



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efecto de los tratamientos ultrasonido, hervido y horneado sobre el contenido de mimosina en la semilla del guaje (*Leucaena leucocephala*), y evaluación de la bioaccesibilidad de la proteína.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

PRESENTA:

I.A. MARIANA HERNÁNDEZ DÍAZ

DIRECTORA:

DRA. MIRNA PATRICIA SANTIAGO GÓMEZ

CO-DIRECTORA:

M. en C. ALMA YADIRA SALAZAR GOVEA

HEROICA CIUDAD DE HUAJUAPAN DE LEÓN OAXACA, MAYO 2026.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Para la realización de los estudios de maestría, se contó con la beca de manutención número 1314383, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), actualmente denominado Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).

Parte de los resultados obtenidos de este trabajo se presentaron en el XIII Simposio Nacional de Ingeniería Química y Bioquímica Aplicada, en la modalidad de cartel, realizado durante los días 10, 11 y 12 de septiembre del 2025, en el Auditorio General del Edificio Central de la Universidad Autónoma de Coahuila.

La C. Andrea Yotzimi Bautista García, alumna del sexto semestre de la Universidad de la Costa, realizó una estancia profesional del 29 de Julio del 2024 al 19 de septiembre del 2024 bajo mi dirección, participando en la evaluación del contenido de mimosina y proteína en la semilla de guaje (*L. Leucocephala*) tratada mediante horneado y hervido.

AGRADECIMIENTOS

¡A Dios!

A mis dos hijos, Renata y Axel, motor y refugio de este sueño. Cada página de esta tesis guarda su amor, su paciencia y las horas robadas a su tiempo. Gracias por sus abrazos y por recordarme siempre lo que realmente importa.

A Gerardo, mi compañero de vida por su amor y apoyo incondicional a lo largo de estos 17 años.

A mis padres, Germán y Genoveva, por su ejemplo de constancia y por creer en mí. Este logro también es suyo. A mis hermanas Ríos, por su presencia constante. A Chonita, por cuidar de mis tesoros más valiosos.

A la Dra. Paty, por su guía, exigencia y generosidad académica, y sobre todo por habernos enseñado a soñar en el mundo de la investigación. A la maestra Alma, por su humanidad con quienes la rodean; extrañaré sus mañanas de olor a café. A los revisores de esta tesis: al Dr. Héctor, por su asertividad y gentileza; al Dr. Raúl, por su claridad al explicar; a la maestra Edith, por sus atinadas observaciones; a la maestra Ana Delia, por la revisión estadística y por sus consejos; a la Dra. Edith, por su apoyo; a la Dra. Bety, por sus enseñanzas en clases y tutorías; y a la Dra. Norma, por su valiosa ayuda. Agradezco también a todos los profesores que compartieron su conocimiento en las aulas: a la Dra. Luz, la Dra. Paula, al Dr. Domingo y al Dr. Rogelio, por los buenos y malos momentos, mil gracias, porque de todos ellos crecí como persona. A la Lic. Blanca, Lucy, Carmen y Celes por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio: Hugo, Selene, Ana, Deisy, Ismael, Sofy, Axia, Ángel —y muy especialmente a Ana Pao, Dianita, Mayel, Marcos y Olvet—, gracias por cada conversación compartida. A Andy, por su apoyo a este proyecto y, más aún, por su compañía.

A Marlit —gracias por todo, Mar— y a Cami: las quiero. A Maybe, por sus enseñanzas y charlas. A Juan Carlos, Jerzain, Yarely y Angélica, por el material proporcionado y los consejos compartidos.

A Mich, la vida nos hizo coincidir desde el primer día de esta aventura. Sin ti y tus jalones de oreja no habría llegado hasta aquí. Gracias por estar siempre y por seguir a mi lado con nuevas metas. Te quiero mucho.

A Yoss y a Migue, mis queridos profesores: siempre en mi corazón.

Y a todos los que, de una u otra forma, caminaron conmigo en esta etapa: gracias totales.

Resumen

La desnutrición, definida como un estado resultante del déficit de energía, proteínas u otros nutrientes, es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, ya que afecta negativamente la función de tejidos y órganos. En este contexto, las semillas de guaje (*Leucaena leucocephala*) emergen como una opción nutricional viable debido a su importante contenido de proteínas (31.70 %). Sin embargo, su consumo está limitado por la presencia de mimosina, un compuesto antinutricional que oscila entre el 3 % y el 5 %. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los tratamientos horneado, hervido y ultrasonido sobre el contenido de mimosina en la semilla del guaje (*L. leucocephala*), así como evaluar la bioaccesibilidad de la proteína de la semilla tratada. Para lograr lo anterior, se aplicaron tres diferentes tiempos para cada tratamiento: horneado a 93°C (5, 8 y 10 minutos), hervido a temperatura de ebullición (10, 20 y 35 minutos) y ultrasonido (10, 20 y 30 minutos). A cada tratamiento se le determinó la concentración de mimosina mediante el método colorimétrico. Posteriormente, se evaluó la bioaccesibilidad de la proteína *in vitro* en tres condiciones: harina de semilla de guaje con tratamiento de ultrasonido a 30 min, harina de semilla de guaje sin tratamiento y semilla fresca de guaje. Finalmente, se realizó el análisis de las fracciones proteicas de la simulación gástrica *in vitro* mediante electroforesis (SDS-PAGE). El mejor tratamiento para disminuir la concentración de mimosina (77.255 ± 1.0431 mg/mL) fue ultrasonido durante 30 minutos. La muestra de harina tratada con ultrasonido a 30 min obtuvo el más alto porcentaje de bioaccesibilidad (83.207 %), seguida de la harina sin tratamiento (65.221 %) y de la semilla fresca (43.823 %). El análisis electroforético, demostró que la harina de semilla de guaje sin tratamiento tiene una limitada bioaccesibilidad de la proteína ya que las bandas correspondientes a pesos moleculares de 119, 64 y 35 kDa, se presentaron en las tres fases de digestión; sin embargo, la harina tratada con ultrasonido resultó favorable, ya que se observó solo una banda con un peso molecular de 119 kDa situada en la fase intestinal, lo cual podría indicar que el tratamiento desintegró las globulinas 11S y las globulinas 7S.

Palabras claves: *Leucaena leucocephala*, proteína, mimosina, bioaccesibilidad, electroforesis SDS-PAGE.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	IX
Índice de tablas.....	XIV
Índice de figuras	XV
Introducción	- 17 -
Capítulo 1. Marco teórico.....	- 19 -
1.1. Guaje (<i>Leucaena leucocephala</i>).....	- 19 -
1.1.1. Producción, propiedades y usos.	- 21 -
1.1.2. Perfil químico y nutricional.	- 23 -
1.2. Mimosina.....	- 26 -
1.2.1. Técnicas para la detección de mimosina.	- 32 -
a) Cromatografía de capa fina.	- 32 -
b) Colorimétricas.	- 33 -
1.2.2. Técnicas de eliminación de mimosina.....	- 34 -
a) Ultrasonido.	- 34 -
b) Hervido.....	- 36 -
c) Horneado.	- 37 -
1.3. Proteínas vegetales.....	- 37 -
1.4. Métodos para la cuantificación de proteína.	- 40 -
1.4.1. Método Kjeldahl.	- 42 -
1.4.2. Método Bradford.	- 43 -
1.5. Bioaccesibilidad de componentes de los alimentos.	- 44 -
1.5.1 Modelos de bioaccesibilidad <i>in vivo</i>	- 45 -
1.5.2 Modelos de bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	- 45 -
Capítulo 2. Marco introductorio.....	- 47 -
2.1 Justificación.....	- 47 -
2.2. Originalidad.....	- 48 -

2.3. Alcances y limitaciones.	- 48 -
2.4. Objetivos.	- 48 -
2.4.1. Objetivo general.....	- 48 -
2.4.2. Objetivos específicos.	- 48 -
Capítulo 3. Metodología.	- 51 -
3.1. Reactivos y equipos utilizados.....	- 52 -
3.2. Obtención de la materia prima.....	- 52 -
3.3. Análisis bromatológicos.	- 53 -
3.3.1. Determinación de humedad (Método AOAC, 925.09).	- 53 -
3.3.2. Determinación de lípidos por el método de Soxhlet (Método AOAC, 920.39). ...	- 53 -
3.3.3. Evaluación del color.....	- 54 -
3.3.4. Determinación de proteína por el método de Bradford.....	- 54 -
3.3.5. Determinación de proteína por el método de micro-Kjeldahl.	- 56 -
3.4. Métodos propuestos para eliminación de mimosina.	- 57 -
3.4.1. Horneado.....	- 57 -
3.4.2. Hervido.	- 57 -
3.4.3. Ultrasonido.	- 58 -
3.5. Determinación de mimosina.	- 58 -
3.6. Evaluación de bioaccesibilidad de proteína de la semilla de guaje (<i>L. leucocephala</i>).-	60 -
3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	- 62 -
3.7. Análisis estadístico.	- 63 -
Capítulo 4. Resultados y discusión.	- 65 -
4.1 Rendimiento de la semilla de guaje (<i>L. leucocephala</i>).	- 65 -
4.2 Contenido de humedad, lípidos y proteína de la semilla de guaje.	- 65 -
4.3 Color de la harina de la semilla de guaje.	- 66 -
4.4 Contenido de proteína de las muestras de semilla de guaje tratadas por hervido, horneado y ultrasonido.....	- 68 -

4.5 Efecto de los tratamientos propuestos sobre el contenido de mimosina.....	- 75 -
4.6 Características sensoriales de las harinas de guaje obtenidas mediante los diferentes tratamientos.	- 80 -
4.7 Estudio de bioaccesibilidad de la proteína de <i>Leucaena leucocephala</i>	- 82 -
4.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE.....	- 84 -
Capítulo 5. Conclusiones.	- 89 -
Capítulo 6. Perspectivas.	- 91 -
7. Referencias.....	- 93 -
8. Anexos.	- 107 -

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Leucaena leucocephala</i>	19
Tabla 2.	Valores nutricionales de la semilla del género <i>Leucaena</i>	20
Tabla 3.	Estudios microbiológicos de <i>Leucaena leucocephala</i> proveniente de diferentes países.....	22
Tabla 4.	Perfil nutricional de la semilla de guaje (<i>L. leucocephala</i>).....	23
Tabla 5.	Perfil de aminoácidos de la semilla de guaje (<i>L. leucocephala</i>).....	25
Tabla 6.	Metabolitos secundarios y cepas susceptibles a <i>Leucaena leucocephala</i>	26
Tabla 7.	Concentración de mimosina en <i>Leucaena leucocephala</i>	28
Tabla 8.	Tratamiento para eliminación de antinutrientes aplicados a leguminosas.....	30
Tabla 9.	Pruebas colorimétricas de identificación de metabolitos secundarios.....	34
Tabla 10.	Contenido proteico de diferentes leguminosas.....	39
Tabla 11.	Preparación de la curva patrón con albúmina bovina.....	55
Tabla 12.	Composición del fluido salival simulado (FSS); fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) para un volumen final de 500 mL.....	61
Tabla 13.	Porcentaje de humedad, lípidos y proteína de la semilla de guaje fresca y seca (<i>L. leucocephala</i>).....	65
Tabla 14.	Resultados de la comparación de los parámetros del color de la semilla de guaje con ΔE	67
Tabla 15.	Pruebas de efectos intra-sujetos teniendo como medida el porcentaje de proteína....	73
Tabla 16.	Comparaciones por parejas teniendo como medida el porcentaje de proteína.....	74
Tabla 17.	Comparaciones por parejas de los diferentes tratamientos sobre el contenido de mimosina	79
Tabla 18.	Cuantificación de proteína en las tres fases de la digestión (<i>L. leucocephala</i>).....	82

Índice de figuras

Figura 1.	<i>Leucaena leucocephala</i>	20
Figura 2.	Semilla de guaje (<i>L. leucocephala</i>).....	21
Figura 3.	Ruta de biosíntesis de mimosina.....	27
Figura 4.	Estructura molecular de mimosina.....	27
Figura 5.	Cromatografía de capa fina.....	32
Figura 6.	Espectro electromagnético.....	33
Figura 7.	Acomplejamiento del Cu con dos enlaces peptídicos adyacentes.....	40
Figura 8.	Fases de la digestión <i>in vitro</i> en modelos estáticos.....	46
Figura 9.	Diagrama de flujo general de la metodología.....	51
Figura 10.	Preparación de las disoluciones para la curva de calibración con albúmina bovina.....	55
Figura 11.	Curva de calibración de Bradford.....	56
Figura 12.	Curva de calibración de <i>L-mimosina</i>	59
Figura 13.	Metodología de simulación de la digestión en humanos.	62
Figura 14.	Gráficas del porcentaje de proteína obtenidos por los métodos de Bradford y Kjeldahl de las muestras de harina de semilla de guaje sometidas a diferentes tratamientos.....	69
Figura 15.	Contenido de mimosina en la semilla de guaje tratada a diferentes tiempos por A: Horneado, B: Hervido y C: Ultrasonido	76
Figura 16.	A. Semilla fresca, B. Semilla hervida durante 30 min a T de ebullición.....	80
Figura 17.	Sedimento de harina de guaje después del tratamiento de ultrasonido.....	81
Figura 18.	Muestra de harina de guaje seca después del tratamiento de ultrasonido.....	81
Figura 19.	Harina de guaje obtenida tras el tratamiento de ultrasonido	81
Figura 20.	Gel de electroforesis SDS-PAGE	85

Introducción

La desnutrición puede definirse como un estado resultante del déficit de energía, proteínas u otros nutrientes. La desnutrición es uno de los principales problemas de salud mundial debido a que causa efectos negativos en la función de los tejidos y órganos, lo cual puede derivar en enfermedades como: marasmo y kwashiorkor, entre otras (Pulgar et al., 2020). Los seres humanos y los animales consumen proteínas principalmente como fuente de nitrógeno y aminoácidos proteinogénicos necesarios para la síntesis de nuevas biomoléculas y, en menor medida, como fuente de energía. La calidad y el valor nutricional de las proteínas dependen en gran medida de su composición de aminoácidos, en particular de los nueve aminoácidos indispensables (fenilalanina, valina, treonina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, lisina e histidina).

Las niñas y los niños en etapas tempranas se encuentran en mayor riesgo de presentar algún tipo de mala nutrición con repercusiones en su bienestar físico, mental y social (Walson & Berkley, 2018). En México, el análisis más reciente de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) indica que, para el periodo 2020 al 2023, la prevalencia de baja talla en menores de cinco años se mantiene en 13.9 % (Rivera-Dommarco et al., 2024). Esta cifra representa a más de un millón de niños en edad preescolar que no alcanzan su potencial de crecimiento. Para minimizar este tipo de problemas nutricionales se ha incrementado la producción de alimentos altamente nutritivos empleando una gran variedad de materias primas entre las que destacan las leguminosas por su alto valor proteico (Barreto et al., 2016).

Las leguminosas son uno de los alimentos de origen vegetal de mayor consumo en dietas en los países en vías de desarrollo (Astiasaran & Martínez, 2000). De acuerdo con Shavanov (2021) las leguminosas que pertenecen a la familia *Leguminosae* o *Fabaceae*, ocupan el segundo lugar de consumo después de los cereales por su alto contenido y calidad de proteínas, grasas insaturadas, fibra dietética, minerales esenciales, vitaminas, antioxidantes y bajo índice glucémico, bajo costo y alto rendimiento, siendo en muchos países uno de los alimentos básicos (Samtiya et al., 2020). Económicamente, las leguminosas representan la segunda familia más importante de las plantas cultivadas después de la familia de las gramíneas o *poaceae* que incluye los cereales. Las leguminosas de grano representan el 27 % de la producción agrícola mundial y proporcionan el 33 % de la proteína de la dieta consumida por los seres humanos, mientras que los pastos y leguminosas forrajeras proporcionan parte vital de la alimentación animal (Smýkal et al., 2014).

Se sabe que las semillas (chía, cáñamo, quinoa, girasol, calabaza), cereales (alforfón, avena, sorgo), frutas (guayaba, maracuyá, aguacate), flores (calabaza, brócoli), raíces (lotus root, macá, ñame, yuca) y brotes (lentejas, garbanzos, soja, trigo) de diferentes plantas se han utilizado con fines nutricionales desde la antigüedad (Verma et al., 2018). Actualmente, debido a su alto contenido de proteínas de calidad, se están convirtiendo en una alternativa a la proteína de origen animal, siendo el foco de atención de las investigaciones actuales y futuras (Gouri Das et al., 2022). Algunas proteínas de origen vegetal que han ganado relevancia se obtienen de leguminosas como: soja, chícharo, habas o lupino; de cereales como: trigo, avena y arroz; pseudocereales como: quinua, amaranto y chíá; frutos secos como: nueces, nuez de la india, almendras, cacahuates; y semillas como cáñamo (Thakur et al., 2023).

En este sentido, se plantea la necesidad de buscar alternativas de alimentos que puedan aportar nutrientes en cantidad y calidad suficientes para ser incorporados en otros alimentos, las semillas de guaje (*Leucaena leucocephala*) son un producto natural que contiene nutrientes como 2.98 % de minerales, 8.05 % de ácidos grasos, 31.70 % de proteínas y 61.31 % de carbohidratos entre otros, se puede encontrar inclusive fuera de temporada de producción en la región mixteca, sin embargo, de acuerdo con la literatura se sabe que contienen de un 3 % a un 5 % de mimosina, el cual es un compuesto antinutricio por lo que es importante eliminarlo antes de consumirlo (Das Sharma & Sarkar, 2022). Debido a lo anterior, en este estudio se evaluaron tres tratamientos para la reducción de mimosina: hervido, horneado y ultrasonido. Finalmente, se determinó la bioaccesibilidad de la proteína de harina de semilla de guaje con menor contenido de mimosina mediante pruebas *in vitro* (Gutiérrez et al., 2009).

Capítulo 1. Marco teórico.

1.1. Guaje (*Leucaena leucocephala*).

El guaje (*Leucaena leucocephala*) es un árbol tropical sin espinas, con una altura de alrededor de 8 m originario de América tropical y que pertenece a la familia *Fabaceae* y a la subfamilia *Mimosoideae* (Genet et al., 2013) (Tabla 1). Con corteza lisa, color gris claro brillante o parduzca; el fruto es cactáceo, generalmente rojizo o pardo, las semillas son obovadas; castaño rojizas verdes o amarillentas.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Leucaena leucocephala*.

Categorías	Clasificación
Reino	Vegetal
Subdivisión	<i>Embriophyta</i>
Clase	<i>Fanerogama</i>
Subclase	<i>Dicotiledonea</i>
Orden	Rosales
Familia	<i>Leguminoseae o Fabaceae</i>
Subfamilia	<i>Mimosoideae</i>
Género	<i>Leucaena</i>
Especie	<i>Leucocephala</i>

Fuente: Robles, 1990.

El nombre genérico de la *Leucaena* asignado a los guajes proviene del griego leukos, que significa "blanco", referido al color de las flores de esta especie vegetal (Figura 1) (Peralta-Juárez, 2017). Ahora bien, si solo se hace referencia a México, hay que decir que se encuentra en la vegetación secundaria, sobre todo en las selvas medianas caducifolias y subcaducifolias. Debido a su gran distribución, puede encontrarse desde el norte de Veracruz y sur de Tamaulipas, en la vertiente del pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas (Rivera-Díaz, 2012). Incluso, está en la Costa del Pacífico, el Golfo de México y la Península de Yucatán; esta última posee la mayor distribución (NAS, 1977; Baltazar, 1991). En México, se han hallado doce especies del género *Leucaena*, en donde para el estado de Oaxaca se encuentra el registro de ocho especies, estas son: *L. leucocephala*, *L. esculenta*, *L. lanceolata*, *L. macrophylla*, *L. pallida*, *L. trichandra*, *L. collinsii* y *L. diversifolia* (Peralta-Juárez, 2017).



Figura 1. *Leucaena leucocephala*.

Diversos autores, han indicado valores nutricionales de la semilla del género *Leucaena* (Tabla 2), dentro de los que destaca su alto contenido de proteína.

Tabla 2. Valores nutricionales de la semilla del género *Leucaena*.

Especie	Proteína cruda (%)	Fracción etérea (%)	Carbohidra- tos (%)	Fibra cruda (%)	Minerales (%)	Referencia
<i>Leucaena leucocephala</i>	32.10	8.56	29.91	15.14	1.42	Bravo-Delgado et al. (2019)
<i>Leucaena leucocephala</i>	31.70	2.11	61.31	10.07	4.88	Román-Cortés et al. (2014)
<i>Leucaena esculenta</i>	33.12	3.65	57.89	10.55	5.34	Román-Cortés et al. (2014)
<i>Leucaena leucocephala</i>	31.10	5.60	ND	13.2	4.5	Ahmed and Abdelati (2009)

El guaje (*L. leucocephala*) florece y fructifica de noviembre a julio, respectivamente (Valdez-Hernández et al., 2017). En cuanto a su fruto (Figura 2), este se halla en racimos de 15 a 60 vainas aplanadas que miden de 6.0 a 26.0 cm de largo, por 1.5 a 2.0 cm de ancho, dentro de las cuales se alojan de 10 a 12 semillas las cuales son casi planas, ligeramente biconvexas, de contorno oval a orbicular siempre apiculadas hacia el extremo del micrópilo. Miden 0.5 – 1.0 cm de largo y alrededor de 0.5 cm de ancho (Orwa et al., 2009). La línea fisural es en forma de herradura. La testa es dura y gruesa, de textura serosa, y su coloración varía del verde al marrón oscuro en función del estado de madurez (Sharma et al., 2021). Una característica distintiva es la presencia de una capa consistente de endospermo mucilaginoso y transparente, localizado entre la testa y los cotiledones, el cual es rico en polisacáridos del tipo galactomanano (de Oliveira et al., 2018).

Desde una perspectiva bioquímica, las semillas constituyen una fuente valiosa de proteínas. Sus principales fracciones proteicas son: albúminas, globulinas y glutelinas, las cuales exhiben

perfiles de solubilidad diferenciados en agua, soluciones salinas diluidas y medios alcalinos, respectivamente (Aderinola et al., 2022). Asimismo, el mucílago del endospermo, compuesto primordialmente por galactomanano, representa un componente mayoritario, llegando a constituir entre el 20 % y el 25 % del peso seco de la semilla (Maity et al., 2021). El galactomanano está compuesto por un 57 % de manosa y un 43 % de galactosa, es esencialmente similar en composición a la goma guar (Bravo-Delgado et al, 2019).



Figura 2. Semilla de guaje (*L. leucocephala*).

1.1.1. Producción, propiedades y usos.

A pesar de la reconocida importancia de la semilla de guaje (*Leucaena leucocephala*) en la alimentación de diversas comunidades indígenas de México, documentada por autores como Vázquez (1986) y Casas et al. (1992), persiste una carencia de datos cuantitativos sobre su producción y consumo a nivel nacional. Esta brecha de información es particularmente relevante en estados como Oaxaca, Guerrero, Veracruz y Chiapas, donde el guaje es un componente habitual y popular de la dieta tradicional. Con el fin de cuantificar la producción de cosecha regional, se consultaron los anuarios estadísticos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), cuyo dato oficial para 2024 reporta una producción de 662.35 toneladas, concentrada en los estados de Guerrero, Puebla y Michoacán. Sin embargo, las semillas contenidas en las vainas de *Leucaena leucocephala*, son cosechadas entre los meses de septiembre y enero; y se comercializan principalmente en municipios locales de la región mixteca (García, 2019).

Las semillas frescas de guaje (*L. leucocephala*) se venden en bolsas, mientras que las semillas secas se comen después de tostarse en el comal (Noyola, 2024). Existen algunas preparaciones culinarias en donde se utiliza el guaje, como sopas, guisos, salsas, bebidas, ensaladas y guisos con carne (Balderas-León, 2020). También se venden “tortitas de guaje” las cuales son elaboradas con las semillas tiernas y molidas, obteniéndose una masa la cual se separa en pequeñas porciones, para luego ser secadas al sol. Además, las semillas se utilizan como

sustituto del café y la goma de las semillas se ha utilizado como laxante y para controlar enfermedades estomacales (De Almeida Costa et al., 2006).

Por otro lado, las semillas son usadas como afrodisíaco eupéptico, para la gastralgia, para enfermedades del estómago y como antiparasitario (Peralta-Juárez et al., 2017). El comer la semilla frecuentemente fortalece al sistema inmunitario. También ha mostrado propiedades anticancerígenas, antivirales, anticoagulantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, antidiabéticas e inmunoestimulantes (Salazar, 2019). De acuerdo con Balderas-León et al., (2021) los nutrientes causantes de estas propiedades se concentran en las semillas, las cuales podrían utilizarse como suplementos de proteínas en la nutrición humana. En la Tabla 3 se presentan algunas de las actividades antibacterianas y/o antimicrobianas de *Leucaena leucocephala*.

Tabla 3. Estudios microbiológicos de *Leucaena leucocephala* proveniente de diferentes países.

País de estudio	Usos	Referencia
Myanmar	Efecto antibacteriano de extractos de hojas sobre <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Shigella flexneri</i> .	Nwe et al., 2001
Nigeria	Efecto antimicrobiano de la porción aceitosa de las semillas con efectos significativos sobre cepas bacterianas Gram positivas y negativas.	Aderibigbe, Adetunji & Odeniyi (2011)
India	Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos y acuosos de hojas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Mora-Villa (2021)

Las semillas de guaje se han utilizado como ingrediente en la alimentación para ganado el cual ha sido ya ampliamente documentado (De Angelis et al., 2021; Cabrera-Núñez et al., 2019). El árbol de *L. leucocephala* ha sido utilizado como forraje, madera, leña, combustible, goma, fertilizante orgánico y materia prima para la industria de pulpa y papel (Rastogi & Dwivedi, 2003). También ha sido utilizado en la restauración ecológica (Rodríguez, 2007; Sánchez, 2014; Abou et al., 2011; Peralta et al., 2017; Salem et al., 2011; Chowtivannakul et al., 2016; Syamsudin et al., 2010; Imededdine et al., 2014). Mientras que en la alimentación humana las semillas no se han estudiado a profundidad, aunque se sabe que han sido consumidas ancestralmente en el sur de México (De Almeida Costa et al., 2006).

