5 31.5(0.9)
Hojas	81.7(0.2) Base seca	- -	- -	7.9 43.2(0.10)	- -	- -	- -	- -	- -
Hojas y Puntas	82.0(0.2) Base seca	- -	- -	7.2 40.0(0.09)	- -	- -	- -	- -	- -
Tallos	86.0(0.2) Base seca	- -	- -	1.8 12.9(0.11)	- -	- -	- -	- -	- -

\* Calculados por diferencia

( ) Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

CUADRO 5

Extracciones de jugo de Chipilín bajo diferentes condiciones

Efecto del volumen de solvente	g Chipilín	ml H <sub>2</sub> O	% proteína cruda extraída
	50	75	31.3(0.08)
	50	100	32.8(0.07)
	50	125	32.1(0.09)
	50	150	34.4(0.06)

Efecto del tiempo de extracción (utilizando 50g de Chipilín + 150 ml de agua)	tiempo de extracción (min)	%proteína cruda extraída
	1.5	34.2(0.10)
	4.0	35.5(0.06)
	8.0	29.9(0.07)
	12.0	20.7(0.10)

Efecto del solvente (extrayendo 50g de Chipilín + 150 ml de solvente, durante 4 minutos)	Solvente	$\mu$	%proteína cruda extraída
	NaOH pH 9	0.00001	39.4(0.08)
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.004M	0.012	32.6(0.07)
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.004M pH 9	0.01201	41.8(0.06)
	H <sub>2</sub> O		35.5(0.10)

( ) Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

C U A D R O 6

Composición química del extracto liofilizado y del residuo

Muestra	Humedad g/100g	Extracto Etéreo g/100g	Fibra Cruda g/100g	Proteína Cruda (Nx6.25) g/100g	Cenizas g/100g	CHO* g/100g	Ca mg/100g	P mg/100g	Fe mg/100g
Extracto Liofilizado	-	5.2(0.29)	1.2(0.20)	45.6(0.09)	15.7(0.2)	32.3(0.4)	994.7(6.1)	647.1(2.9)	22.6(1.1)
Residuo	76.6(0.4)	0.94	6.7	5.0	1.4	8.9	183.8	47.8	8.1
Base seca		4.02(0.24)	28.6(0.4)	21.4(0.08)	6.0(0.2)	37.9(0.5)	785.5(6.4)	104.3(2.3)	34.6(0.9)

\* Calculados por diferencia  
( ) Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar.

C U A D R O 7

Resultados de evaluación biológica de dietas conteniendo harina de Chipilín y extracto liofilizado como complemento de una dieta basal de maíz y frijol

Dieta	%Proteína en dieta	Alimento prom. ingerido (g)	Aumento prom. de peso (g)	NPR	Contenido de hemoglobina en sangre (g/dl)
Maíz-Frijol (72-18)	10.4 (0.07)	175.0 (19.5)	48.5 (8.6)	3.1 b (0.31)	13.08 (0.27)
Maíz-Frijol-Har. de Chipilín (61.2-15.3-4.0)	10.2 (0.06)	167.5 (19.1)	46.4 (10.4)	3.2 b (0.30)	13.99 (0.60)
Maíz-Frijol-Har. de Chipilín (50.3-12.6-8.0)	10.0 (0.07)	169.1 (7.2)	43.3 (5.8)	3.0 b (0.30)	14.01 (0.40)
Maíz-Frijol-Exto. Liofilizado (61.2-15.3-3.5)	10.2 (0.08)	157.6 (19.0)	43.8 (7.4)	3.2 b (0.30)	14.97 (0.83)
Caseína	9.6 (0.06)	165.4 (13.2)	57.9 (8.5)	4.2 a (0.25)	13.83 (1.02)

Peso inicial promedio : 45g

Dieta libre de nitrógeno: % Proteína 0.7(0.10) Alimento prom. ingerido 61.8g(8.6), Aumento pro. de peso-8.1g(2.9), contenido de hemoglobina 14.34(1.19) g/dl.