1.1.2. Perfil químico y nutricional.

El empleo de las leguminosas en la alimentación humana y animal posee una tradición milenaria. Estos vegetales se caracterizan por su elevado contenido proteico, que oscila entre un 20 % y 25 % (García, 2019), y constituyen una fuente importante y económica de proteínas de origen vegetal. Asimismo, presentan un perfil nutricional balanceado, con aportes significativos de vitaminas, minerales e hidratos de carbono, junto con un bajo contenido lipídico (Astiasaran & Martínez, 2000). En lo que respecta a la semilla de guaje (*Leucaena leucocephala*), sus componentes nutricionales se encuentran registrados en la literatura especializada, tal como se detalla en la Tabla 4. Cabe destacar que este ingrediente presenta un notable contenido de proteína, que alcanza un 31.70 % de su composición.

Tabla 4. Perfil nutricional de la semilla de guaje (*L. leucocephala*)

Componente	Contenido (%)
Proteína	31.70
Carbohidratos	61.31
Fibra	15.26
Lípidos	5.36
Ácidos grasos	8.05
Cenizas	2.98

Fuente: Aquino-González et al., 2023.

Desde un punto de vista estructural, los aminoácidos son los componentes de las proteínas y éstas a su vez son las estructuras que componen cualquier tejido vivo, su presencia es tan relevante, que se les conoce como los constructores de la vida (Paolo et al., 2017). Los aminoácidos cumplen importantes funciones, entre ellas la intervención en el metabolismo

energético, y su acción antiestrés minimizando los efectos nocivos que provocan ciertas enfermedades (Slogar España, 2017).

De acuerdo con Aquino-González et al. (2023), las semillas de guaje (*L. leucocephala*) presentan un alto contenido de aminoácidos como el ácido glutámico, arginina y leucina; no obstante, su perfil proteico es deficiente en metionina y cisteína. Esta restricción nutricional, característica de las leguminosas (Tabla 5), lejos de ser un impedimento, sienta las bases para explorar estrategias de mejora. En este sentido, la integración dietética con cereales emerge como una vía particularmente efectiva, ya que su perfil, rico en aminoácidos azufrados, pero a menudo limitante en lisina, resulta complementario al de las leguminosas. Esta sinergia nutricional permite alcanzar un equilibrio proteico que garantiza el aporte de todos los aminoácidos esenciales, consolidándose como un pilar fundamental en la formulación de dietas basadas en plantas (Hertzler et al., 2020).

Tabla 5. Perfil de aminoácidos de la semilla de guaje (*L. leucocephala*).

Aminoácidos	(mg/g fracción proteica)
Alanina	37.75
Arginina	91.05
Ácido Aspártico	203.81
Prolina	70.37
Serina	65.30
Ácido Glutámico	167.54
Glicina	52.07
Histidina	50.08
Cisteína	14.32
Isoleucina	28.10
Leucina	53.9
Lisina	58.3
Metionina	11.64
Fenilalanina	62.94
Treonina	26.22
Tirosina	51.35
Valina	37.88
Metionina-cisteína	25.96
Fenilalanina-tirosina	114.29

Fuente: Aquino-González et al., 2023.

Las semillas de guaje (*L. leucocephala*) están constituidas principalmente de goma galactomanano, esta goma es extraída del endospermo y está compuesta de cadenas lineales de unidades de β -(1-4)-d - manosa sustituidas por unidades individuales de α - D -galactosa en O-6 (Buckeridge et al., 2010). Sin embargo, la relación manosa/galactosa es variable entre especies, porciones o incluso fracciones de *Leucaena* (Mittal et al., 2016). Por ejemplo, para el caso de *Leucaena esculenta* las semillas contienen una gran cantidad de mucílago de galactomanano (20-25 % de rendimiento) ubicado en el endospermo. El galactomanano, compuesto por un 57 % de manosa y un 43 % de galactosa, es esencialmente similar en composición a la goma guar (Gong et al., 2022). En la semilla están presentes, en cantidades menores, algunos ácidos grasos insaturados como linoleico y oleico.

Al igual que otras plantas, las leguminosas también cuentan con varios mecanismos de defensa para que los depredadores no las consuman, siendo uno de ellos la producción de una serie de metabolitos secundarios, llamados antinutrientes (como inhibidores de proteasas, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, fitatos, oxalatos, y mimosina), los cuales tienen la característica de ser tóxicos tanto para los humanos como para los animales. Algunos de estos metabolitos pueden ser beneficiosos para la salud, dependiendo de la cantidad consumida. Balderas-León et al. (2021) identificaron algunos metabolitos presentes en *Leucaena leucocephala* (Tabla 6) así como su actividad microbiana, además de las cepas susceptibles a dichos metabolitos, sin embargo, autores como Pedrosa et al. (2021) concluyeron que el antinutriente de mayor interés en la semilla de guaje es un alcaloide llamado mimosina el cual es un aminoácido tóxico.

Tabla 6. Metabolitos secundarios y cepas susceptibles a *Leucaena leucocephala*.

Metabolitos secundarios	Actividad microbiana	Cepas susceptibles
Taninos condensados, triptaminas, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y ácido oxálico.	Antiprotozoaria, antibacteriana y antifúngica.	Protozoarios: <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Giardia lamblia</i> . Bacterias: <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .

Balderas-León et al, 2021; Noyola, 2024.

1.2. Mimosina.

La mimosina se biosintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, el cual a su vez deriva de la ruta del ácido shiquímico (Figura 3). En una serie de reacciones encadenadas, la L-tirosina es primero hidroxilada (probablemente por una tirosinasa o DOPA oxidasa vegetal) para formar L-DOPA. Posteriormente, la L-DOPA sufre una descarboxilación y una transaminación para generar la 3-hidroxi-4-piridona (HP), un intermediario clave en la ruta. Finalmente, la HP se condensa con L-alanina (o, en algunas especies, con L-serina) en una reacción catalizada por una enzima específica para formar mimosina (Dewick, 2009). De acuerdo con Ogita et al. (2014), la mimosina (Figura 4) es un alcaloide con fórmula molecular $C_8H_{10}N_2O_4$, que pertenece a la clase de los alcaloides de piridina. Su estructura consiste en un anillo de 3-hidroxi-4-piridona sustituido en la posición 1 con una cadena lateral de alanina. Su nombre sistemático es 3-hidroxi-4-piridon-1-alanina, aunque también se le clasifica como un aminoácido no proteínico.

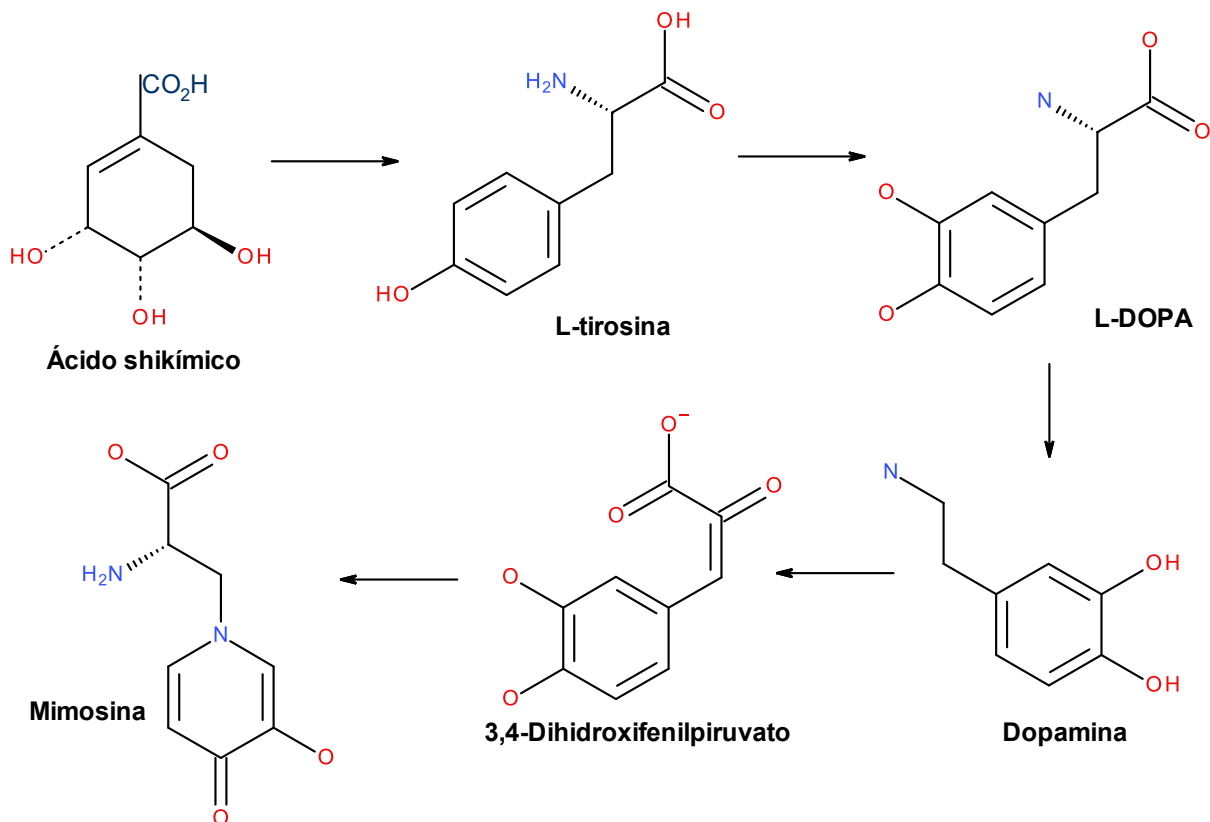


Figura 3. Ruta de biosíntesis de mimosina. Fuente: (Dewick, 2009)

Los alcaloides son compuestos orgánicos que se encuentran en la naturaleza, sirven como mecanismo de defensa para plantas u hongos contra posibles amenazas de depredadores y también han ganado reconocimiento por sus valiosas propiedades medicinales y farmacológicas (Al-Subaie et al., 2022).

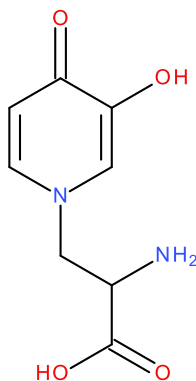


Figura 4. Estructura molecular de mimosina (Valle Vega, 1991).

El átomo de nitrógeno en el anillo de piridina le confiere propiedades ligeramente básicas, también tiene la capacidad de quelar iones metálicos, como el hierro, debido a la presencia del grupo hidroxilo y el nitrógeno en su estructura. Interfiere con la actividad de enzimas como la tirosinasa y otras enzimas dependientes de metales. La mimosina es una tóxina que está distribuida en toda la planta de *Leucaena leucocephala* y se encuentra de un 3 % a 5 % en las semillas y de 1 % a 12 % en diferentes partes de la planta como los tallos y las hojas y de 1 % a 1.5 % en la raíz (Soedarjo et al., 1994; Noyola, 2024). La concentración de mimosina en las semillas varía ampliamente entre los diversos cultivares de la especie. La mimosina representa aproximadamente el 60 % del total de aminoácidos libres en las semillas de *Leucaena leucocephala* (Sethi & Kulkarni, 1995; Balderas-León, 2021).

En la Tabla 7 se muestran estudios del contenido de mimosina en diferentes partes de *Leucaena leucocephala*, como se puede observar existe un mayor contenido de mimosina en los rebrotes, y el menor porcentaje se encuentra en las semillas verdes.

Tabla 7. Concentración de mimosina en *Leucaena leucocephala*.

Parte de la planta	Mimosina (%)	Fuente
Harina de hojas	4.6	
Rebrotes	10.8	(Gupta & Atreja 1999)
Vainas verdes	5.1	
Semillas verdes	3.2	(Adenye, 1991)
Semillas maduras	6.2	
Hojas secas	4.5	(Samanta et al., 1994)

Por otro lado, se ha encontrado que la mimosina limita la productividad y afecta adversamente la salud de los animales (Halliday et al., 2013), por lo que existe una búsqueda constante en realizar estudios para su reducción. Se ha demostrado que la mimosina podría causar varios efectos adversos en animales como pérdida de cabello, cataratas, gota, daño epitelial, dermatitis, problemas reproductivos y muerte en rumiantes (D'Mello (1992); Pandey & Dwivedi (2007); Ramli et al., (2017); Machado, 2024). Asimismo, Al-Dehneh et al. (1994) observaron que, debido al consumo de mimosina, cabras alpinas presentaron los siguientes síntomas: anorexia, disminución de crecimiento, disfunción renal hepática, bocio y muerte; mientras que Gupta y Atreja (1998), indicaron que la mimosina también puede inhibir la transformación de la cisteína en metionina.

La mimosina ejerce su acción tóxica bloqueando las vías metabólicas de los aminoácidos aromáticos; quelando metales; antagonizando también la acción de la vitamina B6; inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y proteínas; al ejercer efectos adversos sobre la biosíntesis de colágeno; e interfiriendo en el metabolismo de algunos aminoácidos, principalmente el aminoácido G (Rodrigues-Corréa et al., 2019).

Debido a lo anterior, a pesar de que el guaje es una especie que se propaga fácilmente y que podría ser una fuente promotora de proteína vegetal para humanos, resulta ser una fuente limitada por la presencia de este alcaloide, del cual se sabe que su dosis diaria permitida en humanos es de 32 mg/kg/día (Wardatun et al., 2020). De igual manera, se ha hallado que existen otros factores antinutricionales, como los inhibidores de la tripsina, las lectinas y los taninos presentes en ciertas fuentes proteicas (como harina de soja, guisantes y habas) que aumentan las pérdidas de proteínas endógenas en el íleon terminal por lo que estos compuestos antinutricionales podrían causar una reducción de hidrólisis de proteínas y alterar así la absorción de algunos aminoácidos (Salgado et al. 2002). Aunado a esto, han surgido algunos ejemplos de procesamiento convencional de legumbres para la reducción de antinutrientes como son: el remojo, hervido, cocción a presión, germinación y fermentación, mientras que las técnicas de procesamiento emergentes incluyen microondas, extrusión, calentamiento dieléctrico, irradiación, ultrasonido y la alta presión hidrostática (G. Das et al., 2022). En la Tabla 8 se mencionan diferentes tratamientos que han sido utilizados para eliminar compuestos antinutricionales presentes en las semillas de leguminosas (G. Das et al., 2022).

Tabla 8. Tratamientos para eliminación de antinutrientes aplicados a leguminosas.

Leguminosas	Tratamiento aplicado	Antinutriente	Referencias
Garbanzo negro, garbanzo, frijol común, caupí, haba, frijol molido, lenteja y soja.	Remojo en agua	Ácido fítico	Frías et al. 2000; Egounlety & Aworh, 2003; Shimelis & Rakshit, 2007; Wang et al., 2007; Rakshit et al., 2015.
Garbanzo y frijol común	Autoclave	Saponinas	Alajaji & El-Adawy, 2006; Shimelis & Rakshit, 2007.
Garbanzo negro, garbanzo, frijol común, caupí, haba, lenteja y soja.	Hervido	Taninos	Abdel-Gawad, 1993; Alajaji & El-Adawy, 2006; Shimelis & Rakshit, 2007; Aruna et al. 2019.
Garbanzo, frijol común, caupí y soja	Remojar + hervir	Inhibidores de proteasa, taninos	Liu & Markakis, 1987; Prinyawiwatkul & col, 1996; Frías et al., 2000; Shimelis & Rakshit, 2007.
Frijol común y soja	Remojo más esterilización en autoclave	Lectinas	Sarkar et al., 1997; Shimelis & Rakshit, 2007.
Caupí, frijol molido y soja	Remojar más descascarar más lavar más hervir	Glucósidos cianogénicos	Egounlety & Aworh, 2003.

Debido a la información existente de este compuesto tóxico presente en *Leucaena leucocephala*, varios autores han continuado la búsqueda de métodos para su eliminación proponiendo diferentes líneas de investigación.

Bell (1980) atribuyó la solubilidad de la mimosina en agua a la presencia de sus grupos funcionales polares, específicamente el grupo carboxilo (-COOH) y el grupo hidroxilo (-OH) en el anillo de piridona, los cuales le permiten formar extensos puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Dado que la mimosina y sus derivados polares se encuentran libres dentro de la matriz de la semilla, son fácilmente extraíbles en disolventes polares. En consecuencia, Bell (1980) propuso un método de desintoxicación basado en este principio, el cual consiste en el remojo y descascarillado de las semillas. En este proceso, el remojo prolongado (de 12 a 24 horas) permite la lixiviación de la mimosina hacia el agua, y el posterior descascarillado elimina físicamente parte del compuesto concentrado en las capas externas. Al desechar el agua de remojo se logra una reducción significativa del contenido de mimosina y sus derivados tóxicos.

Lucas et al. (1988) recomiendan la cocción prolongada de los materiales, preferentemente con uno o más recambios del agua de cocción, para favorecer la lixiviación y degradación térmica de la mimosina. Los autores señalan que, si bien es relativamente fácil eliminar estos compuestos

tóxicos aprovechando su alta solubilidad, es crucial controlar el proceso para evitar la pérdida excesiva de nutrientes hidrosolubles, como vitaminas del complejo B y aminoácidos esenciales. Esta contrapartida nutricional hace necesario optimizar y adaptar el método para cada material vegetal en particular, en función de su composición específica y del balance deseado entre detoxificación y retención de valor nutricional.

Varios autores han evaluado el uso de procesos de extracción de la mimosina mediante tratamientos húmedos, siendo más efectivos que los tratamientos con calor seco. Otros autores se han centrado en la disminución del contenido de mimosina a través de procesos biológicos como la germinación, siendo un proceso práctico y eficaz para reducir su concentración en las hojas del guaje (*L. leucocephala*) (Tangendjaja et al., 1984; Sethi & Kulkarni, 1995; Alabi & Alausa, 2006; Mohamed et al., 2014).

Tawata et al., (1986) determinaron un método sencillo de reducción de mimosina en las hojas de *L. leucocephala* con agua de mar del 0 % al 100 % y diversas soluciones ácidas y básicas durante 24 h a 25 °C. La tasa de extracción de mimosina dependía de la concentración del reactivo; el más eficaz fue 0.05 % de acetato de sodio el cual extrajo el 95 % de mimosina sin pérdida de nutrientes importantes. Consiguiendo así un método simple que elimina tanto la mimosina como su derivado (DHP) y es aplicable tanto para pequeños agricultores como para uso comercial. Otro método para la eliminación de mimosina en hojas fue con urea y bicarbonato de sodio (Hossain et al., 1991), siendo capaz de eliminar altos porcentajes de mimosina de hasta 80 % y 88 %, respectivamente.

Wee, KL y Wang, S. (1987) estudiaron los efectos del secado al sol y del remojo a diversas temperaturas y tiempos de inmersión, así como la alteración del tejido en la eliminación de mimosina presente en las hojas de *Leucaena leucocephala*. Ellos encontraron que la tasa de eliminación de mimosina aumentó con el aumento tanto de la temperatura como del tiempo de exposición, pero la maceración de las hojas no aumentó significativamente la tasa de conversión de mimosina. Por lo que el remojo prolongado de las hojas fue más efectivo y prácticamente toda la mimosina se degradó después de 48 horas de inmersión en agua a 30 °C.

Tech et al., (2017) realizaron un estudio de extracción de mimosina a escala de laboratorio analizando su extracción mediante el método HPLC con una bomba de 880-PU y una columna Fine pak Sil C-18 de la empresa Nihonbunko para determinar los contenidos de mimosina y DHP utilizando un sistema disolvente de ácido ortofosfórico al 0.2 % a una longitud de onda de 280

nm, los picos de mimosina y DHP se detectaron en un tiempo de retención de 2.59 min y 7.30 min, respectivamente.

1.2.1. Técnicas para la detección de mimosina.

a) Cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina es un método de adsorción líquido-sólido en la que la fase móvil asciende por la fina capa de fase estacionaria esto por sus propiedades químicas (Li Cai, 2014). La fase estacionaria es una fina capa de material absorbente normalmente gel de sílice u óxido de aluminio, que recubre una superficie de placa inerte, normalmente vidrio, plástico o aluminio. Se deposita una pequeña cantidad de la muestra en un extremo de la placa de cromatografía de capa fina, siendo ésta colocada verticalmente en una cámara cerrada con un disolvente orgánico (fase móvil). La fase móvil se desplaza hacia arriba por la placa por capilaridad y los componentes de la muestra migran distancias variables en función de sus afinidades diferenciales por las fases estacionaria y/o móvil (Figura 5). Cuando el disolvente llega a la parte superior de la placa, ésta se retira de la cámara de desarrollo y se seca. Los componentes separados aparecen como puntos en la placa, y se evalúa el factor de retención (RF) de cada componente.

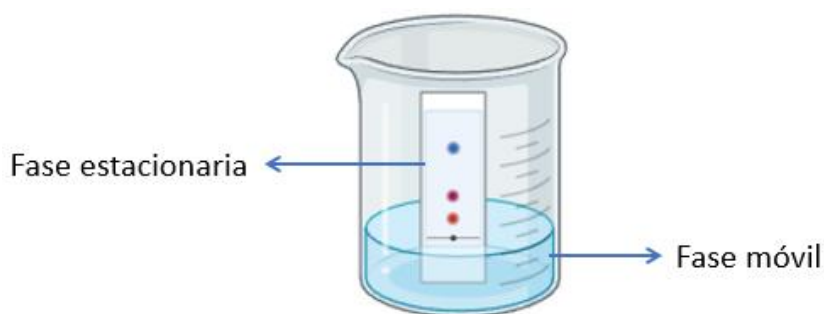


Figura 5. Cromatografía de capa fina. *Nota. Adaptado de *cromatografía*, por BioRender, 2025. Copyright 2025.

En la cromatografía de capa fina, al igual que en las diferentes cromatografías, se busca llegar a un equilibrio dependiendo de la polaridad del analito, la polaridad del disolvente y la polaridad de la fase estacionaria. Por ejemplo, con una muestra que consta de dos compuestos A y B, si las moléculas de A pasan más tiempo en la fase móvil pasarán más rápido por la fase estacionaria y se moverán en un tiempo determinado. Siendo las moléculas B más absorbidas en la fase estacionaria por lo que estarán en la fase móvil menos tiempo y por lo tanto se mueven en la fase estacionaria más lentamente en diferente periodo de tiempo. La consecuencia de este fenómeno es que se logra separar A y B a medida que la fase móvil asciende (Ettre & Kalasz, 2001).

b) Colorimétricas.

La colorimetría es una técnica analítica fundamentada en la Ley de Beer-Lambert, que permite cuantificar la concentración de analitos en solución mediante la medición de la absorbancia de luz en la región visible del espectro electromagnético que abarca de 400 nm a 780 nm como se muestra en la Figura 6 (Shrestha & Shrestha, 2023). Esta metodología, ampliamente validada, ha sido empleada en análisis rutinarios durante más de un siglo (Fernández et al., 2020).

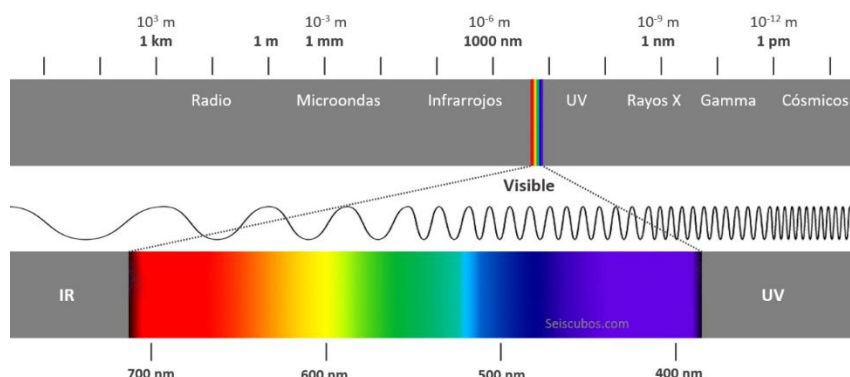


Figura 6. Espectro electromagnético (Dadi y Yasir, 2022).

La colorimetría pertenece a la fotometría de absorción y existen varias técnicas analíticas que siguen el principio de fotometría (Ohno, 2017). El instrumento que se utiliza para esta técnica es el colorímetro que también se conoce como absorciómetro. Para que una sustancia sea colorida o posea esta propiedad debe de formar cromógenos mediante la adición de reactivos que absorban la luz según la intensidad del color a medir. Dicha intensidad es proporcional a la concentración del compuesto coloreado (Shrestha & Shrestha, 2023).

Todos los sistemas ópticos tienen la misma forma básica, que consiste en una fuente de entrada de luz que lleva información, componentes y dispositivos que modifican la luz que se propaga a través del sistema y un método de detección de la luz que produce una salida del sistema (Bunch, 2021). En el caso de metabolitos secundarios de interés existen algunas pruebas colorimétricas para la detección de alcaloides como las que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Pruebas colorimétricas de identificación de metabolitos secundarios.

Grupo de MS	Reactivo	Metodología	Prueba positiva
Taninos		0.37 g de muestra seca en matraz con ferrocianuro de potasio obteniendo condensados y si es azul la concentración de 0.004 M. Se añaden 20 mL de cloruro férrico (0.008 M).	Color verde oscuro sugiere la presencia de taninos hidrolizables.
Alcaloides	Dragendorff	1 mL del extracto + 4 gotas de hidróxido de amonio líquido. Secándolo + 3 gotas de ac. acético + 1 gota de agua bidestilada, concentrando + 3 gotas del reactivo de Dragendorff.	Un cambio de naranja a rojo o rosado sugiere la presencia de alcaloides.
Saponinas	Agua destilada	10 mg de extracto + agua destilada (agitar por al menos dos minutos).	Espuma que permanece por al menos un minuto.
Cumarinas	NaOH y HCl	1 mL de NaOH al 10 % + 5 gotas de solución patrón.	Si hay coloración amarilla agregar 3 gotas de HCl al 10 %. Si la mezcla se vuelve transparente la prueba es positiva.

Fuente: Robles-García et al., 2016.

1.2.2. Técnicas de eliminación de mimosina.

En el presente proyecto se utilizarán los tratamientos de ultrasonido, hervido y horneado con el objetivo de reducir o eliminar la mimosina presente en la semilla del guaje, es por eso por lo que a continuación se fundamentan cada una de las técnicas.

a) Ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una técnica que se basa en el uso de vibraciones mecánicas en frecuencias superiores al intervalo audible para el oído humano (1 – 16 KHz) (Gómez & López, 2009). El fenómeno de cavitación consiste en la generación de altas diferencias de presión en la matriz, que a su vez causan la formación e implosión de burbujas ocasionando así la ruptura celular. Esto a su vez facilita el paso del disolvente a diferentes partes de la matriz

sólida o células, lo que promueve la transferencia de masa. Como resultado, se obtiene un mayor rendimiento en la extracción de los compuestos de interés.

El ultrasonido es una técnica novedosa usada en la industria alimentaria, ya que representa ventaja sobre los procesos convencionales, al disminuir tiempos de proceso y temperatura; mezclado efectivo, aumento de la transferencia de masa y energía, la reducción de los gradientes térmicos y de concentración. Cuenta con una respuesta más rápida al control de procesos de extracción, aumentando así la tasa de producción. Puede participar en la eliminación de microorganismos y enzimas sin destruir los nutrientes de los alimentos por lo que mejora los atributos de calidad, reduce riesgos químicos y físicos (CORBIN et al., 2015).

Esta técnica se considera una tecnología limpia, aplicable en las diferentes fases del procesamiento de alimentos como: secado, homogeneización y extracción. El ultrasonido de baja potencia (alta frecuencia) se utiliza para el seguimiento de la composición y propiedades fisicoquímicas de los componentes del alimento y el de alta potencia (baja frecuencia) induce cambios mecánicos, físicos, químicos y bioquímicos por acción de la cavitación, que soporta muchas operaciones de procesamiento de alimentos. El ultrasonido se ha utilizado durante procesos de homogenización, extracción y secado en alimentos.

Dentro de las aplicaciones de la EUA se encuentra la purificación de compuestos bioactivos, incluidos los alcaloides los cuales son compuestos orgánicos nitrogenados que se encuentran en plantas, hongos y algunos animales, y pueden tener propiedades farmacológicas o tóxicas dependiendo de su estructura y concentración. El ultrasonido de alta potencia resulta ser efectivo para la extracción de alcaloides de matrices vegetales, ya que ayuda a romper las paredes celulares y facilita la liberación de los compuestos deseados. Sin embargo, el ultrasonido por sí solo no garantiza la eliminación completa de alcaloides tóxicos, ya que su eficacia puede depender de factores como la matriz vegetal, el tipo de alcaloide presente y las condiciones de procesamiento, sin embargo, resulta una opción para la eliminación de estos compuestos.

En este método la cantidad de disolvente utilizado es menor comparado con otros métodos de extracción como Soxhlet, sin embargo, una de las desventajas que presenta es la posible formación de radicales libres debido a la cavitación. No obstante, esto último puede causar inestabilidad en los extractos obtenidos, así como también la disminución de algunos compuestos antioxidantes que reaccionan con los radicales libres formados (Ramírez et al., 2021).

El ultrasonido ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos, y es

considerado además ambientalmente amigable. Khalid *et al.* (2025) destacan que técnicas como la extracción asistida por ultrasonido se alinean con prácticas eco-amigables al reducir el tiempo y consumo energético del proceso, consolidándola como una tecnología sustentable.

b) Hervido.

El hervido es uno de los métodos de procesamiento térmico más simples que se utilizan para preparar la mayoría de los alimentos a base de legumbres. Durante el hervido ocurre una transferencia de calor en la cocción entre el medio acuoso y la presencia de partículas sólidas llamada conducción (McGee *et al.*, 1999). La cocción reduce el contenido de antinutrientes de las legumbres, mejorando así la calidad nutricional de los alimentos. Existen investigaciones de legumbres como el frijol, guisantes, lentejas o garbanzos sometidas a un tratamiento de cocción y análisis, los resultados indicaron que la digestibilidad de la proteína *in vitro* aumenta significativamente (Drulyte & Orlie, 2019).

Las legumbres contienen factores antinutricionales los cuales inhiben la absorción de nutrientes, disminuyendo su digestibilidad y biodisponibilidad e imparten sabor desagradable, amargo e inaceptable a los productos alimenticios. Sin embargo, pueden ser inactivados o reducidos por el proceso de cocción (Tas, 2021). Pedrosa *et al.*, (2021) indicaron una reducción del contenido de compuestos antinutricios en legumbres mediante el tratamiento por autoclave logrando disminuir entre un 14 % a un 77 %, sin embargo, resultó ser aún mayor esta disminución mediante el tratamiento por ebullición. Esto se puede deber a que la presión aplicada en la autoclave permitió que el agua entrara en las semillas, lo que aumentó la extracción durante la cocción. Por otro lado, cuando los frijoles terciopelo se hirvieron durante 3 h, el contenido de rafinosa, estaquiosa y verbascosa se redujo entre un 29 y un 47 %. Sin embargo, cuando se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 90 minutos, los granos exhibieron una pérdida del 46 % y 69 % (Vijayakumari *et al.*, 1996). En otra investigación se halló que el calentamiento de las semillas de garbanzo mediante ebullición, esterilización en autoclave y cocción en microondas redujo el contenido de compuestos antinutricios, con la eliminación de la verbascosa (Alajaji & El-Adawy, 2006).

Vagadia *et al.* (2017) realizaron un estudio donde compararon diferentes métodos para eliminación de oligosacáridos. Los oligosacáridos que contienen galactosa, como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, son los principales componentes de las semillas de diferentes leguminosas, estos azúcares son considerados fermentables ya que el sistema digestivo del humano carece de la enzima α -galactosidasa y por tal motivo no pueden ser fragmentados por el cuerpo humano, por lo que estos autores propusieron métodos de eliminación como remojo, cocción, tostado y esterilización por autoclave.

En otra investigación, la cocción a presión de semillas de frijol negro redujo el contenido de taninos, lo que llevó a disminuir la toxicidad de la harina. La ebullición de las habas destruyó completamente el inhibidor presente y se redujo significativamente el contenido de antinutrientes (Cardador-Martínez et al., 2012).

c) Horneado.

El horneado es un proceso de transferencia simultánea de calor y masa. Durante la cocción, el calor se transfiere principalmente por: convección del medio de calentamiento, radiación de las paredes del horno y conducción como resultado del calentamiento por contacto de la superficie caliente en la parte inferior (Dermirkol et al., 2006). Este tratamiento se caracteriza por la baja humedad y las altas temperaturas (Dumas & Mital, 2002). Generalmente el horneado por convección forzada es preferido, al usar hornos con circulación de aire inducida. El calor es transferido al alimento por el aire circundante (Dumas & Mital, 2002), con flujo paralelo al alimento (Banooni et al., 2008). La radiación de calor en el horno implica un método sin contacto por medio de un calentamiento electromagnético, por ejemplo, radiación infrarroja (Dumas & Mital, 2002).

A pesar de usar altas temperaturas, el horneado es un método lento, ya que la transferencia de calor por convección del aire o radiación por las paredes del horno es poco eficiente (McGee et al., 1999). En el horno, el calor pasa al alimento por convección del aire circulante y por conducción a través de la bandeja sobre la que descansa. Si bien en algunos tipos de alimentos, como en algunos pasteles, el calor se transmite en los primeros momentos del horneo, por convección, la mayor parte del intercambio calórico se produce por conducción.

El proceso de horneado implica cambios de temperatura, humedad y volumen, y todos estos aspectos se combinan. En el pasado, la evolución de las variables era monitoreada y ajustada empíricamente. Actualmente se han realizado numerosos estudios experimentales y teóricos sobre la cocción, que implican también la determinación de propiedades de los materiales, y gracias a ellos se han investigado y simulado los principales fenómenos y mecanismos de transporte, como el transporte de agua y la evolución de la temperatura. Además de los principales fenómenos de transporte, otro aspecto importante es la evolución del volumen durante la cocción, lo que supone un cambio importante en la estructura que requiere atención porque afecta a la textura y aspectos finales del producto (Baldino et al., 2023).

1.3. Proteínas vegetales.

Las proteínas vegetales constituyen una fuente de nutrimentos e ingredientes funcionales de interés por su variedad, disponibilidad y costo, explotándose tanto las propiedades funcionales

como los beneficios nutricionales de cada grupo de proteínas. Inclusive, se pueden emplear para el diseño de empaques biodegradables. Las proteínas vegetales se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y en baja proporción de hojas verdes (González-Pérez & Arellano, 2009). Existe una gran variabilidad de niveles de proteína aun en variedades de la misma especie, lo que depende de factores genéticos, climáticos y ecológicos. Las posibilidades de aprovechamiento en la industria de alimentos dependen tanto de su resistencia al procesamiento como de la presencia de compuestos anti nutricionales en la fuente vegetal de interés.

El grupo proteínico preponderante varía de acuerdo con el grupo de plantas del que se trate: en el caso de los cereales dominan las glutelinas, en las leguminosas las globulinas. Los ingredientes vegetales ocupan un lugar importante en la dieta de la población menos favorecida en términos económicos, y por otro lado entre quienes por diferentes razones (filosóficas, religiosas, económicas, visión de salud) optan por regímenes alimentarios libres de productos animales, por lo que su valor agregado puede incrementarse debido a su composición y funcionalidad, rubro en el que han adquirido gran importancia los aislados proteínicos de diferentes fuentes, en especial los de soya.

A pesar de la gran cantidad de plantas utilizables para alimentación, en el mercado hay pocas variedades que se explotan ampliamente. En particular, en las últimas dos décadas se ha visto el crecimiento del mercado de la proteína de soya, que en 2024 alcanzó un área cultivada a nivel mundial de 130 millones de hectáreas, (U.S. Department of Agriculture [USDA], 2024). Paralelamente, la adopción de variedades genéticamente modificadas ha crecido de manera sostenida; se estima que, a nivel mundial, aproximadamente 80 % del área total de soya corresponde a cultivos transgénicos, consolidándolo como el cultivo biotecnológico más extendido a nivel comercial en el mundo (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications [ISAAA], 2020). A pesar de la dominancia de la soya, existen alternativas viables de aislados proteínicos provenientes de otras especies de alto valor proteico, como lo son el chícharo, la canola, los lupinos y el ajonjolí, cuyos contenidos se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido proteico de diferentes leguminosas.

Leguminosas	% Proteína total
Garbanzo	20.0 - 28.0
Haba	20.0 – 30.0
Lenteja	23.0 – 29.0
Frijol	19.0 – 21.0
Chícharo	21.0 – 28.0
Cacahuate	25.0 – 28.0
Soya	32.0 – 42.0
Semilla de guaje	30.0 - 31.7

(Multescu et al. (2024).

La familia *Fabaceae* (o Leguminosae) comprende cerca de 20,000 especies, distribuidas en una amplia variedad de ecosistemas y con una importancia histórica y nutricional fundamental en las dietas a nivel global (Lewis et al., 2005). Dentro de las especies cultivadas para alimentación humana y animal, destacan por su volumen de producción y valor económico el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el chícharo (*Pisum sativum* L.), la lenteja (*Lens culinaris* Medik.), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), el cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), el haba (*Vicia faba* L.) y, de manera prominente, la soya (*Glycine max* (L.) Merr.).

De acuerdo con las estadísticas más recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la superficie mundial cosechada de los principales cultivos alcanzó los 1,500 millones de hectáreas en 2024. En este contexto, los cultivos oleaginosos, categoría que incluye a la soya, y las leguminosas de grano seco (*pulses*) representan una fracción significativa de esta superficie. La producción mundial de soya ha experimentado un crecimiento notable, incrementándose en un 50 % entre 2010 y 2024, lo que, en conjunto con la producción de otras leguminosas, sitúa la producción total combinada en el entorno de los 500 millones de toneladas métricas anuales en la actualidad. Más allá de su valor alimenticio, estos cultivos desempeñan un papel crucial en los sistemas agrícolas y la nutrición global, estimándose que la fijación biológica de nitrógeno por las leguminosas de grano aporta aproximadamente entre 30 y 40 millones de toneladas de nitrógeno anualmente a los sistemas agrícolas, contribuyendo significativamente a la sostenibilidad de estos (Peoples et al., 2021; Akchaya et al., 2025).

1.4. Métodos para la cuantificación de proteína.

Existen diversos métodos para la cuantificación de las proteínas, todos ellos basados en alguna de sus propiedades típicas, como puede ser la absorbancia de los grupos aromáticos a 280 nm, la reactividad del enlace peptídico o el contenido de nitrógeno total (Badui, 2006).

Absorción en UV (280 nm).

La mayoría de las proteínas absorben en el UV a 280 nm, debido básicamente a grupos cromóforos de tirosina y triptófano. Si se considera que la cantidad de estos dos aminoácidos es siempre constante, la absorbancia debe ser proporcional a la concentración de la proteína. La determinación por absorción en UV es un método rápido que requiere muy poca cantidad de proteína, la muestra no se destruye y puede ser usada en otros análisis.

Por otro lado, en caso de que se requiera, se puede hacer una corrección por la presencia de ácidos nucleicos, ya que estos tienen absorción máxima a 260 nm. Si se conoce la relación de absorbancia de la proteína a 280/260 nm es fácil distinguir la interferencia de ácidos nucleicos.

Biuret.

La reacción de Biuret es específica para la medición del enlace peptídico, por lo que sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas, mas no de hidrolizados, a menos que se conozcan los tamaños moleculares y se adapte la proteína estándar de la curva. Se utiliza una solución diluida de sulfato cúprico en tartrato fuertemente alcalino, ésta se adiciona a la solución de proteína, resultando un compuesto de color entre púrpura y violeta que absorbe a 540 nm. Es posible que el color se desarrolle por la formación de un ion coordinado tetracúprico con dos grupos -CO-NH- adyacentes como se muestra en la Figura 7.

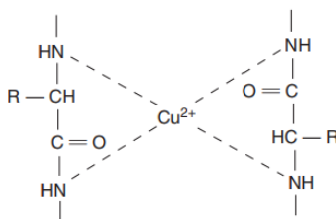


Figura 7. Acomplejamiento del Cu con dos enlaces peptídicos adyacentes.

Algunas ventajas que presenta este método son: la intensidad del color es determinada espectroscópicamente a 540 nm con una curva patrón. Es el método más simple para medir proteína total ya que presenta muy pocas interferencias de otros compuestos en el desarrollo del

color. Sin embargo, entre las desventajas de la técnica de biuret son: su baja sensibilidad, pues se requiere de 20 a 40 mg de proteína, existen varios pigmentos que absorben a 540 nm de longitud de onda, en presencia de NH_4^+ este interfiere con la reacción, el desarrollo de color es diferente para cada proteína y los lípidos e hidratos de carbono interfieren al formar complejos con el ión coordinado.

Folin-fenol.

El método diseñado por Lowry, Rosebrough, Farr y Randall llamado Folin-fenol, es un método basado en la reacción de biuret pero mejorada por la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyos constituyentes activos son los ácidos mezclados. Esta mezcla es reducida por la proteína, a través del Cu^+ generado y la pérdida de uno o dos oxígenos de los tungstatos y molibdatos que generan un color azul con absorción máxima de 720- 750 nm. La respuesta del color azul de diferentes proteínas en este ensayo es más variable que en la reacción de biuret, ya que tirosina (Tyr), triptófano (Trp), histidina (His) y asparagina (Asn) son los residuos que participan en la reacción y prolina (Pro), como en el método de biuret, por su estructura cíclica evita que la cadena peptídica adyacente reaccione; este método ha sido modificado muchas veces. En general, la absorbancia se mide a 750 nm (alta sensibilidad) para proteínas concentradas y se requiere de una curva patrón que es recomendable construir con la misma proteína que se cuantifica. La sensibilidad del método va de 0.2 a 300 $\mu\text{g/mL}$. Su principal desventaja es que varias sustancias no proteínicas (sacarosa, lípidos, amortiguadores de pH, monosacáridos y hexosaminas, sulfato de amonio, sulfhidrilos y fosfatos) interfieren produciendo un color azul o inhibiendo el desarrollo de color por la proteína.

Método para la identificación proteica: Electroforesis.

La mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia, pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. En el caso de las proteínas se realiza pretratamiento con detergentes, como el dodecilsulfato de sodio (SDS), que les confiere carga negativa; con ello se homogenizan las proteínas de la muestra y todas migrarán hacia el polo positivo, y sólo se separarán por tamaño. El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por el campo eléctrico.

La velocidad de migración está dada en función de la carga neta, y está influenciada por la forma de la proteína, sus dimensiones moleculares, la intensidad de la corriente aplicada y el material

utilizado como soporte, que puede ser gel poliacrilamida o papel. Éste es el método analítico más ampliamente usado para la separación de proteínas y es muy útil para el análisis de proteomas. Pueden realizarse electroforesis en condiciones nativas en las que las proteínas migran conservando su diversidad y propiedades físicas, especialmente su punto isoelectrico y peso molecular.

Esta técnica puede ser complementaria a otros métodos analíticos utilizados para determinar la cantidad y composición de proteínas en alimentos. Generalmente, una vez terminada la electroforesis se continúa con una digestión proteolítica y la separación de los fragmentos por electro elución o para su análisis por espectroscopia de masas (MS).

La determinación de proteínas en alimentos es fundamental para garantizar la calidad, seguridad y valor nutricional de los productos alimenticios, así como para cumplir con las regulaciones alimentarias y proporcionar información precisa a los consumidores. A continuación, se mencionan a detalle dos de los métodos de determinación de proteína que se utilizarán en este trabajo de investigación.

1.4.1. Método Kjeldahl.

El método Kjeldahl es un método químico utilizado para determinar la cantidad de proteínas en alimentos. El método consiste en la digestión de la muestra con H_2SO_4 y calentarlo a altas temperaturas para descomponer las proteínas en sus componentes básicos, principalmente nitrógeno. Luego, el nitrógeno se convierte en amoníaco mediante una reacción con hidróxido de sodio y se destila para ser recogido en una solución ácida. Finalmente, se titula la solución ácida con una solución estándar de ácido clorhídrico para determinar la cantidad de nitrógeno presente en la muestra, lo que se utiliza como indicador de la cantidad de proteínas presentes (Badui, 2013).

Debido a lo anterior, es el método para la determinación de nitrógeno (N) total más utilizado, e incluso se toma como referencia cuando se usan otras técnicas. El método no hace distinción entre el N que proviene de proteínas (de grupos amino y amida) y el no proteínico (urea, aminoácidos), lo que da lugar a errores en el cálculo. Los compuestos nitrogenados no proteínicos que causan una sobreestimación de la técnica son: glutatión, carnitina, carnosina, dopamina, urea, ornitina, colina y ácido aminobutírico. Por lo que deben aplicarse factores de conversión de N a proteína, que son específicos para los distintos tipos de proteínas (Badui, 2013).

El factor de conversión se obtiene al dividir 100 entre el porcentaje de N particular de la proteína en cuestión. El factor que se aplica sin discriminación es 6.25 resultante de una generalización

del contenido de N de las proteínas de 16 %, por lo que su factor de conversión será de $100/16 = 6.25$. Sin embargo, en términos estrictos debe calcularse el factor para cada proteína. El nitrógeno no proteínico puede ser analizado después de precipitar la proteína con ácido tricloroacético, con la desventaja de que pueden quedar en solución péptidos solubles, aproximadamente de 12 a 16 aminoácidos, que no se detectarían.

En resumen, las desventajas del método son las siguientes: puede haber pérdidas de nitrógeno debido a la temperatura de digestión y al tipo de catalizador utilizado. Debe considerarse el N no-proteínico medido junto con el proteínico. El proceso es largo y se utilizan reactivos y condiciones un tanto peligrosas. Por otra parte, es un método oficial descrito en múltiples normativas: AOAC, USEPA, ISO, Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias. La convención general, sobreentendida, es que la totalidad del nitrógeno de la muestra está en forma proteica, aun cuando la realidad es que, según la naturaleza del producto, una fracción considerable del nitrógeno procede de otros compuestos nitrogenados (bases púricas y pirimidínicas, creatina y creatinina, urea, amoníaco, alcaloides etc.), por ello se denomina “proteína bruta” o “proteína total” a la obtenida por este método (Pearson, 1993).

1.4.2. Método Bradford.

En 1976, Marion Bradford introdujo un método para cuantificar la concentración de proteínas presentes en una muestra, el cual consiste en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos (arginina, histidina, lisina y grupos amino terminales) de las proteínas y el colorante azul Coomassie lo que provoca un cambio en la absorbancia de la luz a una longitud de onda específica del Brilliant Blue G-250 de 465 nm a 595 nm cuando se une a una proteína (Hammond & Kruger, 1988). Al comparar la absorbancia de la muestra con una curva estándar de concentraciones conocidas, es posible determinar la cantidad de proteína presente en la muestra. La absorbancia se lee a 595 nm y la intensidad de la absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.

El Coomassie Brilliant Blue G-250 existe en dos formas de color diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul al unirse el tinte a la proteína (IS). El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo que conduce a una gran sensibilidad en la medición de la proteína. La sensibilidad del método es de 1 a 10 µg de proteína o 5 µg/mL. La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido (aproximadamente 2 minutos), y el complejo proteína-colorante permanece disperso en solución durante un tiempo relativamente largo (aproximadamente 1 hora).

Este método permite medir las proteínas solubles de una manera simple, precisa, rápida y económica, pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre estas se encuentran los detergentes y las soluciones básicas. Sin embargo, su gran ventaja es el corto tiempo de análisis ya que facilita la remediación de muestras con concentraciones bajas o altas de proteínas en cuestión de minutos (Bonjoch & Tamayo, 2001).

1.5. Bioaccesibilidad de componentes de los alimentos.

De acuerdo con Quirós-Sauceda et al., (2021) la bioaccesibilidad se define como la cantidad de un componente del alimento que está presente en el intestino humano, como consecuencia de su liberación de la matriz del alimento y que puede ser capaz de atravesar la barrera intestinal para ser absorbido. En este contexto, la determinación de bioaccesibilidad juega un papel muy importante debido a que permite obtener datos sobre la eficiencia nutricional de distintos alimentos (García Pinedo, 2022). Los alimentos ingresan al sistema digestivo a través de la boca, donde se descomponen en pequeños pedazos y se mezclan con la saliva para acelerar su paso por el sistema digestivo (Ketel et al, 2019). La saliva es un medio acuoso viscoso complejo producido por las glándulas salivales, que contiene 99.5 % de agua, 0.3 % de proteínas/enzimas y varios electrolitos como sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato y bicarbonato. Las enzimas son capaces de modificar parcialmente las estructuras y composiciones de los alimentos (Li et al, 2020). La saliva secretada por las glándulas salivales humedece y comienza a disolver el alimento con la acción de la enzima α -amilasa (enzima que cataliza la hidrólisis del almidón en azúcares) (Bohn et al, 2018). Durante la deglución, el bolo es impulsado desde la boca a través de la faringe hacia el esófago (Sensoy, 2021). El proceso de digestión en el estómago involucra procesos físicos y químicos. Los parámetros físicos como las contracciones afectan el tamaño de las partículas y los parámetros químicos como la secreción de ácido clorhídrico y las enzimas digestivas (pepsina y lipasa) tienen un impacto en el ablandamiento de los alimentos y la hidrólisis de los nutrientes (Amigo & Hernández-Ledesma, 2020; Sensoy, 2021). El ambiente ácido (por la secreción de HCl) disminuye a 3 el pH activando la pepsina secretada y provocando la desnaturalización de los alimentos (Li et al, 2020). De esta forma, se logra que el bolo alimenticio se descomponga en quimo y sea transportado hacia el intestino delgado. El quimo entrante estimula al páncreas para que libere una solución concentrada de bicarbonato (NaHCO_3) que neutraliza el jugo gástrico, para la actividad de las enzimas proteasas (tripsina y quimotripsina), lipasa y amilasa pancreáticas (Amigo & Hernández-Ledesma, 2020; Sensoy, 2021), y la vesícula biliar (ácidos biliares) (Whitney & Rolfes, 2011; Wickham et al., 2009). Los residuos no digeridos ni absorbidos se desplazan hacia el colon para su fermentación y excreción (Li et al., 2020). Para

evaluar la bioaccesibilidad existen modelos de digestión *in vivo* e *in vitro* que tratan de imitar las condiciones fisiológicas de la digestión, como la presencia de enzimas digestivas, concentraciones de sales, pH, tiempos de digestión y movimientos involucrados en este proceso (Li et al., 2020; Ferreira-Santos et al., 2021).

1.5.1 Modelos de bioaccesibilidad *in vivo*.

Los modelos *in vivo* se caracterizan por el uso de animales, sin embargo, generalmente implican el sacrificio de estos o abordajes quirúrgicos en los que se colocan cánulas en los órganos digestivos para acceder al contenido del tracto gastrointestinal. Las ventajas que presentan este tipo de modelos es que permiten reproducir características de la digestión *in vivo* como son los movimientos peristálticos, control hormonal y nervioso, actividad de las células mucosas, presencia o ausencia de patologías, genética y sexo (Lucas-González, 2017). No obstante, los ensayos pueden ser difícil de emprender, inadecuados, requieren de mucho tiempo, costosos o presentan restricciones éticas (Brodkorb et al., 2019). Por las desventajas que presentan se ha recurrido más ampliamente a modelos *in vitro*.