( ) Los números entre paréntesis son las desviaciones estándar.

a,b: diferencia significativa entre valores con letra diferente (p<0.05)

CUADRO 8

Resultados de evaluación de dietas conteniendo harina de Chipilín y extracto liofilizado como única fuente de proteína y efecto complementario a una dieta de maíz-frijol de una mezcla liofilizada de jugos de Chipilín y Tomate.

Dieta	%Proteína en dieta	Alimento prom. ingerido (g)	Aumento prom. de peso (g)	NPR	%Digestibilidad Verdadera
Harina de Chipilín	10.4 (0.07)	118.9 (11.4)	17.6 (3.3)	2.2 d (0.27)	84.0 (0.02)
Harina de Chipilín + 0.2% metionina	10.4 (0.09)	170.3 (16.9)	46.5 (12.4)	3.1 b (0.50)	-- --
Extracto Liofilizado	10.9 (0.08)	103.6 (8.9)	9.8 (3.5)	1.7 e (0.38)	89.0 (0.02)
Maíz-Frijol (72:18)	10.2 (0.08)	193.8 ( 8.6)	54.0 (5.1)	3.1 b (0.32)	86.0 (0.009)
Maíz-frijol-mezcla jugos de Tomate-Chipilín (1:1) (61.2:15.3:6.0)	10.2 (0.07)	197.7 (5.8)	46.1 (6.5)	2.7 c (0.31)	87.0 (0.009)
Caseína	10.2 (0.06)	183.9 (14.0)	65.3 (8.9)	4.0 a (0.36)	96.0 (0.009)

Peso inicial promedio: 47.9 g

Dieta libre de nitrógeno: % proteína 0.7(0.1), Alimento prom. ingerido 69.6 g(8.1), Aumento prom. de peso -9.0 g(2.5)

( ) Los números entre paréntesis son las desviaciones estándar.

a,b,c,d,e: diferencia significativa entre valores con letra diferente (  $p < 0.05$  ).

CUADRO 9

Precipitación de proteína por cambio en el pH.

pH	% de proteína en sobrenadante	
1	0.75	(0.12)
2	0.49	(0.10)
3	0.49	(0.09)
4	0.47	(0.11)
5	0.49	(0.11)
6	0.70	(0.10)
7	0.75	(0.13)
8	0.75	(0.09)
9	0.76	(0.08)

( ) Los valores entre paréntesis son las desviaciones estándar

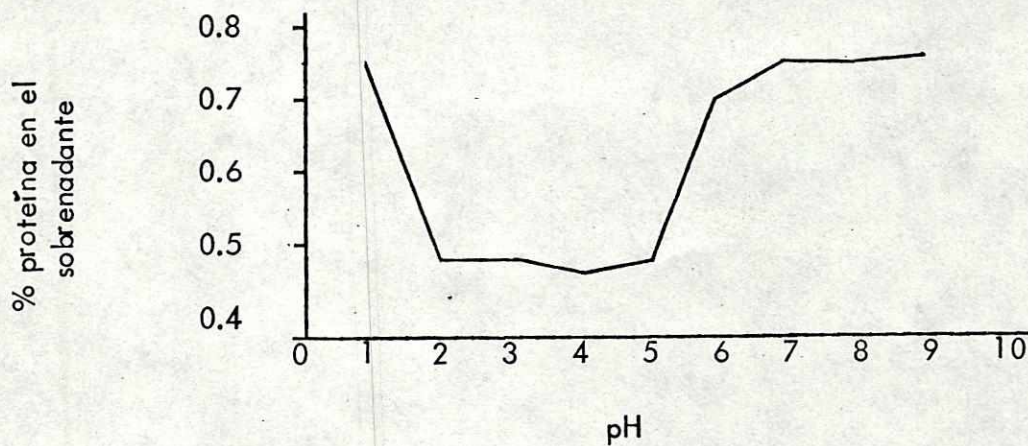


FIGURA 1

Representación gráfica de precipitación de proteína según el pH

CUADRO 10

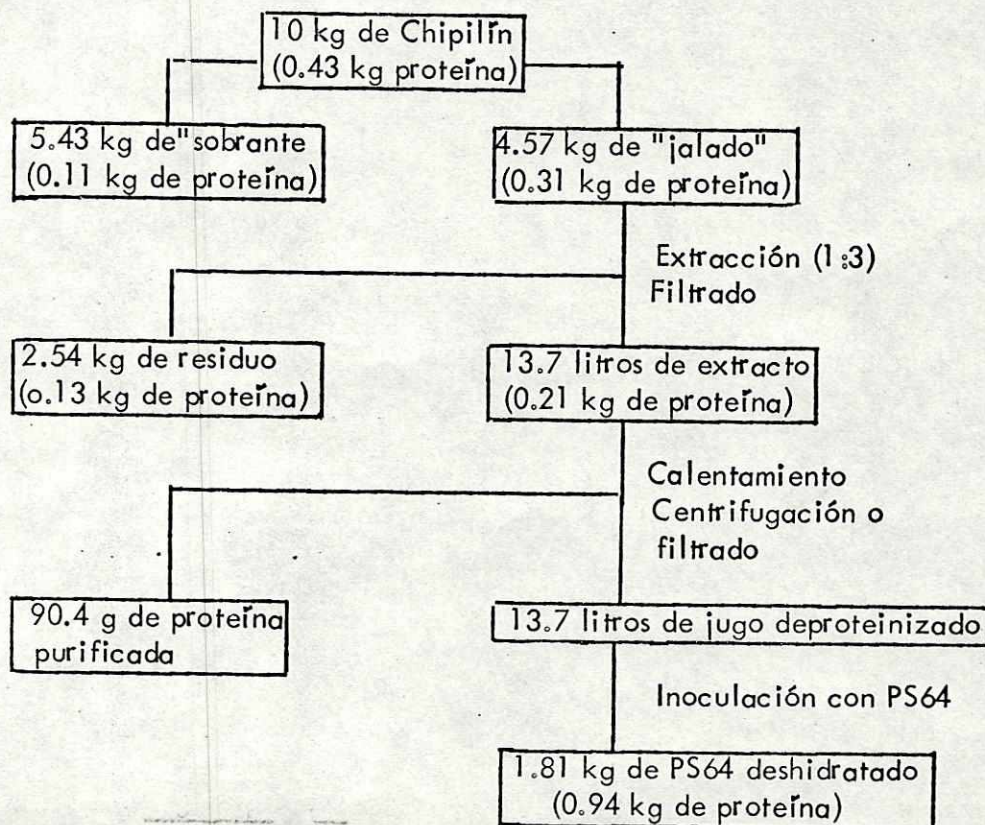
Balance de Materiales

Parte de la planta	% respecto de la planta completa	
Hojas	36.3	(5.2)
Tallos	63.7	(6.3)
Hojas + peciolo ("jalado")	45.7	(5.9)
Tallos + peciolo ("sobrante")	54.3	(6.0)
Residuo de extracción	25.4	(4.9)

( ) Los números entre paréntesis son desviaciones estándar

FIGURA 2

Balance de Materiales



CUADRO 11

Composición química de tres plantas consumidas en Guatemala  
(63, 68) Datos en base húmeda

Planta	Extracto Etéreo g/100g	Fibra Cruda g/100g	Proteína g/100g	Cenizas g/100g	Ca mg/100g	P mg/100g	Fe mg/100g
Alfalfa	0.4	3.1	6.0	-	12	51	5.4
Espinaca	0.4	0.8	2.6	1.8	60	30	3.2
Acelga	0.4	0.9	2.6	1.6	--	--	-

Vo.Bo. :

(f) M. Lillian Paiz  
Ing. María Lillian Paiz  
Asesor

(f) Ricardo Bressani  
Dr. Ricardo Bressani  
Asesor

Tribunal :

(f) Ricardo Bressani  
Dr. Ricardo Bressani

(f) M. Lillian Paiz  
Ing. María Lillian Paiz

(f) Elvira de Mejía  
Ing. Elvira de Mejía

Fecha de aprobación: 21 de junio de 1985