1.5.2 Modelos de bioaccesibilidad *in vitro*.

Los modelos de digestión *in vitro* simulan condiciones fisiológicas que se llevan a cabo en el organismo durante la digestión, son ampliamente utilizados, rápidos, relativamente baratos en comparación a los modelos *in vivo* y reproducibles (Lucas-González, 2017); estos modelos se clasifican en dinámicos y estáticos. Los modelos dinámicos se caracterizan por ser modelos muy sofisticados ya que permiten simular los aspectos de la digestión, como el transporte de la comida digerida, secreciones continuas de líquidos digestivos, concentraciones variables de enzimas y cambios de pH a lo largo del tiempo que ocurren en condiciones *in vivo*. Mientras que los modelos de digestión estática simplifican el proceso fisiológico complejo y dinámico que participa en la desintegración de alimentos de una manera sencilla (Li et al., 2020). En estos modelos se reproduce la fase oral, gástrica e intestinal mediante fluidos que contienen la concentración salina y enzimática requerida para imitar las condiciones *in vivo*, asimismo se simulan las temperaturas óptimas de la digestión, las condiciones de pH y la presencia de algunos cofactores en caso necesario.

El consorcio internacional COST Red INFOGEST estableció un protocolo de digestión *in vitro* estático estandarizado (Figura 8), basado en el estado actual del conocimiento sobre la digestión (Minekus et al., 2014) este método estandarizado consiste en un proceso de tres etapas: (1) una fase oral simulada enfocada en la actividad de la α -amilasa salival; (2) una fase gástrica simulada

centrada en la actividad de la pepsina; y (3) un tratamiento pancreático simulado basado en pancreatina y bilis. Factores adicionales como el movimiento simulado durante la digestión, la temperatura, el tamaño de las partículas de los alimentos y el ambiente anaeróbico oscuro son aspectos críticos que deben considerarse cuidadosamente en la evaluación de la digestión de los compuestos fenólicos (Rocchetti et al., 2022).

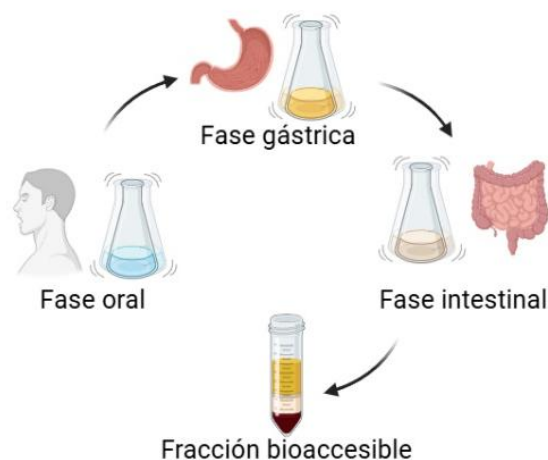


Figura 8. Fases de la digestión *in vitro* en modelos estáticos. Referencia: adaptado de “INFOGEST simulación estática *in vitro* de la digestión gastrointestinal de alimentos” por Brodkorb et al., (2019). Fuente: Bio Render.com

Capítulo 2. Marco introductorio.

2.1 Justificación.

El guaje (*L. leucocephala*), es un producto natural que ha sido subutilizado ya que en su mayoría se emplea como alimento para ganado, a pesar de que la literatura muestra que esta semilla exhibe propiedades antidiabéticas, antiparasitarias y antioxidantes. El guaje contiene nutrientes como: minerales (2.98 %), ácidos grasos (8.05 %), proteínas (31.70 %) y carbohidratos (61.31 %), además de un compuesto anti nutricio llamado mimosina que resulta ser una limitante para su consumo ya que está presente en la semilla de un 3 a un 5 % el cual restringe su uso seguro en la dieta humana. Por lo que en este trabajo se proponen tres métodos de eliminación de mimosina: ultrasonido, hervido y horneado, así como una evaluación de la bioaccesibilidad de la proteína de semilla de guaje, debido a que la bioaccesibilidad no es un aspecto aislado de la seguridad, sino parte fundamental de la misma: una proteína solo es segura y útil si, además de no contener niveles tóxicos de mimosina, puede ser liberada de la matriz alimentaria y estar disponible para su absorción sin efectos adversos.

Debido a lo anterior, el presente proyecto se justifica ya que:

- La desnutrición proteica sigue siendo un problema prioritario en zonas rurales de la Mixteca. El guaje, al ser un recurso renovable disponible casi todo el año, representa una alternativa potencial para complementar la ingesta de proteína vegetal en poblaciones vulnerables, siempre que se garantice su inocuidad
- Se identifica cuál de los tres métodos propuestos: ultrasonido, hervido y horneado es más eficiente para reducir la mimosina presente en la semilla de guaje.
- Al evaluar la bioaccesibilidad de la proteína después del tratamiento, se determina si el nutriente puede realmente ser aprovechado por el organismo. De este modo, se integra la seguridad (ausencia de mimosina) con la funcionalidad nutricional (proteína bioaccesible).
- Se aportan nuevos conocimientos sobre la semilla de guaje de la región mixteca elevando su caracterización a un nivel que permita en el futuro su uso como ingrediente seguro en la industria alimentaria

Por lo anterior, este trabajo no solo aborda un problema técnico (reducción de mimosina), sino que responde a una necesidad concreta de aprovechar un recurso local para combatir la desnutrición, sin desligar la bioaccesibilidad de la seguridad del alimento.

2.2. Originalidad.

La originalidad de este trabajo reside en cuatro aportes no reportados previamente en la literatura, al menos para semillas de guaje (*Leucaena leucocephala*) provenientes de la región mixteca el primero es el análisis cuantitativo de mimosina y la comparación de tres métodos de eliminación (hervido, horneado y ultrasonido), el segundo la evaluación de la bioaccesibilidad proteica del material tratado y por último la caracterización de las proteínas presentes. Hasta donde se ha documentado, ningún estudio previo ha integrado estos enfoques con el fin de generar una harina segura para incorporación en alimentos.

2.3. Alcances y limitaciones.

La tesis se enfoca en la recolección de la semilla de guaje (*Leucaena leucocephala*) de la región Mixteca, su análisis de contenido y eliminación de mimosina, así como la caracterización proteica y la evaluación de bioaccesibilidad del mejor tratamiento de eliminación de mimosina presente en la semilla de guaje.

Las principales limitaciones fueron que, al emplear semillas de una sola procedencia geográfica, los hallazgos no pueden generalizarse a otras variedades o regiones, dado que el contenido de mimosina y proteína puede variar por factores edafoclimáticos y genotípicos. En segundo lugar, la bioaccesibilidad de la proteína se determinó mediante un modelo de digestión *in vitro*, el cual, aunque estandarizado y ampliamente aceptado, no reproduce la complejidad de la digestión *in vivo*, por lo que los valores obtenidos son aproximaciones.

2.4. Objetivos.

2.4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de los tratamientos ultrasonido, hervido y horneado sobre el contenido de mimosina en la semilla del guaje (*L. leucocephala*), así como evaluar la bioaccesibilidad de la proteína de la semilla tratada.

2.4.2. Objetivos específicos.

- 1) Obtener harina de semilla de guaje de la región mixteca mediante su acondicionamiento y secado para su posterior caracterización (humedad, grasas, proteína y cantidad de mimosina).
- 2) Evaluar los métodos de ultrasonido, hervido y horneado mediante la exposición de la semilla de guaje a diferentes tiempos de tratamiento, para encontrar el método que elimine mayor cantidad de mimosina.

- 3) Determinar la cantidad de mimosina presente en la semilla de guaje (*L. leucocephala*) fresca, en polvo y tratada, mediante su cuantificación por el método colorimétrico.
- 4) Determinar la concentración de proteína en la semilla de guaje (*L. leucocephala*) tratada mediante los métodos Kjeldahl y Bradford.
- 5) Evaluar la bioaccesibilidad de la proteína, de la semilla tratada con menor contenido de mimosina, mediante pruebas in vitro.

Capítulo 3. Metodología.

En la Figura 9, se presenta el diagrama de flujo general de la metodología que se realizó en este trabajo de investigación.

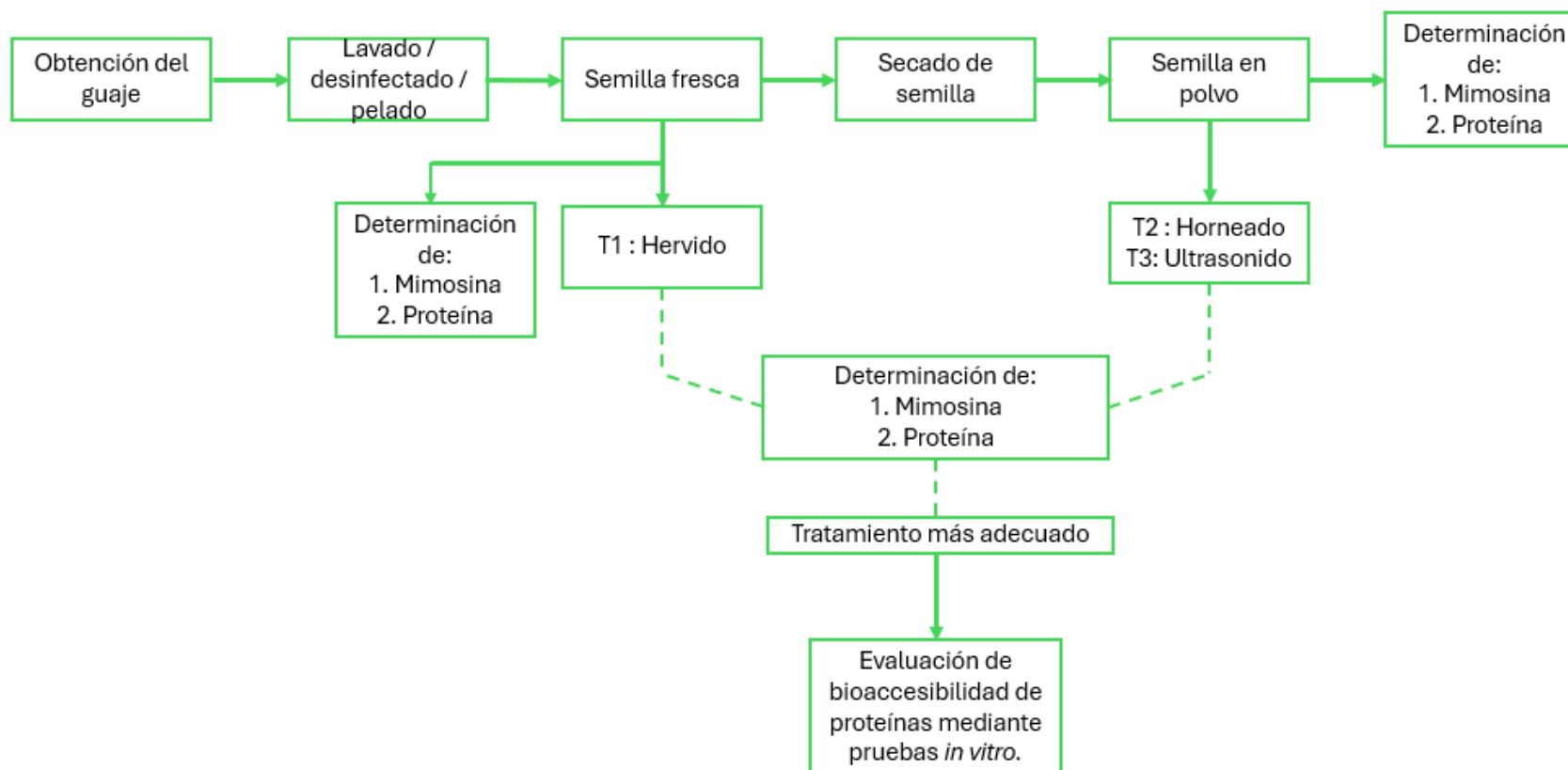


Figura 9. Diagrama de flujo general de la metodología.

3.1. Reactivos y equipos utilizados.

L-mimosina (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (J.T. Baker), ácido clorhídrico 0.1 N (MEYER), hidróxido de sodio (J.T. Baker), ácido acético (J.T. Baker), albumina bovina (Bio-rad), SDS (Bio-rad), marcador de pesos moleculares (BL Ultra Prestained Protein Ladder), reactivo de Bradford (Bio-rad), sulfato cúprico pentahidratado (MEYER), sulfato de potasio anhidrido (MEYER), carbonato de sodio anhidrido (MEYER), fosfato monobásico de sodio (SIGMA-ALDRICH), fosfato dibásico de sodio heptahidratado (SIGMA-ALDRICH), fenolftaleína (HYCEL), ácido sulfúrico (MEYER), carbón vegetal activado (MEYER), cloruro férrico (MEYER), hidróxido de sodio (MEYER), éter de petróleo (CTR scientif), metanol (J. T. Baker), azul brillante de coomasie (Bio-rad), tris (Bio-rad), glicina (Bio-rad), SDS (Bio-rad), marcador de pesos moleculares (BL Ultra Prestained Protein Ladder), β -mercaptoetanol (Bio-rad), cloruro de calcio (Reactivos química), pancreatina 800 U/mL (CREON 300 mg), extracto de hiel de toro (Productos naturales), pepsina porcina de 25 000 U/mL (Sigma-Aldrich), α -amilasa salival de 1500 U/mL (Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio hexahidratado (Reasol), cloruro de potasio (Reactivos química), ácido bórico (Reactivos química).

Balanza analítica (Ohaus), espectrofotómetro (Hinotec UV/VIS-UV 765), centrífuga (Eppendorf), vortex (IKA MS 3 basic), potenciómetro (Oakton), molino (Krupps), horno de convección (Felisa), parrilla eléctrica (Thermo scientific), micropipetas (Eppendorf), horno eléctrico (Hamilton Beach), campana de flujo laminar (Lab Tech), colorímetro (Konica Minolta), micro destilador Kjeldahl (DMK – 650), digestor micro-Kjeldahl (Industrias Figursa), cámara de electroforesis horizontal (Bio-rad), baño con agitación y calentamiento (Lab companion Bs-31), sonicador (BRANSON 3800).

3.2. Obtención de la materia prima.

Se adquirieron 20 kilos de la vaina de guaje en el mercado local Ignacio Zaragoza ubicado en la Hca. Ciudad de Huajuapán de León. Posteriormente, se transportaron al Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos perteneciente a la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Las vainas fueron lavadas y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1 M (Rao, 2011), luego se colocaron en papel absorbente para retirar el exceso de agua. Posteriormente las semillas y la cáscara se separaron manualmente.

Se utilizó una parte de la semilla fresca para la determinación de mimosina y para la determinación de proteína mediante los métodos de Bradford y Kjeldahl. Mientras que la otra parte de semilla fresca se secó a una temperatura de 50 °C durante 12 h en un horno de

convección. Posteriormente se molió y se pasó por un tamiz No. 40, obteniendo así una harina que se almacenó en bolsas de polietileno (PE) a temperatura ambiente.

3.3. Análisis bromatológicos.

3.3.1. Determinación de humedad (Método AOAC, 925.09).

La determinación de humedad se realizó secando 5 g de muestra en una estufa a 50 ± 1 °C en cápsulas de porcelana previamente taradas, hasta peso constante. Al finalizar el proceso de secado las cápsulas se transfirieron a un desecador para atemperar. El contenido de humedad se calculó de acuerdo con la ecuación (1).

$$\% \text{ de Humedad} = \left(\frac{P_2 - P_1}{P_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

P_0 = Peso de la muestra (g).

P_1 = Peso de la cápsula más muestra seca (g).

P_2 = Peso de la cápsula más muestra húmeda (g).

3.3.2. Determinación de lípidos por el método de Soxhlet (Método AOAC, 920.39).

La extracción de lípidos se realizó colocando 2 g de harina de semilla de guaje en un cartucho de extracción, el cual se introdujo en el extractor Soxhlet, después este se conectó con un matraz de destilación previamente tarado que contenía 150 mL de éter de petróleo, la extracción se realizó durante 3 horas bajo reflujo constante. Luego, el matraz de destilación se introdujo al rotavapor hasta una presión de vacío de 540 mbar extrayendo la máxima cantidad de éter de petróleo presente en la muestra y posteriormente se colocó el matraz de destilación en la estufa durante 30 minutos a 60 °C. Para posteriormente pesar el matraz de destilación y conocer así el porcentaje de grasa presente en la harina de semilla de guaje obtenido a partir de la ecuación (2):

$$\% \text{ de Grasa extraíble} = \left(\frac{W_3 - W_2}{W_1} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

W_1 = Peso de la muestra (g) antes de la desecación.

W_2 = Peso (g) del matraz sin grasa.

W_3 = Peso (g) del matraz con grasa.

Finalmente, se colocó el cartucho con la harina de guaje dentro de un vaso de precipitado bajo la campana de extracción para evaporar los restos del disolvente y así almacenarla en un frasco de vidrio en la cámara climática.

3.3.3. Evaluación del color.

De acuerdo con la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) se determinaron los parámetros a^* , b^* , c^* , L^* y h mediante un colorímetro CR-5 (Konica Minolta®). Para realizar la medición de los parámetros antes mencionados se homogeneizó el tamaño de partícula de las muestras las cuáles fueron: harina de semilla de guaje, semilla fresca de guaje, así como las harinas de semilla de guaje obtenidas de los tres métodos de remoción propuestos en este trabajo de investigación. Después se colocaron aproximadamente 2 g de cada muestra en la celda de cuarzo para realizar la medición en el colorímetro.

3.3.4. Determinación de proteína por el método de Bradford.

La determinación de la proteína por el método de Bradford en las muestras de la semilla fresca, en polvo y en las muestras generadas de las diferentes condiciones de cada tratamiento se realizó en tres etapas:

Etapas 1. Acondicionamiento de las muestras.

Para incrementar la solubilidad de las muestras en polvo de semilla de guaje se realizó la preparación de un buffer de fosfatos de acuerdo con Rosa et al. (2020), con algunas modificaciones. Se preparó una solución stock de sodio fosfato dibásico al 0.5 M, disolviendo 7.1 g de sodio fosfato dibásico en un volumen final de 100 mL de H_2O .

Se continuó preparando un stock de sodio fosfato monobásico al 0.5 M, disolviendo 6 g de sodio fosfato monobásico anhidro en un volumen final de 100 mL de H_2O . Posteriormente se preparó una solución de sodio fosfato dibásico al 0.1 M, agregando 80 mL de stock de sodio fosfato dibásico al 0.5 M en un vaso de precipitado y ajustando a un volumen final de 400 mL de H_2O . Luego se preparó otra solución al 0.1 M de sodio fosfato monobásico, esto se logró agregando 30 mL de stock de sodio fosfato dibásico al 0.5 M en un vaso de precipitado y ajustando a un volumen final de 150 mL de H_2O . Por último, se llevó la solución de sodio fosfato monobásico al 0.1 M a un pH de 7.0 añadiendo solución de sodio fosfato monobásico al 0.1 M tanto como se necesitó.

A cada gramo de muestra en polvo de la semilla de guaje y de los dos diferentes tratamientos de horneado y ultrasonido se agregaron 20 mL de buffer de fosfato frío en agitación constante a 280 rpm dentro de un baño de hielo durante 1 hora, transcurrido ese tiempo se procedió a vaciar cada muestra en tubos Falcón para centrifugarse a 750 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante se le determinó el contenido de proteína con ayuda del reactivo Bradford.

Etapas 2. Curva de calibración de albúmina bovina.

Se realizó la curva de calibración de albúmina bovina en un intervalo de 0 a 1000 μL . A partir de una solución de albumina de 1 mg/mL, se procedió a realizar la curva de calibración de acuerdo con lo indicado en la Tabla 11.

Tabla 11. Preparación de la curva patrón con albúmina bovina.

Concentración de la albumina ($\mu\text{g/mL}$)	0	100	200	400	500	600	800	1000
Solución de albumina (μL)	0	10	20	40	50	60	80	100
Agua (μL)	100	90	80	60	50	40	20	0

Después se agregó 1 mL del reactivo de Bradford a cada celda, se agitaron e incubaron durante 5 minutos (Figura 10). Posteriormente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

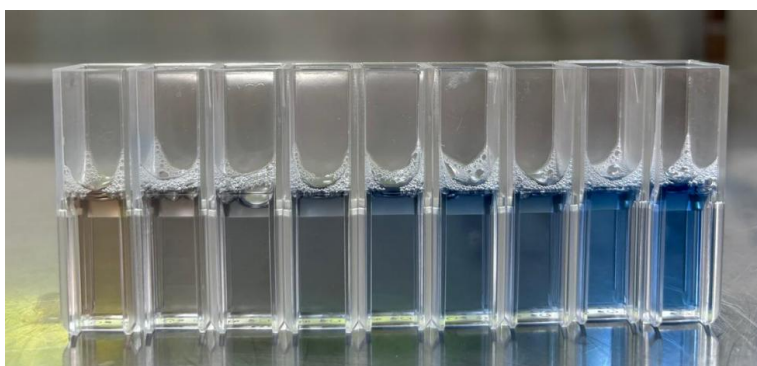


Figura 10. Preparación de las disoluciones para la curva de calibración con albúmina bovina.

Para la elaboración de la curva de calibración se graficó la concentración de ABS contra la absorbancia obtenida (Figura 11).

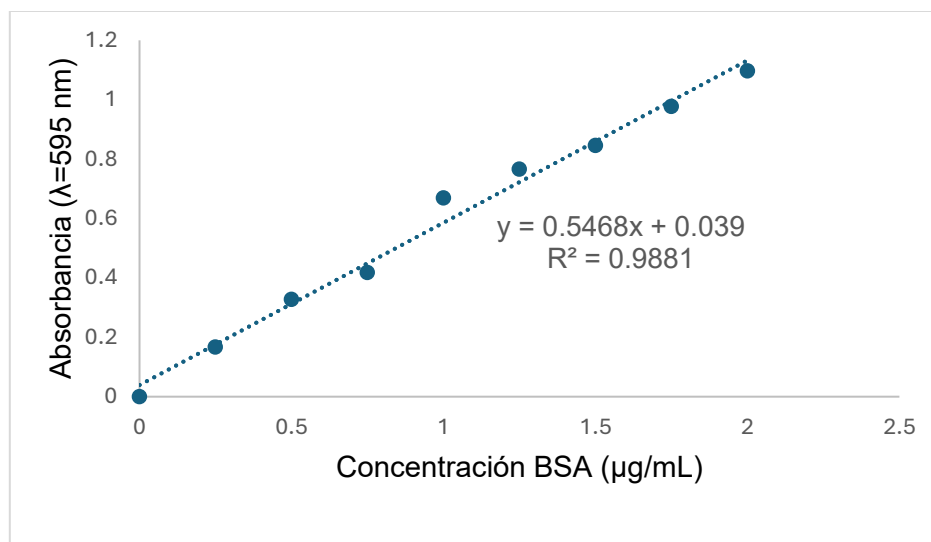


Figura 11. Curva estándar para el ensayo de proteínas de Bradford.

Etapas 3. Determinación de proteína en las muestras.

La determinación de la concentración de proteína de la semilla de guaje, así como de las muestras de los diferentes tratamientos se realizó tomando 25 μL de las muestras y 75 μL de agua destilada las cuales se mezclaron con 1 mL del reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Finalmente, la concentración se determinó sustituyendo la absorbancia obtenida en la ecuación 3, resultante de la curva de calibración.

$$y = 0.546 x + 0.039 \quad (3)$$

3.3.5. Determinación de proteína por el método de micro-Kjeldahl.

El contenido de proteína presente en la semilla de guaje fresca y en polvo se determinó siguiendo el método micro-Kjeldahl de la AOAC, 1997 (método 954.01). El método consiste en tres etapas: la digestión de la muestra, la destilación y la titulación. Cada determinación se realizó por triplicado para la evaluación de los tres diferentes tratamientos y las tres diferentes condiciones de cada tratamiento.

Para la digestión de la muestra se utilizaron 0.15 g de harina de guaje. Acompañado de 0.04 g de sulfato de cobre pentahidratado como catalizador, 1.3 g de sulfato de potasio y 2.5 mL de ácido sulfúrico. Esta mezcla se llevó a ebullición hasta que la solución cambió a color azul turquesa. Posteriormente, se enfrió ($< 25^{\circ} \text{C}$) y se agregaron 15 mL de H_2O .

La destilación se llevó a cabo en la cámara de ebullición en donde se añadieron 10 mL de NaOH (50 %). Luego, bajo la salida del destilado se colocó un matraz Erlenmeyer con 10 mL de ácido bórico (4 %) y 2 gotas del indicador Weeslow. Enseguida, se calentó hasta que se destiló todo el NH₃. Pasando aproximadamente de 4 minutos a 5 minutos se recolectaron 40 mL del destilado. Finalmente, para la titulación del destilado obtenido se utilizó una solución 0.1 N de ácido clorhídrico. El porcentaje de proteína se determinó mediante la ecuación 4:

$$\% P = \frac{N \times V \times Ev}{G} \times 100 \times F \quad (4)$$

Donde:

% P = porcentaje de proteína.

V = mL de HCl gastados en la titulación.

N = normalidad de la solución de HCl (0.1 N).

G = gramos de la muestra.

Ev = equivalente volumétrico del nitrógeno 0.014.

F = factor de proteína (en este caso se utiliza el factor de 6.25).

3.4. Métodos propuestos para eliminación de mimosina.

En esta sección se describen los tres diferentes métodos propuestos para la reducción de la mimosina presente en la harina de semilla de guaje (*L. leucocephala*) los cuales se detallan a continuación:

3.4.1. Horneado.

La harina de semilla de guaje (*L. leucocephala*) se sometió a tres diferentes tiempos de horneado (5, 8 y 10 minutos), esta etapa se realizó en un horno de cocina con control de temperatura (Hamilton beach 31330D) programado a 200 °F (93.33 °C), posteriormente se dejó enfriar y se determinó el contenido de mimosina presente en la harina de guaje (Milde et al., 2009).

3.4.2. Hervido.

Las semillas de guaje (*L. leucocephala*) en fresco se sometieron a un tratamiento de inmersión en agua potable y se calentaron hasta ebullición durante tres diferentes tiempos: 10 minutos, 20 minutos y 35 minutos, utilizando una relación 1:6 (p/v), con la finalidad de eliminar la mimosina presente en la semilla de guaje (Ferreira et al., 2008). Terminada esta etapa las semillas se escurrieron y se colocaron en charolas con papel absorbente para después ponerlas en una estufa de secado a 80 °C durante 4 horas.

Posterior a la deshidratación, las semillas se molieron en un molino KRUPS F203 durante 15 segundos a velocidad constante. Enseguida, se procedió a tamizar la muestra con un tamiz MONTINOX No. 40 para obtener una harina con tamaño de partícula homogéneo. Una vez obtenida la harina, se le determinó su contenido de mimosina y proteína como se describe en las secciones 4.4, 4.5 y 4.6, respectivamente.

3.4.3. Ultrasonido.

Se evaluó el método de ultrasonido para la eliminación de la mimosina presente en la semilla de guaje (*L. leucocephala*) utilizando un sonicador de tipo sonda (BRANSON 3800). Se colocaron 50 gramos de semilla seca de guaje (*L. leucocephala*) en polvo con 625 mL de agua en un vaso de precipitado tapado con papel PARAFILM a temperatura ambiente (25 °C) y se mantuvieron las muestras a una frecuencia de 40 KHz durante tres diferentes tiempos: 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos esto de acuerdo con la metodología propuesta por Yadav et al. (2021), con algunas modificaciones. Posteriormente cada muestra se colocó en tubos Falcón de 50 mL para centrifugarse a 700 rpm durante 20 minutos, con la finalidad de lograr una mejor separación. En seguida, el sobrenadante se separó para obtener la muestra, misma que se colocó en capsulas de porcelana a 50 °C durante 18 horas. La muestra seca se molió y se tamizó en una malla No. 40, finalmente las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio dentro del desecador para su posterior determinación de proteína y mimosina.

En cada tratamiento propuesto para la eliminación de mimosina (hervido, horneado y ultrasonido) se determinó la cantidad de proteína presente por los métodos de Bradford y micro-Kjeldahl explicados en las secciones 3.4 y 3.5 respectivamente, realizando cada análisis por triplicado. Una vez elegido el mejor tratamiento para la eliminación de mimosina, se procedió a evaluar la bioaccesibilidad de la proteína contenida en la semilla de guaje (*L. leucocephala*).

3.5. Determinación de mimosina.

La determinación del alcaloide mimosina se realizó en la semilla fresca de guaje (*Leucaena leucocephala*), la semilla seca y las diferentes muestras en polvo, y se utilizó el método colorimétrico basado en la reacción con cloruro férrico establecido por Makkar (2006) para la FAO.

La determinación de mimosina se llevó a cabo en dos etapas:

a) Curva de calibración

La *curva de calibración* se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Ilham et al. (2015) con algunas modificaciones, se comenzó disolviendo 0.025 g de *L-mimosina* aforándose hasta 25 mL con HCl al 0.1 N. Posterior a esto se transfirieron alícuotas de 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL y 5 mL del líquido estándar a 6 diferentes matraces aforados de 100 mL, a cada matraz aforado se le agregaron 10 mL de HCl 0.1 N y 4 mL de FeCl al 0.5 % en HCl 0.1 N (este último se obtuvo de disolver 0.25 g de FeCl₃ en 50 mL de HCl 0.1 N dentro de un matraz aforado, se almacenó y guardó en refrigeración). El volumen final de cada matraz se llevó a 100 mL con agua destilada. Posteriormente se tomaron 3 muestras de cada matraz y se leyó su absorbancia en el espectrómetro con $\lambda = 535$ nm. Para la elaboración de la curva de calibración de *L-mimosina* se graficó la concentración de *L-mimosina* contra la absorbancia obtenida (Figura 12).

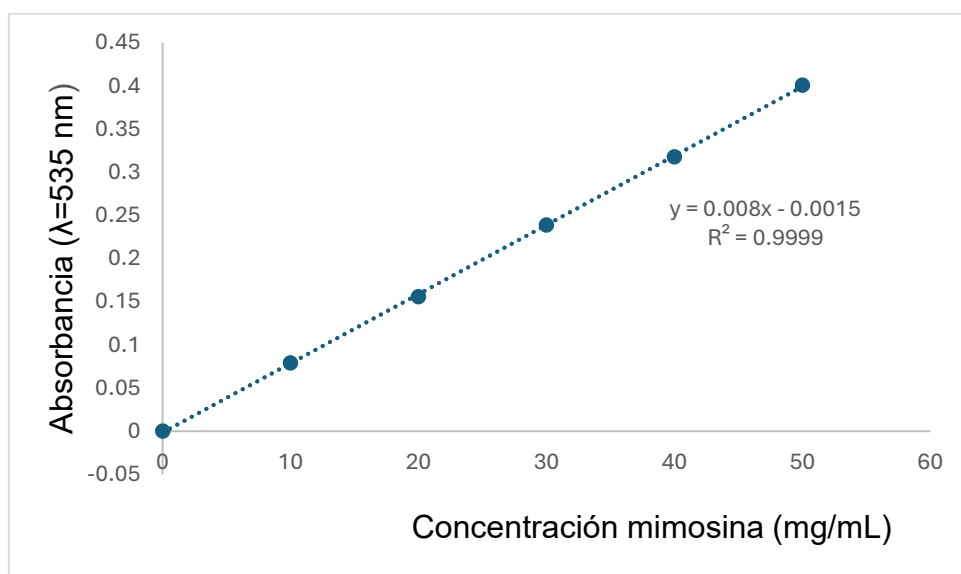


Figura 12. Curva estándar de *L-mimosina*.

b) Acondicionamiento de la muestra y extracción de mimosina.

Se colocó 1.25 g de semilla seca de *L. leucocephala*, en un vaso de precipitado de 250 mL y se digirió con 100 mL de HCl 0.1 N por una hora a 85 °C con agitación constante, se dejó enfriar y posteriormente se transfirió todo a un matraz volumétrico de 250 mL, agitándolo y dejándolo reposar hasta que los sólidos se asentaron en el fondo. Luego de la extracción se continuó con una clarificación la cual constó en transferir 10 mL del sobrenadante a un vaso de precipitado de

150 mL con 30 mg de carbón activado, agregando agua hasta obtener un volumen final de 25 mL, posteriormente se cubrió con un vidrio de reloj y se calentó a ebullición por 15 minutos, se dejó enfriar y se filtró al vacío en el crisol de filtración; el filtrado se colectó en el matraz Kitasato. Luego, se enjuagó el vaso de precipitado y el material en el crisol con 10 mL de HCl 0.1 N dividido en tres porciones. Para finalmente enjuagar el crisol con 5 pequeñas porciones de 3 mL de agua.

c) Determinación espectroscópica de la muestra.

Se transfirió el líquido filtrado obtenido a un matraz volumétrico aforado de 100 mL, agregando 4 mL de solución de FeCl_3 al 0.5 % en HCl 0.1 N y se aforó con agua destilada. El pH se mantuvo entre 1.5 y 2.5. Posteriormente se realizaron diluciones 1:3, se leyó la absorbancia y con ayuda de la ecuación (5), obtenida de la curva de calibración de *L-mimosina*, se calculó el contenido de mimosina en cada muestra. Las determinaciones espectroscópicas se realizaron por duplicado.

$$y = 0.0079 \times + 0.0003 \quad (5)$$

3.6. Evaluación de bioaccesibilidad de proteína de la semilla de guaje (*L. leucocephala*).

Se evaluó la bioaccesibilidad de la proteína presente en la semilla fresca de guaje (*L. leucocephala*), a la harina de semilla de guaje sin tratamiento y a la harina de semilla de guaje con tratamiento de ultrasonido a 30 minutos mediante pruebas *in vitro* estáticas de acuerdo con la metodología del protocolo INFOGEST de los autores Xavier y Mariutti, (2021), con algunas modificaciones. Esta prueba se llevó a cabo para la simulación de las tres fases de digestión iniciando con la fase oral, seguida de la gástrica y finalmente con la fase intestinal, en cada una de las tres fases se agregaron fluidos con soluciones salinas los cuales se prepararon de acuerdo con la Tabla 12.

Tabla 12. Composición del fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) para un volumen final de 500 mL.

Reactivo	Concentración de la solución (mol/L)	FSS Volumen de la solución (mL) (pH = 7)	FGS Volumen de la solución (mL) (pH = 3)	FIS Volumen de la solución (mL) (pH = 7)
KCl	0.5	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	1.0	6.8	12.5	42.5
NaCl	2.0	-	11.8	0.1
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.5	0.4	0.5
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.5	0.06	0.5	-
Para ajustar Ph				
NaOH	1.0	-	-	-
HCl	6.0	0.09	1.3	0.7
CaCl₂ no es agregado a los fluidos				
CaCl ₂ (O) ₂	0.3	1.5	1.5	0.6

Fuentes: Minekus (2014); Ruíz (2022).

A continuación, se explica el desarrollo de cada una de las etapas:

Fase oral: se mezcló 1 g de harina de guaje (*L. leucocephala*) desengrasada, con 3.5 mL de fluido salival simulado (FSS) el cual fue previamente preparado como se muestra en la Tabla 12. Posteriormente se agregaron 500 µL de α-amilasa salival de 1500 U/mL, 5 µL de CaCl₂ (0.3 M) y 95 µL de agua, la mezcla se incubó por 5 minutos a 37 °C en baño con agitación (BS-31JEIO TECH) a 80 rpm.

Fase gástrica: se mezclaron 2 mL del bolo oral obtenido de la fase oral, con 1.6 mL de fluido gástrico simulado (FGS) (Tabla 12), 100 µL de pepsina porcina de 25 000 U/mL, 1 µL de CaCl₂ (0.3 M), 99 µL de agua y HCl 0.1 N para ajustar el pH a 3.0. Posteriormente la mezcla se incubó a 37 °C durante 120 minutos en un baño con agitación a 80 rpm.

Fase intestinal: se mezclaron 4 mL de quimo gástrico obtenido de la fase gástrica, con 1.7 mL de fluido gástrico intestinal (FIS) (Tabla 12), 1 mL de solución de pancreatina 800 U/mL, 0.5 mL de bilis, 8 µL de CaCl₂ (0.3 M), 792 µL de agua y suficiente NaOH (1 M) hasta alcanzar un pH de 7.0, posteriormente la mezcla se incubó a 37 °C durante 120 minutos en un baño con agitación a 170 rpm.

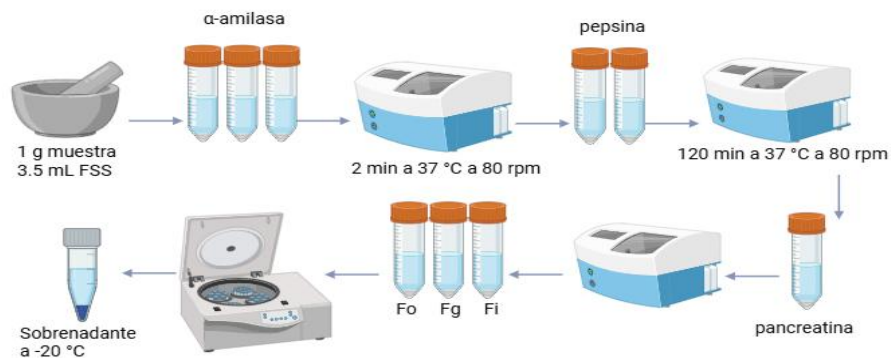


Figura 13. Metodología de simulación de la digestión en humanos. Fuente: Bio Render.com.

Una vez finalizada la simulación de la digestión, las muestras de cada fase se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C como se muestra en la Figura 13, para posteriormente poder cuantificar la proteína por el método Bradford y caracterizarlo por electroforesis SDS-PAGE.

La bioaccesibilidad de la proteína de semilla y harina de guaje se evaluó determinando la concentración de proteína en la fase intestinal en comparación con su concentración en la muestra no digerida. El cálculo se realizó utilizando la ecuación (6):

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (6)$$

Donde: A es el contenido de proteína inicial (mg/mL muestra) en muestras después de la digestión intestinal y B es el contenido de proteína (mg/mL muestra) en muestras antes de la digestión.

3.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Después de realizar el estudio de bioaccesibilidad *in vitro* de la semilla fresca de guaje, de la harina de guaje sin tratamiento y de la harina del tratamiento de ultrasonido a 30 minutos se realizó la caracterización proteica de la fase oral, gástrica e intestinal mediante electroforesis SDS-PAGE (BIO-RAD Mini PROTEAN 3 cell 525BR) de acuerdo con la metodología de Moreno-Niño (2018). En el gel de poliacrilamida al 12 % se colocaron 5 µL del marcador de pesos moleculares en el primer pocillo y en el resto de los pocillos se colocaron 20 µL de las muestras de cada una de las fases de la digestión *in vitro*, calentando previamente las muestras con el tampón muestra a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en una cámara llena con amortiguador de corrida (Tris base 0.2 M pH 8.3, 1.9 M de glicina y SDS) a 200 V y 0.50 mA durante 45 minutos aproximadamente. Pasado este tiempo se tiñó el gel con

azul brillante de Coomassie G-250 durante 90 minutos, después se colocó en una solución de ácido acético (10 %), agua (50 %) y metanol (40 %) combinándolas hasta que las bandas de gel se definieron aproximadamente durante 12 horas. Finalmente, y basándose en el marcador de pesos moleculares, se llevó a cabo la identificación de las bandas de proteínas presentes en cada una de las fases de la digestión *in vitro*.

3.7. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis inferencial empleando las pruebas de Shapiro-Wilk para verificar que los datos presentan una distribución normal y homocedasticidad (Razali & Wah, 2011), posteriormente se realizó la prueba de Mauchly de análisis de esfericidad que se refiere a la condición en la que las varianzas de las diferencias entre todos los pares de grupos posibles o condiciones son iguales (Field, 2009). Se continuó con el análisis de las varianzas (ANOVA) de un factor con medidas repetidas la cual es una técnica estadística que se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos relacionados, en donde las mediciones se realizan en los mismos sujetos bajo diferentes condiciones o en diferentes momentos con un nivel de confianza al 95 %, considerando como condiciones cada tiempo de los tres diferentes tratamientos (Park et al., 2009); cabe mencionar que cada medición del porcentaje de proteína se realizó por triplicado y para el contenido de mimosina se realizó seis veces expresando los valores como media $\pm$ desviación estándar. Para el caso del análisis estadístico de la bioaccesibilidad se realizó un ANOVA de un factor de cada uno de los porcentajes de digestibilidad obtenidos de las diferentes condiciones con un nivel de confianza del 95 %, cada medición se realizó por duplicado, a partir de lo cual se obtuvo el promedio con su desviación estándar, finalmente, con el objetivo de conocer la posible diferencia de las medias obtenidas de las tres condiciones, se realizó la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %. Todos los datos se analizaron con el programa SPSS 25.0 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.).

Capítulo 4. Resultados y discusión.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente investigación.

4.1 Rendimiento de la semilla de guaje (*L. leucocephala*).

El rendimiento en semilla de *Leucaena leucocephala*, calculado de acuerdo con la metodología descrita en la sección 3.2, fue de 19.21 ± 0.35 %. Este valor es relativamente bajo en comparación con el de otras leguminosas de grano como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), cuyo rendimiento en semilla puede superar el 40 % (Beebe et al., 2013). Esta discrepancia puede atribuirse principalmente a la proporción masa de vaina/masa de semilla, donde la cáscara representa el componente mayoritario del fruto. Adicionalmente, durante la recolección se observó una incidencia de semillas inmaduras y dañadas por enfermedades o insectos que originaron un bajo peso lo cual pudo contribuir a la reducción del rendimiento, coincidiendo con lo observado por Ferreira et al. (2019) para esta especie.

4.2 Contenido de humedad, lípidos y proteína de la semilla de guaje.

El análisis de porcentaje de humedad, lípidos y proteína de la harina de semilla de guaje fresca y seca en polvo de *L. leucocephala* se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de humedad, lípidos y proteína de la semilla de guaje fresca y seca (*L. leucocephala*).

Semilla	% Humedad	% Lípidos	% Proteína
Fresca	73.20 ± 0.17	4.53 ± 0.04	31.83 ± 0.55
Seca en polvo	4.49 ± 0.43	3.42 ± 0.09	34.75 ± 0.42

Los resultados se expresan en base seca y se presenta la media $\pm$ desviación estándar (n=3).

El contenido de lípidos de la harina de semilla de guaje fue de 3.42 ± 0.09 % (gramos por cada 100 gramos de semilla en base seca), este resultado se asemeja con lo hallado por García Maceda (2019) quien obtuvo 3.70 ± 0.15 % de lípidos en semillas de *Leucaena esculenta*, siendo 0.28 % mayor al resultado obtenido en este estudio no obstante, difiere con lo indicado por Román Cortés et al. (2014) quienes encontraron que el contenido de extracto etéreo en la semilla de *Leucaena leucocephala* fue de 5.10 %, siendo este resultado mayor en 1.68 %.

En la Tabla 13 se observa una diferencia entre el resultado de lípidos obtenido para la semilla fresca como para la semilla en polvo lo que puede deberse a que en la semilla fresca se tiene la presencia de cutinas (componentes lipídicos que forman parte de la cutícula, una capa cerosa que recubre la superficie de la semilla), mismas que durante el tratamiento de secado sufren una degradación (Godoy, 2012). Así mismo Paredes et al. (2009) indican que el contenido de lípidos también disminuye después de un tratamiento de secado debido a que después de dicho proceso existe una pérdida de los cotiledones (principal fuente de reservas nutritivas), en donde se localizan la mayoría de los lípidos del grano de una leguminosa.

El contenido de proteína de la harina de semillas de *Leucaena leucocephala* fue de 34.748 ± 0.423 gramos por cada 100 gramos de semilla en base seca. Este valor es mayor en 1.47 % en comparación con el contenido de proteína 33.27 ± 0.09 % calculado por García Maceda, (2019). Mientras que García (1996), Ahmed y Abdelati (2009) y Lim (2012) hallaron contenidos de proteína para semillas de *Leucaena leucocephala* de 27.6 a 31.1 % siendo menores de 7.1 % a 3.6 % al resultado encontrado en este estudio. De acuerdo con lo anterior, los datos de proteína indicados en la literatura son diferentes a los obtenidos aquí, esto podría deberse a las características genéticas, estado de madurez, prácticas agrícolas y lugar de procedencia de los frutos (Perfectti y Pascual, 2005; Scheldeman et al., 2006).

4.3 Color de la harina de la semilla de guaje.

Con respecto al color de la harina de la semilla fresca y seca de *L. leucocephala* los datos se muestran en el ANEXO B, la Luminosidad fue de $L = 50.995 \pm 0.3018$ es decir, fue relativamente neutro. Acorde con su valor $Hus (105.005^\circ \pm 0.6820)$ se aprecia un tono verde claro, ya que este parámetro corresponde al tono de color y a través del cual se puede distinguir entre rojo (0 y 360°), amarillo (90°), verde (180°) y azul (270°), siendo la variable de color que mayor asociación tiene con la apreciación visual. Para el caso del Croma el cual es un parámetro que mide el nivel de saturación de un color, en donde valores elevados son colores puros y valores bajos son colores mate o de menor pureza se obtuvo un valor bajo de 32.29 ± 0.9460 (Jha, 2010).

Tabla 14. Resultados de la comparación de los parámetros del color de la semilla de guaje con ΔE .

Parámetros	Harina de guaje	Tratamientos								
		Horneado			Hervido			Ultrasonido		
	Control	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
L*	60.580	61.740	63.900	67.036	62.560	63.030	63.810	59.240	61.330	56.840
a*	-2.220	-2.470	-2.520	-2.080	-2.030	-1.960	-2.240	-0.320	-0.560	-0.780
b*	28.800	28.710	28.633	28.050	30.450	30.120	31.730	27.640	27.890	25.750
C*	28.890	28.817	28.797	28.127	30.520	30.180	31.810	27.640	27.890	25.760
H	94.410	94.917	95.013	94.246	86.180	86.280	85.970	90.660	91.140	91.730
ΔL		1.160	3.320	6.456	1.980	2.450	3.230	-1.340	0.750	-3.740
Δa		-0.250	-0.300	0.140	0.190	0.260	-0.020	1.900	1.660	1.440
Δb		-0.090	-0.167	-0.750	1.650	1.320	2.930	-1.160	-0.910	-3.050
ΔE		1.190	3.340	6.500	2.580	2.800	4.360	2.600	2.040	5.040

Donde: L*: luminosidad, de 0 (oscuros) a 100 (claros); a*: rojo (a+) a verde (-a); b*: amarillo (b+) a azul (b-); c*: cromaticidad y h*: tono, 0- 360 °. Valores medios $\pm$ desviación estándar. Dónde: horneado T₁: es el tratamiento a 10 minutos, T₂: tratamiento a 8 minutos y T₃: tratamiento a 5 minutos; en hervido T₄: es el tratamiento a 10 minutos, T₅: tratamiento a 20 minutos y T₆: tratamiento a 35 minutos y en ultrasonido: T₇: es el tratamiento a 10 minutos, T₈: tratamiento a 20 minutos y T₉: tratamiento a 30 minutos.

Así mismo en la Tabla 14 se muestran las diferencias del color entre el control y los diferentes tratamientos (T₁ al T₉). Primeramente, para el control y T₃ las diferencias de ΔL^* (6.456), Δa^* (0.140) y Δb^* (- 0.750) indican que la harina del T₃ es más clara en 6.456 unidades, 0.140 unidades más roja y 0.750 unidades más azul que la muestra control, mientras que la harina del T₃ da una diferencia total de color (ΔE^*) de 6.500, indicando que existe una diferencia de color significativa y perceptible para el ojo humano entre el control y el T₃ (Alcántara, 2012).

Para el caso del control versus T₉ las diferencias de ΔL^* (-3.740), Δa^* (1.440) y Δb^* (- 3.050) indican que la harina del T₉ es 3.740 unidades más oscura, 1.440 unidades más roja y 3.050 unidades más azul que la muestra control, por lo que la harina T₉ representa una diferencia total de color ΔE^* 5.040 unidades diferente a la muestra control e indicando una diferencia significativa y perceptible para el ojo humano (Nielsen, 2017). Autores como Zhu y Li (2019) encontraron oscurecimientos mayores cuanto mayor era el tiempo del tratamiento con ultrasonido para el caso de la harina de quinua, lo mismo ocurrió en este estudio.

Teniendo en cuenta la teoría del espacio del color LAB (Hunter R. 1940) y la norma ISO 12647-2 en donde se abordan umbrales de tolerancia para ΔE donde una unidad es excelente y mayor a 5 unidades es mala, se logró evidenciar que los únicos tratamientos con ΔE mayores a 5 unidades fueron T₃ y T₉ teniendo solo estos dos casos valores mayores al umbral de tolerancia, por lo que el cambio de color en estos tratamientos es visible, asimismo el análisis del cambio de color después del tratamiento de horneado permiten determinar el impacto de cada tratamiento aplicando diferentes tiempos (5, 8 y 10 minutos), en este caso se sabe que las condiciones de procesamiento utilizadas en el horneado (altas temperaturas y bajo contenido de agua) favorecieron la reacción de Maillard que consiste en la condensación de grupos amino con azúcares reductores, lo que conduce a la formación de compuestos de color (Badui, 2006). Siendo los cambios de color durante este proceso un indicador visual para evaluar la intensidad del tratamiento con respecto a los cambios químicos o a la pérdida nutricional en los alimentos (Ilo & Berghofer, 1999).

4.4 Contenido de proteína de las muestras de semilla de guaje tratadas por hervido, horneado y ultrasonido.

De acuerdo con las metodologías descritas en las secciones 3.4 y 3.5 para la determinación de proteína de la semilla de guaje se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 14 para los diferentes tratamientos (horneado, hervido y ultrasonido) los cuales se analizaron por triplicado.

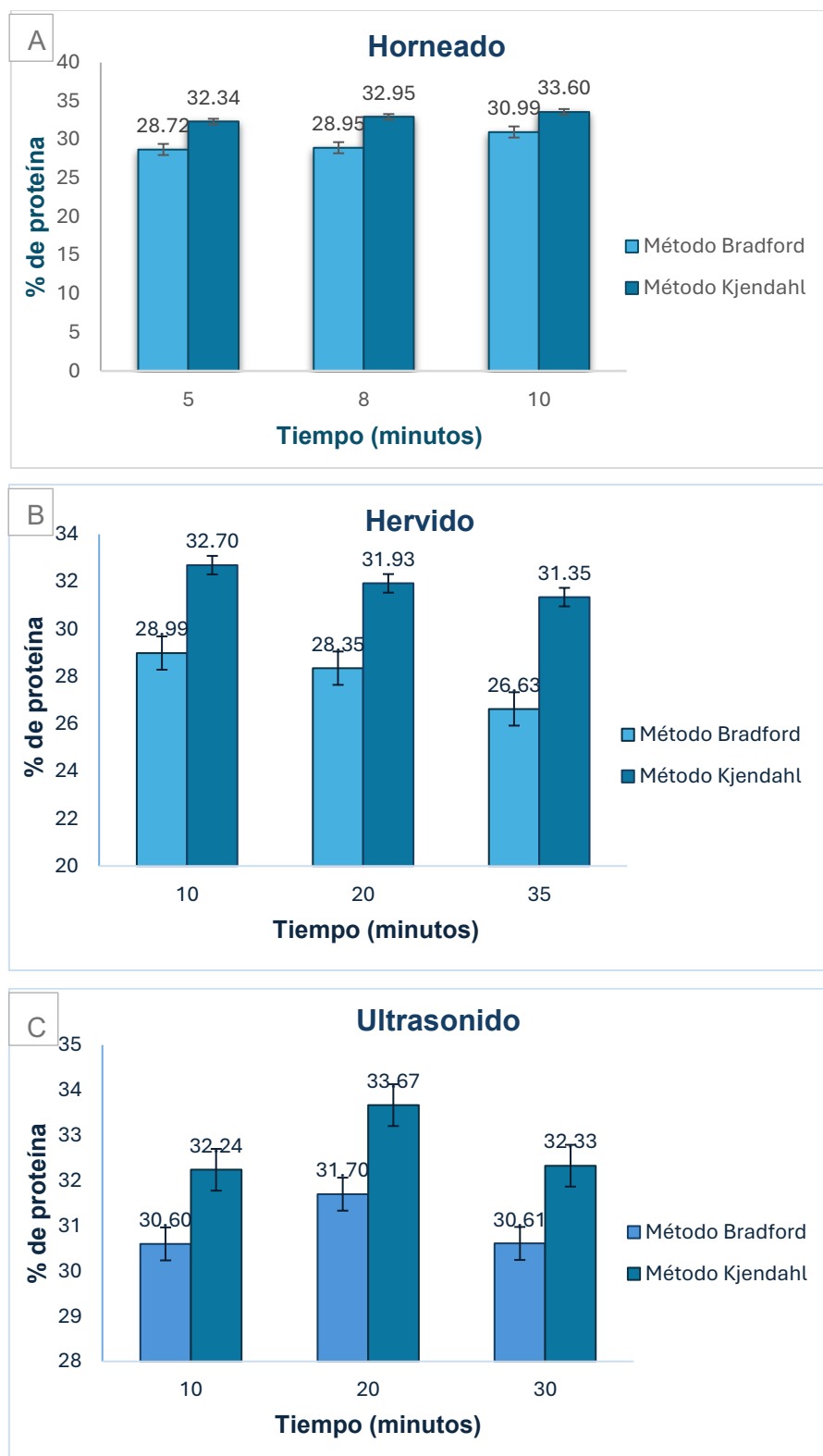


Figura 14. Gráficas del porcentaje de proteína obtenidos por los métodos de Bradford y Kjeldahl de las muestras de harina de semilla de guaje sometidas a diferentes tratamientos de: A. Horneado, B. Hervido y C. Ultrasonido

Como se observa en la Figura 14 los porcentajes de proteína obtenidos por el método de Kjeldahl tienen el mismo comportamiento que los obtenidos por el método de Bradford, siendo consistentes entre sí, indicando que ambos son capaces de reflejar visualmente las tendencias generadas por los tratamientos térmicos.

En el caso del tratamiento de horneado (Figura 14 A), se observa que el mayor porcentaje de proteína determinado por ambos métodos, se obtuvo en el T_3 , en el cual se aplicó el mayor tiempo de horneado, posiblemente se debe a que durante la extensa pérdida de humedad de este tratamiento se concentran los componentes sólidos, de igual manera, existe una desnaturalización térmica profunda lo que implica una pérdida de estructura tridimensional haciendo que los residuos de aminoácidos queden más expuestos y logren unirse mejor con el colorante de Bradford, maximizando así la señal detectada. En esta reacción, las principales proteínas de almacenamiento contenidas en las semillas de guaje (globulinas y albúminas) son las mayormente afectadas por este proceso (Nielsen, 2017). Es importante enfatizar que, si bien se podría invocar a la reacción de Maillard, esta suele conducir a una disminución de la proteína disponible al consumir grupos amino libres, particularmente la lisina. Por lo tanto, el efecto dominante en tratamiento tres (T_3) parece ser la concentración y la desnaturalización, más que la glicación avanzada.

En la Figura 14 B se observa que el menor porcentaje de proteína se obtuvo en el T_6 , después de haber hervido la semilla fresca durante 35 minutos, lo anterior pudo ser debido a que este tiempo de hervido fue suficiente para atacar la estructura de las proteínas, solubilizando polisacáridos, provocando un ablandamiento o ruptura de la lámina media; o a la gelatinización del almidón lo que conlleva a una disminución del contenido de proteína, así como de otros compuestos (Ovando-Martínez et al., 2011). En otros estudios se ha demostrado que durante el hervido de semillas de leguminosas tras un periodo largo de tiempo ocurre un ablandamiento del pericarpio, lo que provoca decremento del contenido de proteína, y que concuerda con lo sucedido en el T_6 , lo mismo sucedió en otros cereales y leguminosas como: el trigo, la avena, la cebada, el frijol y la chíá (Santiago-Ramos et al., 2018; Quintero-Quiroz, 2019). En la Figura 14 C se observa que el mayor porcentaje de proteína se obtuvo en el T_8 , cuando la harina de semilla seca se sometió a ultrasonido durante 20 minutos lo cual se explica ya que el ultrasonido reduce el tamaño de las partículas aproximadamente 10 veces, lo que resulta en una mayor extracción de proteína del sustrato debido al aumento del área superficial (Nielsen, 2017). Otros estudios también han demostrado que el ultrasonido aumentó la eficiencia de extracción (del 37 al 57 %) de proteínas

de otras fuentes, como el germen de trigo (Zhu et al., 2009). Por lo tanto, la intensa cavitación y el efecto mecánico causado por los ultrasonidos son responsables de la mejora en la extracción de proteínas. Como resultado, las partículas se descomponen en partículas más pequeñas creando una mayor superficie disponible para la toma del medio, lo que mejora el proceso de transferencia de masa (Quintero-Quiroz, 2019). Del T_8 al T_9 se observa un decaimiento del contenido de proteína, esto podría deberse a que después de ese tiempo tras el efecto de cavitación (donde se desintegran las matrices celulares), se facilita el daño de la pared celular y se favorece el acceso del disolvente hasta la difusión de la proteína (Zhang et al., 2019).

Adicionalmente, con respecto a los dos métodos de determinación de proteínas que se utilizaron se puede comentar que los diferentes métodos no miden exactamente lo mismo, y su comparación crítica proporciona información más completa que el uso de uno solo en forma aislada. El método de Kjeldahl cuantifica el nitrógeno total (orgánico y en amoníaco), el cual se convierte a proteína bruta aplicando un factor de conversión genérico (Nielsen, 2017). Si bien es un método de referencia, puede verse influenciado por la presencia de nitrógeno no proteico o por la idoneidad del factor de conversión para las proteínas específicas de la semilla de guaje, en este trabajo de investigación se utilizó el factor de 6.25. Por su parte, el método de Bradford se basa en un principio espectrofotométrico, donde el colorante Coomassie Blue G-250 se une específicamente a residuos de aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina) y aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina) de las proteínas (Compton y Jones, 1985). Por lo tanto, la sobreestimación relativa observada con Bradford no sugiere necesariamente una mayor cantidad de masa proteica absoluta, sino muy probablemente una mayor accesibilidad de los residuos para el colorante, resultado de las modificaciones estructurales provocadas por los tratamientos.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de proteína de las muestras tratadas por tres métodos diferentes, se tomaron los resultados obtenidos por el método de Bradford, como primer paso se realizó un análisis descriptivo de los datos (ANEXO C), posteriormente un ANOVA de un factor de medidas repetitivas el cual se muestra en la Tabla 16. Dado que el supuesto de esfericidad no se cumplió, se aplicó la corrección de Greenhouse-Geisser. El análisis reveló un efecto principal estadísticamente significativo del factor tratamiento sobre el contenido de proteína (p -valor de 0.003). La magnitud de este efecto, calculada mediante la prueba de Eta parcial al cuadrado (η^2p) fue del 68.1 %, lo que indica que una proporción sustancial de la varianza en el contenido de proteína es atribuible a los tratamientos aplicados, así mismo la potencia estadística tiene la capacidad de distinguir alguna señal del ruido (error tipo II) para este caso el valor obtenido fue de 0.961 lo que resulta en una

potencia estadística buena debido a que es un valor mayor al valor mínimo permitido de 0.800 (Field, 2018). Posteriormente, se realizó un análisis de Bonferroni de comparación por parejas para conocer en cuál de los tratamientos se dieron las diferencias estadísticamente significativas, el cual se muestra en la Tabla 16 en donde el número 1 corresponde al tratamiento de horneado, el número 2 a hervido y el número 3 a ultrasonido, cuando se compara el tratamiento de ultrasonido respecto al tratamiento de hervido se obtiene un *p-valor* de 0.003 y cuando se compara con el tratamiento de horneado se obtiene un *p-valor* < 0.001 , en ambos casos al ser un valor menor al *p-valor* ajustado de 0.05 se determina que existen diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento de ultrasonido respecto a los otros dos tratamientos (horneado y hervido).

Tabla 15. Pruebas de efectos intra-sujetos teniendo como medida el porcentaje de proteína

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Tratamientos	Esfericidad asumida	280.395	2.000	140.197	17.098	<0.001	0.681	34.196	0.999
	Greenhouse- Geisser	280.395	1.077	260.413	17.098	0.003	0.681	18.410	0.961
	Huynh-Feldt	280.395	1.111	252.419	17.098	0.002	0.681	18.993	0.965
	Límite inferior	280.395	1.000	280.395	17.098	0.003	0.681	17.098	0.950
Error (Tratamientos)	Esfericidad asumida	131.195	16.000	8.200					
	Greenhouse- Geisser	131.195	8.614	15.231					
	Huynh-Feldt	131.195	8.887	14.763					
	Límite inferior	131.195	8.000	16.399					

a. Se ha calculado utilizando alpha = 0.05

Tabla 16. Comparaciones por parejas teniendo como medida el porcentaje de proteína.

(I) Tratamientos (J) Tratamientos		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-4.777	1.707	0.070	-9.923	0.369
	3	-7.831*	1.547	0.003	-12.495	-3.166
2	1	4.777	1.707	0.070	-0.369	9.923
	3	-3.054*	.402	<0.001	-4.266	-1.841
3	1	7.831*	1.547	0.003	3.166	12.495
	2	3.054*	.402	<0.001	1.841	4.266

Nota: Se basa en medias marginales estimadas. *La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05, b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni, donde 1 = horneado, 2 = hervido y 3 = ultrasonido.

El análisis estadístico de los porcentajes de proteína (Tabla 16) reveló un patrón diferenciado entre los tratamientos. El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto principal significativo, con un tamaño del efecto grande y una potencia alta ($F_{(1,077)} = 17.098$, $p < 0.003$, $\eta^2 = 0.681$, Potencia ($1-\beta$) = 0.961), indicando que las diferencias observadas son robustas y es poco probable que sean producto de un error de tipo I. Las comparaciones post hoc confirmaron que, si bien no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de horneado ($M = 23.14$, $DE = 4.74$) y hervido ($M = 27.91$, $DE = 1.16$; $p < 0.070$; IC 95%, -9.923, 0.369], el tratamiento de ultrasonido ($M = 30.97$, $DE = 0.59$) produjo un contenido de proteína significativamente mayor que los demás ($p < 0.003$; [IC 95 %, -12.495, -3.166], estableciéndose como el método más efectivo.

Estos hallazgos estadísticos comprueban de manera completa la hipótesis de que el método de extracción influye directamente en el contenido proteico recuperado. La falta de diferencias significativas entre el horneado y el hervido sugiere que el calor seco y el calor húmedo, en los parámetros aplicados, tienen un efecto similar sobre las proteínas, posiblemente por desnaturalizarlas de una manera comparable que no afecta drásticamente su cuantificación. Sin embargo, el resultado más importante es el del tratamiento por ultrasonido. Explicado por el mecanismo de acción físico y no térmico del ultrasonido en donde, las ondas de cavitación generan fuerzas de cizallamiento microscópicas que rompen las paredes celulares y liberan el contenido intracelular de una manera más eficiente y selectiva, evitando la degradación térmica que puede asociarse a los métodos tradicionales. El hecho de que el ultrasonido no solo sea diferente, sino que presente una ventaja clara y cuantificable (con un tamaño del efecto grande), valida su potencial como una tecnología superior para la extracción de proteínas. La baja desviación estándar ($DE = 0.59$) en el ultrasonido, en contraste con la alta variabilidad del horneado ($DE = 4.74$), refuerza además que se trata de un método no solo más efectivo, sino también más consistente y confiable.

4.5 Efecto de los tratamientos propuestos sobre el contenido de mimosina.

De acuerdo con la metodología descrita en la sección 3.6 se obtuvieron los siguientes resultados de la determinación del contenido de mimosina en la semilla fresca de guaje, harina desengrasada y en cada uno de los tratamientos propuestos en este trabajo de investigación. Los resultados, se presentan en la Figura 15, en donde cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado.

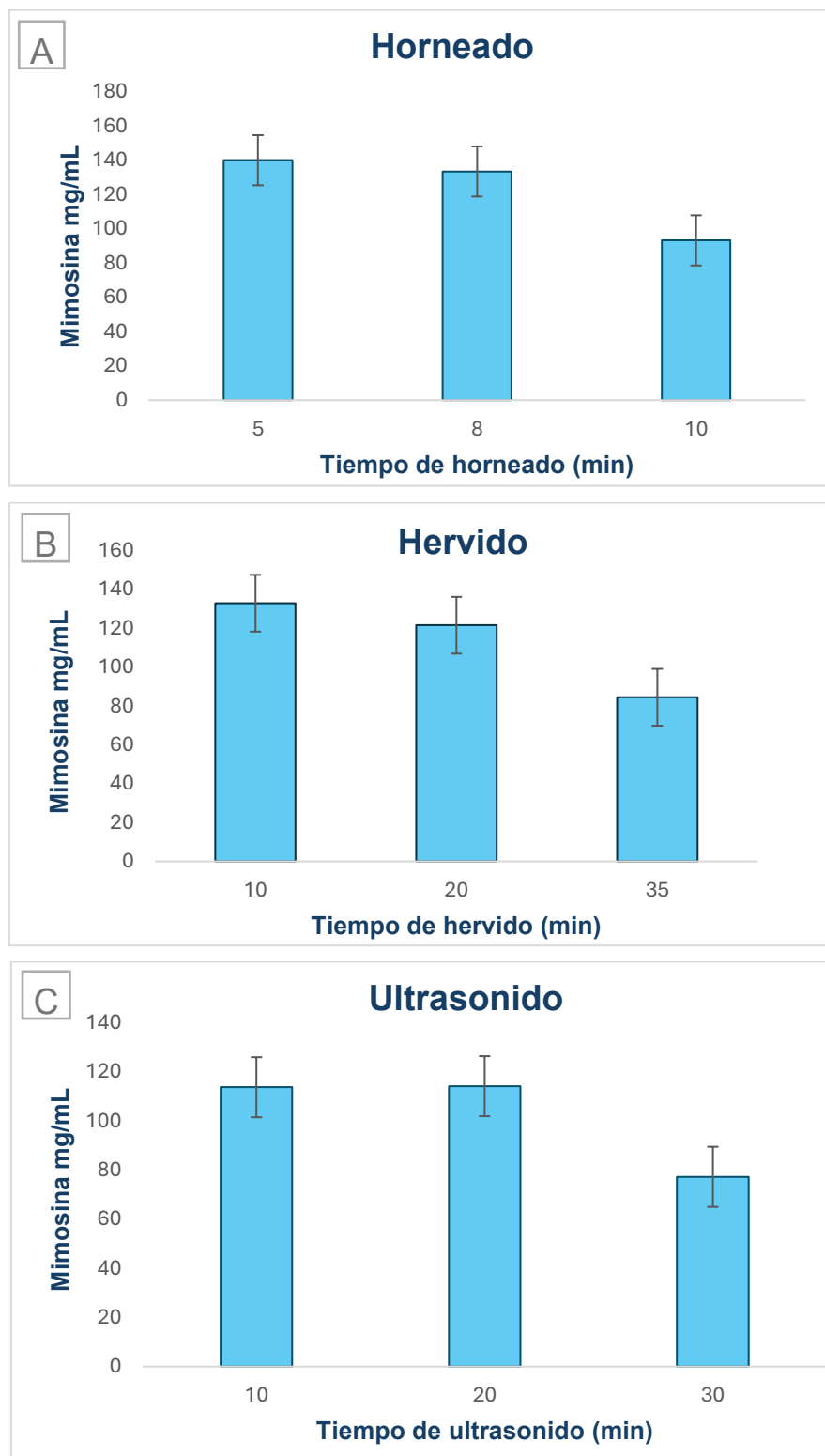


Figura 15. Contenido de mimosina en la semilla de guaje tratada a diferentes tiempos por **A:** Horneado, **B:** Hervido y **C:** Ultrasonido.

El contenido de mimosina de la harina de semillas secas de guaje fue de 171.75 ± 3.2 microgramos por gramo (mg/mL), este valor es ligeramente superior en 4.75 mg/mL a lo reportado por Xuan et al. (2006) para semillas de *L. esculenta* de Okinawa ($167.00 \pm 0.05 \text{ mg/mL}$). De acuerdo con Duarte et al., (2012) los porcentajes de mimosina varían en función a la especie de *Leucaena spp.*, por lo que se infiere que la divergencia en los resultados podría ser consecuencia de las diferentes variedades y de las condiciones ambientales que predominan durante el ciclo de cultivo (Sethi & Kulkarni, 1995). Esta idea es complementada por Honda (2021), quien comenta que la mimosina parece actuar como una molécula de respuesta al estrés abiótico en la *Leucaena*, cuya concentración fluctúa de acuerdo con las condiciones ambientales, donde la síntesis de este compuesto nitrogenado puede verse modulado por factores como el estrés hídrico (sequía), las altas temperaturas, la intensidad lumínica (estrés foto-oxidativo), y las condiciones del suelo, como el pH, salinidad y/o la presencia de aluminio en suelos ácidos (García et al., 2020; Bucker-Neto et al., 2017).

Respecto a la eficacia de los tratamientos, como se observa en la Figura 15, el tratamiento de ultrasonido (T_9) fue el más efectivo, alcanzando el menor contenido de mimosina ($77.26 \pm 1.04 \text{ mg/g}$). Este resultado representa una reducción del 44.85 % en comparación con el tratamiento T_1 (hervido, $140.08 \pm 3.17 \text{ mg/g}$), diferencia que resultó estadísticamente significativa (Tabla 16). Está marcada diferencia se explica por el contraste en los mecanismos de acción de ambos tratamientos. El ultrasonido, a pesar de emplear temperaturas moderadas, genera el fenómeno de cavitación, el cual induce una desnaturalización proteica que comienza con la pérdida de la estructura cuaternaria (separación de subunidades) y prosigue con la pérdida de la estructura terciaria (desplegamiento de la proteína), manteniendo intactas las estructuras primaria y secundaria. Por otro lado, el tratamiento de hervido expone las proteínas a temperaturas cercanas a los 100°C . De acuerdo con (Gropper & Smith, 2013), este tratamiento térmico intenso no solo causa la pérdida de las estructuras cuaternaria y terciaria, sino que también puede degradar la estructura primaria, hidrolizando los enlaces peptídicos y promoviendo reacciones laterales como la desamidación, oxidación o formación de enlaces cruzados hasta llegar a los aminoácidos. Por lo tanto, la mayor eficacia del ultrasonido sugiere que el despliegamiento controlado de la proteína es un mecanismo más eficiente para reducir el contenido de mimosina, posiblemente al hacerla más accesible para su extracción, en comparación con la degradación probable inducida por el calor severo del hervido.

En algunos casos el tratamiento térmico aplicado a algunas leguminosas y semillas (como los frijoles y moringa) incrementa su perfil nutricional, contenido de proteína y fibra, (Olmedilla Alonso

et al., 2010; Ongusina et al., 2011), y a su vez degrada componentes antinutricionales termolábiles (lectinas, inhibidores de tripsina), así como algunos nutrientes sensibles al calor (aminoácidos y vitaminas) (Avilés-Gaxiola et al., 2018). Extrapolando estos principios a la semilla de guaje (*Leucaena spp.*), es probable hipotetizar que el hervido induce una significativa reducción en el contenido de mimosina. A diferencia de las proteínas, la mimosina, no se desnaturaliza, sino que se ve afectada principalmente por dos mecanismos: i) la lixiviación, dada su alta hidrosolubilidad, que facilita su migración desde la semilla al agua de cocción, y ii) una potencial degradación térmica de su estructura química, particularmente del anillo 3-hidroxi-4-piridónico, responsable de su capacidad para quelar metales esenciales como el zinc y el hierro. Por lo tanto, se postula que el tratamiento térmico no solo mejora el perfil general de macronutrientes, sino que específicamente mitiga la toxicidad de la mimosina, mejorando así la seguridad alimentaria y el valor potencial de la semilla de guaje, sin embargo, presenta valores menores de proteína en comparación con el tratamiento de ultrasonido. Por lo que, la superior eficacia del ultrasonido sugiere que el mecanismo de cavitación es particularmente efectivo para degradar o facilitar la lixiviación de la mimosina. Haciendo posible que el colapso de las burbujas de cavitación genere fuerzas de cizallamiento que fracturan las paredes celulares, liberando el compuesto al medio para su eliminación (Yang et al., 2014). Este fenómeno físico, sumado a la posibilidad de que induzca una respuesta de degradación del metabolito en la propia semilla, constituye un mecanismo de acción distintivo y más eficiente que la simple desnaturalización por calor. Este hallazgo posiciona al ultrasonido como una alternativa prometedora a métodos tradicionales como la nixtamalización (García-Maceda et al., 2019) para la detoxificación de la semilla de guaje. Sin embargo, no se dispone de datos comparables en los tratamientos de ultrasonido, hervido y horneado, pero de acuerdo con Yang et al., (2014), el propósito de la aplicación de los tratamientos térmicos en las leguminosas es mejorar el valor nutricional y favorecer la digestibilidad de las proteínas, sin embargo, muchos de esos tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 80 °C también afectan algunos de los nutrientes como aminoácidos y vitaminas termolábiles (Avilés-Gaxiola et al., 2018).

Los resultados del ANOVA de medidas repetidas, presentados en la Tabla 17, indican la presencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de mimosina entre los tres tratamientos evaluados, con un efecto extremadamente grande ($F_{(1.36)} = 779.02$, $p < .001$, $\eta^2 = 0.979$) y una potencia máxima ($1-\beta = 1.0$). Estos resultados estadísticos comprueban y cuantifican de manera completa lo que se podría apreciar de forma visual en los datos o en el gráfico de medias mostrado en la Figura 15, existiendo una clara respuesta en la eficacia de los tratamientos. Las comparaciones post hoc revelaron que el tratamiento de horneado registró el contenido de mimosina más alto ($M = 128.890$, $DE = 2.744$), siendo significativamente mayor que el del tratamiento de hervido ($M = 123.059$, $DE = 1.986$, $p < 0.002$), [IC 95 %, 2.166, 9.495]. Por su parte, el tratamiento de ultrasonido demostró ser el más efectivo para reducir la mimosina, obteniendo el valor más bajo ($M = 84.980$, $DE = 1.642$), diferencia que fue estadísticamente significativa frente a los otros tratamientos ($p < 0.001$) y que se refleja en el amplio intervalo de confianza para la diferencia de medias (IC 95 % [-39.894, -36.265]).

Tabla 17. Comparaciones por parejas de los diferentes tratamientos sobre el contenido de mimosina.

Tratamientos		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-5.831*	1.380	0.002	-9.495	-2.166
	3	38.079*	0.683	0.000	36.265	39.894
2	1	5.831*	1.380	0.002	2.166	9.495
	3	43.910*	1.417	0.000	40.149	47.671
3	1	-38.079*	0.683	0.000	-39.894	-36.265
	2	-43.910*	1.417	0.000	-47.671	-40.149

Se basa en medias marginales estimadas; *. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05; b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

4.6 Características sensoriales de las harinas de guaje obtenidas mediante los diferentes tratamientos.

Adicionalmente durante el desarrollo del tratamiento térmico por hervido se observaron alteraciones sensoriales significativas en las semillas de guaje, consistentes en la generación de un olor característico y un cambio de color de verde (Figura 16 A) a mostaza (Figura 16 B). La intensidad del olor puede considerarse un indicador indirecto de la efectividad del tratamiento, ya que concuerda con lo hallado por Maity et al. (2014) para semillas de *Leucaena leucocephala*. Dichos autores atribuyen este fenómeno a la liberación de compuestos sulfurados volátiles, producto de la degradación térmica de la mimosina y otros compuestos azufrados. Paralelamente, la alteración cromática observada aquí y por Martínez et al. (2013), se asocia a la degradación térmica de pigmentos naturales y a la posible ocurrencia de reacciones de Maillard. Ambos fenómenos están directamente vinculados con la reducción de factores antinutricionales.

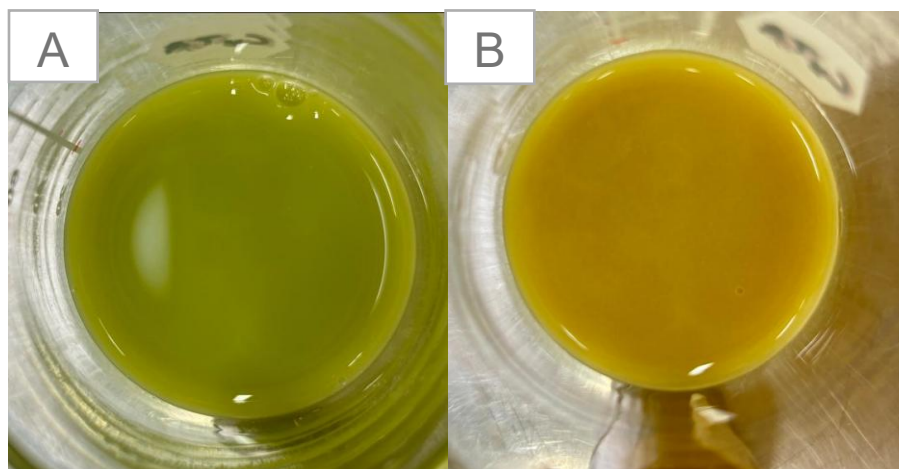


Figura 16. A. Semilla fresca, B. Semilla hervida durante 30 min a T de ebullición.

Adicionalmente, el tratamiento de hervido generó un notable aumento en la viscosidad del medio, hasta el punto de interferir en operaciones como el pipeteo. Este incremento en la viscosidad puede atribuirse a la lixiviación y solubilización de galactomananos, polisacáridos de reserva del endospermo de leguminosas (Meier & Reid, 1982), los cuales, al ser sometidos a altas temperaturas, forman hidrocoloides altamente solubles en agua que confieren alta viscosidad y estabilidad a las soluciones acuosas (Neukom, 1988).

Durante el tratamiento de ultrasonido después del tiempo de exposición la sonicación de la muestra resultó en la formación de agregados grumosos y una apariencia no homogénea (Figura 17) lo que podría resultar tras la desnaturalización proteica, por lo que, para recuperar una

dispersión uniforme, la muestra fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tras este proceso, se obtuvo un sobrenadante claro y un sedimento compacto.



Figura 17. Sedimento de harina de guaje después del tratamiento de ultrasonido.

El sedimento presentaba una consistencia grumosa y viscosa, por lo que se colocó en el horno a 45 °C durante 8 horas (Figura 18), posteriormente, se procedió a moler y a tamizar, obteniendo una harina con tamaño homogéneo, como se muestra en la Figura 19.



Figura 18. Muestra de harina de guaje seca después del tratamiento de ultrasonido.



Figura 19. Harina de guaje obtenida tras el tratamiento de ultrasonido.

4.7 Estudio de bioaccesibilidad de la proteína de *Leucaena leucocephala*.

El análisis estadístico confirmó que el tratamiento de ultrasonido de la harina de guaje por 30 minutos tuvo un efecto significativo tanto en la disminución de mimosina como en la preservación del contenido proteico, por lo que este tratamiento fue elegido para el estudio de bioaccesibilidad de la proteína, el estudio también se realizó en la semilla de guaje sin tratamiento y en la semilla fresca de guaje. En la tabla 18 se muestran los resultados del contenido de proteína expresados en mg/mL de cada una de las fases de digestión y el porcentaje de digestibilidad encontrado para dichas condiciones.

Tabla 18. Cuantificación de proteína en las tres fases de la digestión (*L. leucocephala*).

Condiciones	Fase de la digestión	Proteína (mg/mL)	Digestibilidad (%)
Harina con tratamiento de ultrasonido	Oral	6.098 ± 0.005	83.207 ^a
	Gástrica	5.878 ± 0.001	
	Intestinal	5.074 ± 0.002	
Harina de guaje sin tratamiento	Oral	5.926 ± 0.007	65.215 ^b
	Gástrica	3.077 ± 0.005	
	Intestinal	3.865 ± 0.004	
Semilla fresca de guaje	Oral	3.918 ± 0.009	43.834 ^c
	Gástrica	3.511 ± 0.008	
	Intestinal	1.717 ± 0.007	

* **a,b,c:** Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey) ($p \leq 0.05$)

De acuerdo con la Tabla 18, la harina tratada con ultrasonido arrojó el porcentaje de digestibilidad más alto (83.207 %), lo que representa un incremento del 39.37 % con respecto a la digestibilidad de la semilla fresca (43.834 %) sin ningún tratamiento. Esta mejora sustancial puede atribuirse a los cambios estructurales inducidos por el ultrasonido. Estos hallazgos son consistentes con lo establecido por Wiesinger et al. (2020), quienes señalan que este proceso, aplicado a una matriz alimentaria, desnaturaliza las proteínas lo que permite una mejor bioaccesibilidad. Por su parte, Brodkorb et al. (2019) postulan que la cavitación ultrasónica rompe la membrana celular vegetal, lo que optimiza las condiciones del medio digestivo, tales como la acidez, la acción enzimática y el tiempo de contacto. Dicha desorganización de la matriz alimentaria favorece la acción de enzimas digestivas como la pepsina, facilitando la hidrólisis de proteínas de almacenamiento como la albúmina, legumina y vicilina presentes en la semilla de guaje (Moradi et al., 2020; Ramírez-Ojeda, 2021). Asimismo, el proceso de secado por aire caliente posterior a

la aplicación de ultrasonido que se aplicó a la harina de guaje contribuye a inactivar los inhibidores de proteasas de las familias Bowman-Birk y Kunitz, que naturalmente están presentes en la semilla de guaje y bloquean la actividad de enzimas digestivas. Por lo que la inactivación de estos factores antinutricionales, sumada a la desnaturalización proteica por el tratamiento térmico y mecánico, promueve una descomposición más eficiente durante la digestión gástrica e intestinal facilitando la penetración de enzimas pancreáticas y ácidos biliares. Dicha inactivación, junto con los cambios estructurales inducidos por los tratamientos térmico y mecánico, favorecen una descomposición más eficiente de las proteínas durante la simulación de la digestión gástrica e intestinal. En consecuencia, se facilita la penetración de las enzimas pancreáticas y los ácidos biliares en la matriz alimentaria durante la digestión *in vitro* (Reyes, 2025). Por el contrario, la menor bioaccesibilidad se observa en la semilla fresca de guaje (43.834 %) y podría atribuirse a la acción intacta de los inhibidores de proteasas, las estructuras compactas de las glicinas 11 S y la interacción de las proteínas con la fibra dietética insoluble que las secuestra y por tanto limita su liberación (Ramírez-Ojeda, 2021). Cabe señalar que incluso la harina de guaje sin tratamiento mostró una digestibilidad superior (65.215 %) a la de la semilla fresca, con un aumento del 21.38 %, lo que sugiere que el procesamiento mecánico-térmico para obtener la harina de guaje mejora la bioaccesibilidad de las proteínas.

De acuerdo con Vilas-Boas et al., (2020), la estimación de la bioaccesibilidad es sumamente importante para estudiar la incorporación de harinas de leguminosas en matrices alimentarias para incrementar el contenido proteico de algún alimento, sin embargo, esto no suele ser tan sencillo ya que de acuerdo con Ferreira-Santos et al., (2021) para que esto ocurra la proteína debe ser liberada de la matriz alimentaria y modificada en el sistema gastrointestinal. En este trabajo la proteína de la harina de guaje con tratamiento ultrasónico logró ser liberada en un 83.207 %, lo que resulta ser bueno ya que se logró mejorar la bioaccesibilidad en un aproximadamente 27.6 % comparado con la harina sin tratamiento (65.215 %) y casi un 40 % comparado con la semilla fresca (43.834 %).

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor mostró que existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de bioaccesibilidad de las proteínas entre las tres muestras evaluadas ($F(2, 15) = 12.45, p < 0.05$). Para identificar entre qué grupos específicos radicaban estas diferencias, se aplicó una prueba post-hoc de Tukey. Los resultados (ANEXO D) demostraron que la digestibilidad de harina de guaje con ultrasonido ($85 \% \pm 2.1$) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la harina de guaje sin tratamiento ($78 \% \pm 1.8$) y que la

semilla fresca de guaje ($76 \% \pm 2.3$), lo cual indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres medias del porcentaje de digestibilidad del estudio.

4.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-PAGE.

En la Figura 20 se presenta el análisis mediante electroforesis SDS-PAGE de las proteínas en el cual se analizaron las muestras de harina de guaje sin tratamiento (HST), harina de guaje tratada con ultrasonido durante 30 minutos (HTU), y la semilla fresca de guaje (SF). En el carril 1 se visualizan las proteínas del marcador de pesos moleculares. Los carriles 2, 3 y 4, contienen las muestras de harina sin tratamiento: fracción sometida a la digestión oral simulada (HSTFo, carril 2), fracción sometida a la digestión gástrica simulada (HSTFg, carril 3) y la fracción sometida a la digestión intestinal simulada (HSTFi, carril 4). En el carril 2 (HSTFo) se identificaron bandas principales de aproximadamente 119, 64 y 35 KDa. Mientras que en las dos fases restantes de la digestión simulada (carriles 3 y 4), el patrón electroforético mostró algunos cambios: en el caso de la banda de 64 KDa desapareció y fue reemplazada por una nueva banda de aproximadamente 55 KDa, mientras que las bandas de 119 y 35 KDa se mantuvieron. La persistencia de estas últimas sugiere una limitada bioaccesibilidad de esas proteínas, posiblemente atribuible a factores intrínsecos como el plegamiento proteico, que impediría la interacción con otras biomoléculas, o a una baja solubilidad proteica en el medio digestivo (Joye, 2019). Con base en su movilidad electroforética y en la literatura consultada, se propone una identificación proteica: la banda de ~119 kDa podría corresponder a un dímero estable de vicilinas o a un precursor no procesado de legumina, que son estructuras que ocasionalmente se observan en extractos crudos. Las bandas de ~64 KDa y ~55 kDa son consistentes con subunidades α de las vicilinas (globulinas 7S) y un producto de su degradación proteolítica, respectivamente, esto de acuerdo con lo documentado por Quinga-Paucar (2017). Finalmente, la banda de ~35 kDa podría asociarse a la subunidad ácida de la legúmina (globulina 11S), proteína de reserva predominante en muchas leguminosas (Balderas-León, 2020). De acuerdo con Noyola Altamirano (2024) la coexistencia de estas familias de proteínas es un hallazgo esperado y confirma el perfil proteico típico de la semilla de guaje.

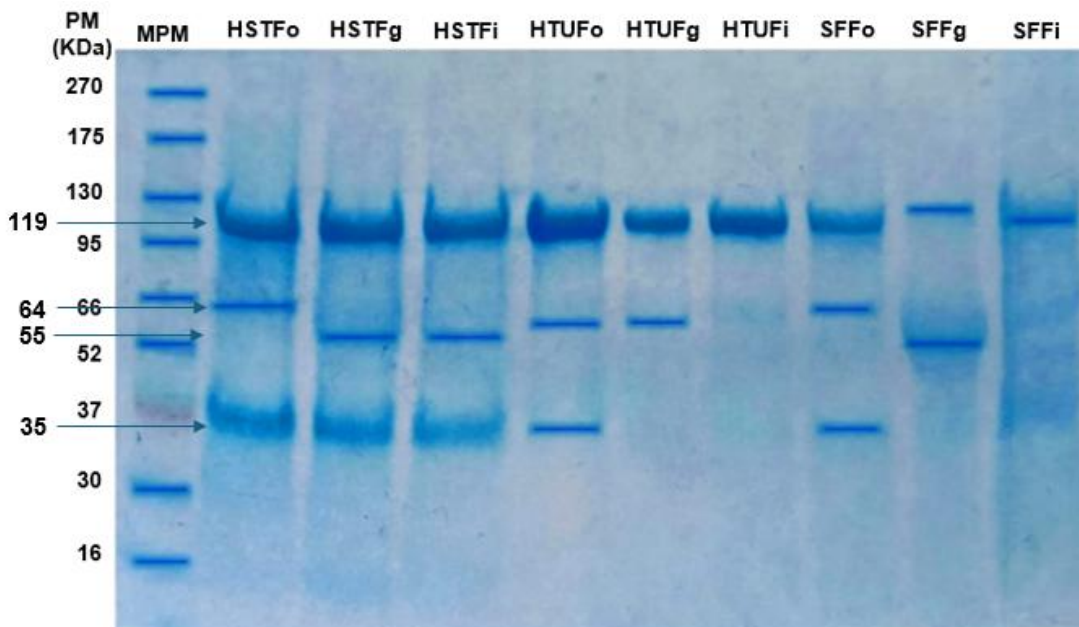


Figura 20. Gel de electroforesis SDS-PAGE.

Donde: *MPM (marcador de pesos moleculares), HSTFo (Harina sin tratamiento en la fase oral), HSTFg (Harina sin tratamiento en la fase gástrica), HSTFi (Harina sin tratamiento en la fase intestinal), HTUFo (Harina con tratamiento ultrasonido a 30 min en la fase oral), HTUFg (Harina con tratamiento ultrasonido a 30 min en la fase gástrica), HTUFI (Harina con tratamiento ultrasonido a 30 min en la fase intestinal), SFFo (semilla de guaje fresca fase oral), SFFg (semilla de guaje fresca fase gástrica), SFFi (semilla de guaje fresca fase intestinal).

En el análisis electroforético de la harina de guaje tratada con ultrasonido (30 minutos), los carriles HTUFo, HTUFg y HTUFI corresponden a la fase oral, gástrica e intestinal respectivamente. En la fase oral (HTUFo) se observaron tres bandas con pesos moleculares de 119, 64 y 35 kDa, las que son idénticas a las de la harina sin tratamiento. Esto se explica porque en esta fase solo ocurre la digestión química de los carbohidratos en presencia de la enzima α -amilasa salival, sin una degradación proteolítica significativa (Ruiz-Ruiz, 2022). Por el contrario, en la fase gástrica (HTUFg) la banda de 35 kDa desaparece, observándose únicamente las bandas de 119 y 64 kDa. La ausencia de la banda de 35 kDa sugiere que el tratamiento con ultrasonido favoreció una mayor degradación de las proteínas, posiblemente de subunidades específicas de las globulinas de almacenamiento 11S, las cuales son susceptibles a la enzima pepsina presente en la fase gástrica.

La fase intestinal (HTUFI) mostró una única banda de 119 kDa lo cual podría corresponder a un resultado favorable ya que podría suponer que el tratamiento de ultrasonido desintegró las globulinas 11S y globulinas 7S. Aunado a esto el hecho de observar una única banda en la fase intestinal en comparación con las fases anteriores podría indicar que la mayoría de las proteínas presentes en la harina de guaje sin tratamiento fueron degradadas por la pancreatina, ya que

dicha enzima lleva a cabo la hidrólisis de las peptidasas en oligopéptidos más cortos y aminoácidos libres (García-Luna y López-Gallardo, 2007), por lo que estas proteínas pueden ser absorbidas en el intestino delgado para posteriormente entrar al torrente sanguíneo.

A la fecha, en la revisión bibliográfica no se han encontrado reportes de análisis electroforéticos (SDS-PAGE) aplicados a la evaluación de la bioaccesibilidad de las proteínas de *Leucaena leucocephala*; por lo tanto, este trabajo constituye un primer acercamiento a su caracterización. No obstante, los resultados obtenidos son consistentes con lo descrito para leguminosas afines, donde se han identificado perfiles electroforéticos que reflejan la presencia de las principales proteínas de reserva. Por ejemplo, para las proteínas extraídas de semillas de frijol de lupino, Tan-Wilson (2012) y Rodríguez-Ambríz et al. (2005) identificaron bandas entre ~37 y ~50 kDa (7S) correspondientes a las subunidades de vicilinas (7S) y constituyentes subunitarios de legumina (11S), las principales proteínas de almacenamiento que se encuentran en las semillas de las leguminosas teniendo como función la reserva de nitrógeno y aminoácidos para alimentar al embrión durante la germinación.

Por otro lado, es importante considerar que, tras el tratamiento de ultrasonido, la harina se secó a 65 °C, y de acuerdo con Quesada y Gómez (2019), al exponerse a temperaturas superiores a 60 °C se induce a la desnaturalización proteica (desplegamiento de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria), ocasionando un aumento a la accesibilidad de las proteínas y al ataque de las proteasas. Además, en las proteínas vegetales, el calor inactiva inhibidores de enzimas digestivas, por tanto, incrementa su digestibilidad hasta en un 60 a un 90 % (Thompson, 2008). Por lo tanto, es posible que el secado térmico aplicado haya sinergizado con el ultrasonido para potenciar la hidrólisis observada en el ensayo de digestibilidad *in vitro*.

En los carriles correspondientes a la semilla fresca de guaje (SF), se observan los perfiles proteicos de las fases de digestión *in vitro*. En la fase oral simulada de la semilla fresca (SFFo) se detectan tres bandas con pesos moleculares aproximadamente de ~116, ~55 y ~35 kDa, posiblemente de acuerdo con Maceda-García (2024), la banda de ~116 kDa podría corresponder a globulinas (~100 kDa), proteínas que se extraen fácilmente en soluciones salinas; esta asignación se sustenta en que las globulinas, compuestas principalmente por las familias legumina y vicilina, son las proteínas de reserva más abundantes en la muestra y su peso molecular coincide con el observado en el gel. La banda de ~55 kDa podría identificarse como albúminas, ya que, de acuerdo con Santos et al., (2014) estas proteínas solubles en agua y clasificables como enzimas, inhibidores de enzimas o lectinas suelen presentarse alrededor de los ~50 kDa. Estos resultados concuerdan con lo indicado por Djoullah et al., (2018) quienes

señalan que las leguminosas se componen principalmente de estas dos fracciones proteicas: albúminas (~50 kDa) y globulinas (~100 kDa). En la fase gástrica (SSFg), se observan dos bandas de ~116 y ~52 kDa. La desaparición de la banda de ~35 kDa, presente en la fase oral, sugiere que la pepsina gástrica y las condiciones ácidas de esta fase contribuyen a la desintegración de subunidades proteicas, posiblemente la subunidad ácida de las globulinas 11S. Finalmente, en la fase intestinal (SSFi) solo se detecta una banda con un peso molecular de ~116 kDa, dicha banda podría corresponder a fracciones remanentes de globulinas, dada la coincidencia de su peso molecular (~100 kDa). La notable reducción en la cantidad de bandas en comparación con las fases anteriores indica que la mayoría de las proteínas de la semilla fresca fueron degradadas por la acción de la pancreatina. Esta enzima hidroliza los péptidos en oligopéptidos más cortos y aminoácidos libres (García-Luna y López-Gallardo, 2007), lo que permite su absorción en el intestino delgado y su posterior incorporación al torrente sanguíneo.

En conjunto, los resultados del SDS-PAGE demuestran que el tratamiento con ultrasonido, probablemente en sinergia con el secado térmico, altera el perfil proteico de la harina de guaje durante la digestión *in vitro*, observándose una degradación más pronunciada de las subunidades de vicilina (7S) y legumina (11S), en comparación con la harina sin tratar. Esto sugiere una mejora en la bioaccesibilidad de las proteínas, lo que podría tener un impacto positivo en su valor nutricional. La confirmación definitiva de estas hipótesis requiere de técnicas de identificación directa como la espectrometría de masas.

Capítulo 5. Conclusiones.

En el presente estudio se evaluó el efecto de los tratamientos de ultrasonido, hervido y horneado sobre el contenido de mimosina en la semilla de guaje (*Leucaena leucocephala*), así como el impacto en la bioaccesibilidad proteica. El análisis proximal de la harina de semilla de guaje procedente de la región Mixteca reveló una composición destacada, 73.206 ± 0.107 % de humedad, 4.532 ± 0.014 % de lípidos y 31.825 ± 0.554 % de proteína. Este último confirma su potencial como fuente alternativa de este macronutriente, por lo que su incorporación en alimentos podría contribuir a mitigar problemas de desnutrición en poblaciones vulnerables, gracias a su alto contenido proteico. El ultrasonido durante 30 minutos se estableció como el método más efectivo de acuerdo con el análisis estadístico, al demostrar un efecto dual significativo: por un lado, redujo la mimosina a 77.2550 ± 1.0431 mg/mL, el valor más bajo registrado, y por otro, preservó el contenido proteico en niveles comparables al tratamiento de máximo contenido proteico (ultrasonido 20 minutos). Este equilibrio es crucial para mejorar la calidad nutricional del ingrediente.

La relevancia de este hallazgo se corrobora con el análisis de bioaccesibilidad, donde la harina tratada con ultrasonido (30 min) mostró que el 83.207 % de sus proteínas totales son bioaccesibles en el intestino delgado. Esto no solo valida la eficacia del tratamiento, sino que confirma que las proteínas, además de conservarse, están disponibles para ser absorbidas por el organismo. Estos resultados constituyen una contribución original al conocimiento científico, al ser los primeros en establecer el uso del ultrasonido para desintoxicar la semilla de guaje y cuantificar su impacto en la bioaccesibilidad proteica mediante pruebas *in vitro*. En consecuencia, este trabajo posiciona a la harina de *Leucaena leucocephala* como un ingrediente prometedor para las industrias nutraceutica y de alimentos, proponiendo al ultrasonido como una tecnología innovadora y sostenible para su procesamiento.

En perspectiva, esta investigación establece los fundamentos para futuros estudios orientados al escalamiento industrial del proceso y a la incorporación de esta harina en formulaciones alimentarias específicas. De esta manera, no solo se incentiva la revalorización de esta semilla ancestral mexicana, sino que se abre una vía para el aprovechamiento integral de un recurso subutilizado con alto potencial nutricional.

Capítulo 6. Perspectivas.

Derivado de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se proponen las siguientes perspectivas de investigación:

*Evaluación de las propiedades tecno-funcionales de la harina de guaje (*L. leucocephala*) sometida a ultrasonido.*

Sería conveniente determinar el efecto del tratamiento ultrasónico (30 min) sobre propiedades como capacidad de absorción de agua y aceite, capacidad emulsificante y formación de espuma. Estas propiedades son determinantes para el posible uso de la harina como ingrediente en matrices alimentarias (panificación, cárnicos emulsionados, salsas). Dado que el ultrasonido puede inducir desplegamiento parcial de proteínas y exposición de grupos hidrofóbicos o hidrofílicos, se espera que modifique dichas propiedades. Comparar la harina tratada frente a la no tratada permitirá establecer si el ultrasonido mejora su desempeño tecno-funcional o, por el contrario, lo compromete.

Determinación del perfil completo de aminoácidos de la harina de guaje sometida a ultrasonido.

Si bien la bioaccesibilidad proteica fue evaluada *in vitro* en este trabajo, se desconoce si el tratamiento ultrasónico afecta la composición aminoacídica cualitativa y cuantitativa. Un perfil completo de aminoácidos (incluyendo esenciales como lisina, metionina, triptófano y aminoácidos azufrados) permitiría: identificar posibles pérdidas selectivas de aminoácidos termosensibles u oxidables tras el tratamiento, calcular puntajes químicos de aminoácidos y compararlos con patrones de referencia (FAO/WHO) o determinar si el tratamiento mejora o reduce la calidad nutricional proteica más allá de la digestibilidad.

Desarrollo de un snack incorporando harina de guaje tratada por ultrasonido.

Se propone formular un producto de matriz sólida (tipo barra, galleta o extruido) que contenga la harina tratada. En el producto terminado deberán evaluarse: atributos fisicoquímicos (humedad, actividad de agua, pH), perfil de textura (dureza, fracturabilidad, adhesividad), aceptabilidad sensorial (prueba hedónica con consumidores) y estabilidad durante el almacenamiento acelerado (hasta 90 días, midiendo oxidación lipídica y crecimiento microbiano). Esto permitirá conocer el comportamiento real de la harina tratada en un sistema alimentario complejo.

Estudio de biodisponibilidad in vivo en modelo murino para la harina tratada por ultrasonido.

Como complemento a los ensayos de bioaccesibilidad *in vitro* realizados en esta tesis, se recomienda un estudio en modelo murino (rata o ratón) que permita medir: digestibilidad proteica real (coeficiente de digestibilidad aparente y verdadera), absorción de minerales (especialmente hierro, zinc y calcio, ya que las leguminosas suelen presentar factores antinutricios que los quelan) y marcadores de toxicidad hepática (transaminasas ALT, AST) y renal (creatinina, BUN).

Este enfoque *in vivo* validará los hallazgos *in vitro* y aportará evidencia sobre la seguridad del consumo de harina de guaje tratada por ultrasonido, aspecto crítico considerando la posible presencia de alcaloides (como la mimosina) característicos de esta especie.

7. Referencias.

- Aderibigbe, S. A., Adetunji, O. A., & Odeniyi, M. A. (2011). Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit (Leguminosae). *African Journal of Biomedical Research*, 14(1), 63-68.
- Aderinola, T. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., & Aluko, R. E. (2022). *In vitro* digestibility and antioxidant properties of albumin, globulin and glutelin protein fractions of *Leucaena leucocephala* seed. *Food Production, Processing and Nutrition*, *4*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00090-4>
- Akchaya, K., Parasuraman, P., Pandian, K., Vijayakumar, S., Thirukumaran, K., Mustaffa, M. R. A. F., Rajpoot, S. K., & Choudhary, A. K. (2025). Boosting resource use efficiency, soil fertility, food security, ecosystem services, and climate resilience with legume intercropping: a review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *9*, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2025.1518492>
- Almeida-Costa, G. E., Queiroz-Monici, K. S., Pissini-Machado, Reis, S. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea, and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>
- Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. *Molecules*, 25(19), 4479.
- Aquino-González, L. V., Noyola-Altamirano, B., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez, J., Sandoval-Torres, S., & Bernal, L. G. B. (2023). Potential of *Leucaena leucocephala* and *Leucaena esculenta* seeds in human nutrition: Composition, techno-functional properties, toxicology and pretreatment technologies. *Legume Research*, 46(10), 1261-1270.
- Astiasarán, I., & Martínez, J. A. (2000). *Alimentos: Composición y propiedades*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos* (5ª ed.). Pearson.
- Balderas-León, I. (2020). *Valorization of the Leucaena leucocephala protein by assessing its functional properties and production of bioactive peptides* [Tesis doctoral, School of Engineering and Sciences]. Repositorio institucional <https://repositorio.universidad.edu/12345>.

Balderas-León, I., Baigts-Allende, D., & Cardador-Martínez, A. (2021). Actividad antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y de la α -amilasa de hidrolizados proteicos de semillas de *Leucaena leucocephala*. *CyTA - Journal of Food*, *19*(1), 349–359. <https://doi.org/10.1080/19476337.2021.1909144>

Baltazar, S. (1991). *Resistencia a las bajas temperaturas de las plantas de Leucaena sp. bajo condiciones de laboratorio* [Tesis profesional]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Barreto, G. S. C., Vanderlei, F. M., Vanderlei, L. C. M., & Leite, Á. J. M. (2016). Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children. *Jornal de Pediatria*, 92(6), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.03.008>

Beebe, S., Rao, I. M., Blair, M. W., & Acosta-Gallegos, J. A. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*, 4, 35. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00035>

Bohn, T., Carrière, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Ménard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutellier, V., Wooster, T. J., Lesmes, U., ... Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion: What can we predict with

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Bravo-Delgado, H.R., Jiménez-Castillo, S.F., Meza-Álvarez, L.I., Arangute-Zárate, A., Nieva-Vázquez, A. (2019). Propiedades funcionales, capacidad antioxidante de la harina de guaje (*Leucaena leucocephala*) y su uso en la industria alimentaria. *Revista Tecnológica Agrobioalimentaria*, 3, 1.

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Bunch, R. M. (2021). *Optical systems design detection essentials: Radiometry, photometry, colorimetry, noise, and measurements*. IOP Publishing.

- Bücker-Neto, L., Paiva, A. L. S., Machado, R. D., Arenhart, R. A., & Margis-Pinheiro, M. (2017). Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1 suppl 1), 373–386. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0087>
- Cabrera-Núñez, A., Lammoglia-Villagomez, M., Alarcón-Pulido, S., Martínez-Sánchez, C., Rojas-Ronquillo, R., & Velázquez-Jiménez, S. (2019). Fodder trees and shrubs used to feed cattle in northern Veracruz, Mexico. *Abanico Veterinario*, 9, 1-12.
- Carrete, F. O., & Eguiarte Vazquez, J. A. (1986). Performance of Cebu/European calves in associated star grass *Leucaena* prairies during dry season. *Técnica Pecuaria en México*, 51, 1-10.
- Casas, A. (1992). *Etnobotánica y procesos de domesticación en Leucaena esculenta* (Moc. et Sesse ex A.D.C.) Benth [Tesis doctoral]. Universidad Nacional Autónoma de México. https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/DGB_UNAM/TES01000182289/3/0182289.pdf
- Chowdhury, A. R., Banerji, R., Misra, G., & Nigam, S. K. (1984). Studies on leguminous seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(6), 1023-1024. Dadi, M., & Yasir, M. (2022). Spectroscopy and spectrophotometry: Principles and applications for colorimetric and related other analysis. *Colorimetry*, 1, 81-102.
- Das, G., Sharma, A., & Sarkar, P. K. (2022). Conventional and emerging processing techniques for the post-harvest reduction of antinutrients in edible legumes. *Applied Food Research*, 2(1), 100112. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100112>
- De Angelis, A., Gasco, L., Parisi, G., & Danieli, P. P. (2021). A multipurpose leguminous plant for the Mediterranean countries: *Leucaena leucocephala* as an alternative protein source: A review. *Animals*, 11(8), 2230. <https://doi.org/10.3390/ani11082230>
- De Oliveira, J. P., de Araújo, E. C., de Almeida, F. L. C., da Silva, I. S., de Almeida, J. M., & de Almeida, P. F. (2018). *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed: A new source of galactomannan for the food and pharmaceutical industries. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(12), 5065–5073. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3453-y>
- Dey, S., Saxena, A., Kumar, Y., Maity, T., & Tarafdar, A. (2022). Understanding the antinutritional factors and bioactive compounds of kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) and little millet

(*Panicum sumatrense*). *Journal of Food Quality*, 2022, Article 1578448, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2022/1578448>

Dewick, P. M. (2009). *Productos naturales medicinales: Un enfoque biosintético*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>

Djoullah, A., Husson, F., & Saurel, R. (2018). Gelation behaviors of denatured pea albumin and globulin fractions during transglutaminase treatment. *Food Hydrocolloids*, *77*, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.005>

Eguiarte, V., Tejeida, B., Jiménez, R., & Betancour, R. (1984). *Conozca y aproveche la Leucaena para alimentar a sus vacas*. Boletín Técnico INIF-SARH.

Esquivel Méndez, V. (2024). Bioaccesibilidad y actividad biológica de compuestos fenólicos en higos e infusiones de hojas de *Ficus carica* L. durante la digestión gastrointestinal simulada [Tesis de maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio Digital UV. <https://cdigital.uv.mx/server/api/core/bitstreams/a10cda6c-baee-494d-9fa5d669e544f471/content>

Fernandes, G. M., Silva, W. R., Barreto, D. N., Lamarca, R. S., Gomes, P. C. F. L., da S. Petrucci, J. F., & Batista, A. D. (2020). Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1135, 187–203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.011>

Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.11.001>

Ferreira, T., Soares, B., & Cardoso, J. (2019). *Factores que afectan la calidad fisiológica de semillas de leguminosas*. *Revista de Investigación en Agricultura*, 45(2), 112–125.

Ferreira-Santos, P., Ibarz, R., Fernandes, J. M., Pinheiro, A. C., Botelho, C., Rocha, C. M. R., Teixeira, J. A., & Martín-Belloso, O. (2021). Encapsulated pine bark polyphenolic extract during gastrointestinal digestion: Bioaccessibility, bioactivity and oxidative stress prevention. *Foods*, 10(2), 328. <https://doi.org/10.3390/foods10020328>

Field, A. (2018). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (5.^a ed.). Sage Publications.

Field, A. (2009). *Discovering statistics using SPSS* (3rd ed.). London: SAGE Publications Ltd. https://books.google.com.mx/books?id=a6FLF1YOqtsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Galindo, J., Geerken, C. M., Elías, A., Aranda, N., Piedra, R., Chongo, B., Delgado, D., Aldama, A. I., & Marrero, Y. (1995). Bacterias que degradan la mimosina, el 2,3-dihidroxipiridona y el 3-hidroxi-4(1H)-piridona, en el rumen. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 29(1), 53-60.

García, K., Datt, Y., & Zimmermann, S. D. (2020). The role of mycorrhizal associations in plant aluminum resistance. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 562785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562785>

García Maceda, G. (2019). *Desarrollo de una harina de semilla de guaje (Leucaena esculenta) para uso alimenticio* [Tesis de maestría]. Universidad de Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/e419fa1f-ef16-483d-ab7f-b33259742229/content>

García Pinedo, G. A. (2022). *Bioaccesibilidad de proteínas* [Tesis de suficiencia profesional, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. Repositorio institucional UNAP.

Gong, H., Zhang, S., Li, Q., Yang, L., & Li, M. (2022). Recent advances in the fabrication, properties, and applications of galactomannan-based materials. *Carbohydrate Polymers*, 276, 118738. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118738>

González-Pérez, S., & Arellano, J. B. (2009). Vegetable protein isolates. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (pp. 383-419). Woodhead Publishing.

Gropper, SAS, & Smith, JL (2013). *Nutrición y metabolismo humano*. Cengage Learning.

Hertzler, S. R., Lieblein-Boff, J. C., Weiler, M., & Allgeier, C. (2020). Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. *Nutrients*, 12(12), 3704. <https://doi.org/10.3390/nu12123704>

Honda, M. D. H., & Borthakur, D. (2021). Mimosine is a stress-response molecule that serves as both an antioxidant and osmolyte in giant leucaena (*Leucaena leucocephala* subsp. *glabrata*) during environmental stress conditions. *Plant Stress*, 2, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100015>

Hunter, R. S. (1942). *Photoelectric color difference meter*. Journal of the Optical Society of America, 32(9), 509–538. <https://doi.org/10.1364/JOSA.32.000509>

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. (2020). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2020: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier* (Brief No. 56). ISAAA. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/56/>

Ketel, E. C., Aguayo-Mendoza, M. G., de Wijk, R. A., de Graaf, C., Piqueras-Fiszman, B., & Stieger, M. (2019). Age, gender, ethnicity and eating capability influence oral processing behaviour of liquid, semi-solid and solid foods differently. *Food Research International*, *119*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.048>

Ilo, S., & Berghofer, E. (1999). Kinetics of colour changes during extrusion cooking of maize grits. *Journal of Food Engineering*, 39(1), 73-80. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00141-0)

Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current *vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>

Lucas González, R. (2017). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista Doctorado UHM*, 2(2), 5. <https://doi.org/10.21134/doctumh.v2i2.1278>

Khalid, S., *et al.* (2025). Ultrasound-assisted extraction with deep eutectic solvents for valorization of agro-food waste: A sustainable and eco-friendly approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, *107500*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107500>

Machado, M., Queiroz-Machado, C. R. R., Gardner, D. R., Castro, M. B., Câmara, A. C. L., Pimentel, L. A., Galiza, G. J. N., & Riet-Correa, F. (2024). *Leucaena leucocephala* toxicity in Brazilian horses. *Toxicon*, 240, 107655. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107655>

Makkar, H. P. S. (2006). Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. *BSAP Occasional Publication*, *30*(1), 127–136. <https://doi.org/10.1017/S0263967X00043845>

Martínez-Pérez, A., López, P. A., Gil-Muñoz, A., & Cuevas-Sánchez, J. A. (2012). Plantas silvestres útiles y prioritarias identificadas en la Mixteca Poblana, México. *Acta Botánica Mexicana*, 98, 73-98.

Mathur, M., & Mathur, P. (2025). Restoration of saline and sodic soil through using halophytes as agroforestry components. *Journal of Environmental Management*, 280, 111682. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111682>

- Maity, S., Firdous, S. M., & Debnath, P. (2014). *Leucaena leucocephala* seeds: A promising source of antioxidant and antimicrobial agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(Suppl 1), S398-S405. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C103>
- Maity, P., Sen, I. K., Chakraborty, I., & Islam, S. S. (2021). Structural characterization and antioxidant properties of a galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. *International Journal of Biological Macromolecules*, *168*, 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.056>
- Martínez, J. D., Martínez, N. Y., & Rodríguez, R. (2013). Efecto de tratamientos térmicos sobre el contenido de mimosina en semillas de *Leucaena leucocephala*. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 14(1), 29-35.
- Milde, L. B., González, K. G., Valle Urbina, C., & Rybak, A. (2009). Pan de fécula de mandioca con leche: Comportamiento físico al adicionar un emulsionante. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 11, 4-8.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., & Brodkorb, A. (2014). A standardized static in vitro digestion method suitable for food: An international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., MacKie, A., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5(6). <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Montalvo-Navarro, C. A., & Lugo-Flores, M. A. (2019). Electroforesis: Fundamentos, avances y aplicaciones. *EPISTEMUS*, 13(26), 48-54. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v13i26.96>
- Mora-Villa, A., Serrano-Parrales, R., Lira-Saade, R., Jiménez-Estrada, M., & Hernández-Delgado, T. (2021). Evaluation of the antimicrobial activity of *Leucaena esculenta* and *Leucaena leucocephala* seed collected from Tlayacapan, Morelos (Mexico). *Polibotánica*, 52, 175-191.
- Moradi, S., Gholami, H., Karami, C., Farhadian, N., Balaei, F., Ansari, M., & Shahlaei, M. (2020). A study on the protease activity and structure of pepsin in the presence of atenolol and diltiazem. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2855–2868. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.118>.

Multescu, M., Culetu, A., & Susman, I. E. (2024). Screening of the nutritional properties, bioactive components, and antioxidant properties in legumes. *Foods*, 13(22), 3528. <https://doi.org/10.3390/foods13223528>

National Academy of Sciences. (1977). *Leucaena: Promising forage and tree crops for the tropics*. National Academy of Sciences.

Nielsen, S. S. (Ed.). (2017). *Food analysis* (5th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>

Nwe, Y. W., Nyunt, W., Mar, M. N., Win, M., Saw, H. M., & Myint, K. (2001). Antibacterial activity of selected Myanmar medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 51-56. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00268-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00268-1)

Noyola Altamirano, B. (2024). *Hidrolizados con potencial antioxidante y antidiabético derivados de semilla de guaje (Leucaena esculenta)* [Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca].

Ohno, Y. (2017). Basic concepts of photometry, radiometry, and colorimetry. In J. P. Dakin & R. G. W. Brown (Eds.), *Handbook of optoelectronics* (pp. 265-279). CRC Press.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. & Simons, A. (2009). *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0*. World Agroforestry Centre. <http://apps.worldagroforestry.org/treedb2/>

Park, E., Cho, M., & Ki, C. S. (2009). Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(1), 1-9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>

Peoples, M. B., Giller, K. E., Jensen, E. S., & Herridge, D. F. (2021). Rhizobial–Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability. *Frontiers in Agronomy*, *3*, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.687873>

Peralta-Juárez, I., Gómez-Campos, A., Romero-Castillo, P. A., & Reyes-Dorantes, A. (2017). Anthropocentric use of the guaje (*Leucaena esculenta*) in two communities in the Mixteca Baja region of Oaxaca, Mexico. *Polibotánica*, 43, 349-364.

Pérez-Reyes, M. E., & Sosa-Morales, M. E. (2013). Mecanismos de transferencia de calor que ocurren en tratamientos térmicos de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 37-47.

Quinga Paucar, M. A. (2017). *Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Fríjol (Vigna unguiculata L.) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-HPLC* [Trabajo de titulación, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional UTA. [<https://repositorio.uta.edu.ec/items/4be7c8e7-f0a9-4240-947f-a7743144237e>].

Quintero Quiroz, J. (2019). *Evaluación de proteínas aisladas de fuentes vegetales como agentes encapsulantes del extracto de semillas de annatto* [Tesis de doctorado, Universidad de Antioquia]. Repositorio Institucional de la Universidad de Antioquia. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/15989/2/QuinteroJulian_2020_ProteinasEncapsulaci%C3%B3nAnnatto.pdf.

Ramírez Ojeda, A. M. (2021). *Bioaccesibilidad de elementos inorgánicos en leguminosas y potitos ecológicos de base vegetal* [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba].

Ramírez, R., Camilo, A., & Rengifo Velandia, E. A. (2021). Evaluación de los métodos de extracción de compuestos fenólicos (antocianinas) a partir del fruto del corozo (*Bactris guineensis*). *Revista Colombiana de Química*, 50(1), 23-31.

Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2003). Regeneration and genetic transformation of tree legumes with special reference to *Leucaena* species. In P. K. Jaiwal & R. P. Singh (Eds.), *Applied genetics of leguminosae biotechnology* (pp. 301-326). Springer.

Rao, G. N., Nagender, A., Satyanarayana, A., & Rao, D. G. (2011). Preparation, chemical composition, and storage studies of quamachil (*Pithecellobium dulce* L.) aril powder. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 90-95. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0135-9>

Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.

Reyes Salvador, D. E. (2025). *Efecto del proceso de secado sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y antinutrientes presentes en la harina de vaina de haba (Vicia faba L.)* [Trabajo de Fin de Grado, Universitat Politècnica de València]. RiuNet. <https://riunet.upv.es>

Rivera-Díaz, A. (2012). Aprovechamiento integral de variedades de *Leucaena* para la obtención de productos de alto valor añadido y compost* [Tesis doctoral, Universidad Internacional de Andalucía]. Repositorio Institucional. <https://ejemplo.com/url>

Rivera-Dommarco, J. A., Cuevas-Nasu, L., Bonvecchio-Arenas, A., Unar-Munguía, M., Gómez-Acosta, L. M., Muñoz-Espinosa, A., García-Feregrino, R., Ávila-Arcos, M. A., Méndez-Gómez-

Humarán, I., Ávila-Curiel, A., Galindo-Gómez, C., & Shamah-Levy, T. (2024). Malnutrición en menores de cinco años en México. Análisis de las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición 1988-2023. *Salud Pública de México*, *66*(4), 395-403. <https://doi.org/10.21149/15864>

Rodríguez-Ambriz, S. L., Martínez-Ayala, A. L., Millán, F., & Dávila-Ortiz, G. (2005). Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6835-z>

Robles, A. G. (1990). *Leucaena: Árbol de uso múltiple (Estudio de caso en el Oriente del Estado de Morelos)* [Tesis profesional]. Universidad Autónoma Chapingo.

Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Biotecnia*, 18(3), 3-8.

Rocchetti, G., Gregorio, R. P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Oliveira, P. G., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Mosele, J. I., Motilva, M., Tomas, M., Patrone, V., Capanoglu, E., & Lucini, L. (2022). Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811–842. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12921>

Rosa, G. P., Barreto, M. D. C., Pinto, D. C. G. A., & Seca, A. M. L. (2020). A green and simple protocol for extraction and application of a peroxidase-rich enzymatic extract. *Methods and Protocols*, 3(2), 25. <https://doi.org/10.3390/mps3020025>

Ruiz, R. R. I. (2022). Determinación de la vida de anaquel y bioaccesibilidad de la proteína del cereal de desayuno enriquecido con *Moringa oleifera* (Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de la Mixteca). Repositorio Institucional UTM.

Samtiya, M., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>

Santos, E. M., Quintanar-Guzmán, A., Solorza-Feria, J., Sánchez-Ortega, I., Rodríguez, J. A., & Wang, Y.-J. (2014). Thermal and rheological properties of masa from nixtamalized corn subjected to a sequential protein extraction. *Journal of Cereal Science*, *60*(3), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.08.008>

Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>

Serfling, R. (2002). Funciones cuantiles para análisis multivariante: Enfoques y aplicaciones. *Statistica Neerlandica*, 56(2), 214-232. <https://doi.org/10.1111/1467-9574.00194>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2024). Anuario estadístico de la producción agrícola: Guaje. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. https://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/

Sethi, P., & Kulkarni, P. R. (1995). *Leucaena leucocephala*: A nutritional profile. *Food and Nutrition Bulletin*, 16(3), 1–16. <https://doi.org/10.1177/156482659501600307>

Sharma, R., Kaur, R., & Kaur, S. (2021). A comprehensive review on the morphology, propagation, and ethnobotanical uses of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Applied and Natural Science*, *13*(2), 480-489. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i2.2684>

Shavanov, M. V. (2021). The role of food crops within the Poaceae and Fabaceae families as nutritional plants. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 624, p. 012111). IOP Publishing.

Shlyannikov, V. (2016). Nonlinear stress intensity factors in fractured mechanics and their applications. *Procedia Structural Integrity*, 2, 744-752. <https://doi.org/10.1016/j.prostr.2016.06.096>

Shrestha, Y. K., & Shrestha, S. K. (2023). Fundamentals of colorimetry. In *Advances in colorimetry*. Intechopen.

Slogar España. (2017, 15 de noviembre). Casa Pía. Los aminoácidos – Información completa. Madrid, España. <https://dietetica.casapia.com/los-aminoacidos/los-aminoacidos-informacion-completa.html>

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., & Varshney, R. K. (2014). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>

Syamsudin, A. (2010). Standardization of extract of *Leucaena leucocephala* (Imk) De Wit seeds by β -glucosidase inhibitor. *International Journal of Phytomedicine*, 2(4), 345-350.

- Tan-Wilson, A. L., & Wilson, K. A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 140–153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x>
- Tas, A. (2021). La sustitución de cereales por legumbres en los snacks extruidos: Ciencia, tecnología y retos. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 701-711. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.001>
- Thakur, S., Pandey, A. K., Verma, K., Shrivastava, A., & Singh, N. (2023). Plant-based protein as an alternative to animal proteins: A review of sources, extraction methods and applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(4), 1666-1683. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16663>
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5(2), 99-114. <https://doi.org/10.2307/3001913>
- U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. (2024). *Oilseeds: World Markets and Trade*. USDA. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>
- Valdez-Hernández, J. I., González, E. C., Cetina-Alcalá, V. M., López-Aparicio, J., & Martínez-Trinidad, T. (2017). Fenología reproductiva de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en un agostadero del centro de Veracruz. *Agrociencia*, 51*(2), 215-229.
- Vilas-Boas, A. A., Oliveira, A., Jesus, D., Rodrigues, C., Figueira, C., Gomes, A., & Pintado, M. (2020). Chlorogenic acids composition and the impact of in vitro gastrointestinal digestion on espresso coffee from single-dose capsule. *Food Research International*, 134, 109223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109223>.
- Walson, J. L., & Berkley, J. A. (2018). The impact of malnutrition on childhood infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(3), 231-236. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000448>.
- Whitney, E. & Rolfes, S. R. (2011). *Understanding nutrition* (13th ed.). Cengage Learning.
- Wiesinger, J. A., Cichy, K. A., Hooper, S. D., Hart, J. J., & Glahn, R. P. (2020). Processing white or yellow dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) into a heat-treated flour enhances the iron bioavailability of bean-based pastas. *Journal of Functional Foods*, 71, 104018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104018>
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53*(8), 952–958. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800193>

Xavier, AA, y Mariutti, LR (2021). Métodos de digestión in vitro estáticos y semidinámicos: estado del arte y avances recientes hacia la estandarización. *Current Opinion in Food Science*, 41, 260-273.

Yadav, S., Mishra, S., & Pradhan, R. C. (2021). Ultrasound-assisted hydration of finger millet (*Eleusine coracana*) and its effects on starch isolates and antinutrients. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105542. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105542>

Zárate, P. S. (1982). *Las especies de Leucaena Benth de Oaxaca con notas sobre la sistemática del género para México* [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Zárate, S. (1994). Revisión del género *Leucaena* Benth. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 65(2), 83-162.

Zhu, K. X., Sun, X. H., & Zhou, H. M. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.06.006>

8. Anexos.

Anexo A. Resultados de las metodologías 3.4 y 3.5.

Tabla 19. Contenido de proteína de la semilla de guaje sometida a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Condiciones	Proteína (%)	
		Método Kjeldahl	Método Bradford
Horneado	T ₁	32.3361 ± 0.3852	28.7155 ± 0.0420
	T ₂	32.9458 ± 0.3422	28.9535 ± 0.0357
	T ₃	33.6021 ± 0.2579	30.9952 ± 0.1450
Hervido	T ₁	32.6980 ± 0.1234	28.9881 ± 0.0854
	T ₂	31.9273 ± 0.0802	28.3497 ± 0.0232
	T ₃	31.3468 ± 0.0788	26.6334 ± 0.0386
Ultrasonido	T ₁	32.2378 ± 0.3803	30.5999 ± 0.0138
	T ₂	33.6776 ± 0.3958	31.6980 ± 0.0464
	T ₃	32.3277 ± 0.2807	30.6079 ± 0.0106

Donde: horneado T₁: es el tratamiento a 10 minutos, T₂: tratamiento a 8 minutos y T₃: tratamiento a 5 minutos; en hervido T₁: es el tratamiento a 10 minutos, T₂: tratamiento a 20 minutos y T₃: tratamiento a 35 minutos y en ultrasonido: T₁: es el tratamiento a 10 minutos, T₂: tratamiento a 20 minutos y T₃: tratamiento a 30 minutos

Anexo B.

Resultados de la comparación de los parámetros del color de la semilla de guaje de los diferentes tratamientos

Tabla 20. Comparación de los parámetros del color de la semilla de guaje de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Condiciones	Color				
		L*	a*	b*	C*	h*
Semilla	Fresca	50.995 ± 0.302	-8.260 ± 0.191	31.193 ± 0.977	32.290 ± 0.946	105.005 ± 0.682
Harina	-	60.580 ± 0.012	-2.220 ± 0.010	28.800 ± 0.020	28.890 ± 0.020	94.410 ± 0.020
Horneado	T ₁	61.740 ± 0.000	-2.470 ± 0.017	28.710 ± 0.020	28.817 ± 0.021	94.917 ± 0.029
	T ₂	63.900 ± 0.000	-2.520 ± 0.001	28.633 ± 0.041	28.797 ± 0.015	95.013 ± 0.020
	T ₃	67.036 ± 0.005	-2.080 ± 0.001	28.050 ± 0.010	28.127 ± 0.005	94.246 ± 0.005
Hervido	T ₄	62.560 ± 0.010	-2.030 ± 0.021	30.450 ± 0.001	30.520 ± 0.004	86.180 ± 0.034
	T ₅	63.030 ± 0.012	-1.960 ± 0.036	30.120 ± 0.008	30.180 ± 0.028	86.280 ± 0.019
	T ₆	63.810 ± 0.016	-2.240 ± 0.042	31.730 ± 0.014	31.810 ± 0.018	85.970 ± 0.011
Ultrasonido	T ₇	59.240 ± 0.014	-0.320 ± 0.010	27.640 ± 0.034	27.640 ± 0.001	90.660 ± 0.019
	T ₈	61.330 ± 0.021	-0.560 ± 0.001	27.890 ± 0.037	27.890 ± 0.012	91.140 ± 0.032
	T ₉	56.840 ± 0.024	-0.780 ± 0.024	25.750 ± 0.029	25.760 ± 0.026	91.730 ± 0.021

Donde: L*: luminosidad, de 0 (oscuros) a 100 (claros); a*: rojo (a+) a verde (-a); b*: amarillo (b+) a azul (b-); c*: cromaticidad y h*: tono, 0- 360 °. Valores medios ± desviación estándar. Donde: horneado T₁: es el tratamiento a 10 minutos, T₂: tratamiento a 8 minutos y T₃: tratamiento a 5 minutos; en hervido T₄: es el tratamiento a 10 minutos, T₅: tratamiento a 20 minutos y T₆: tratamiento a 35 minutos y en ultrasonido: T₇: es el tratamiento a 10 minutos, T₈: tratamiento a 20 minutos y T₉: tratamiento a 30 minutos.

Anexo C. Análisis de normalidad de los datos del contenido de proteína.

La prueba de Shapiro-Wilk es una prueba estadística utilizada para evaluar si una muestra de datos proviene de una distribución normal. Es especialmente útil para muestras pequeñas, es decir menos de 50 observaciones. Se comienza elaborando dos hipótesis, la primera es la hipótesis nula (H_0) en donde se sugiere que los datos siguen una distribución normal. Y la segunda hipótesis la cual es la hipótesis alternativa (H_1) en donde los datos no siguen una distribución normal.

Si el valor de *p-valor* es mayor que el nivel de significancia (en este caso Alpha = 0.05), no se rechaza la hipótesis nula. Sugiriendo que los datos analizados siguen una distribución normal y por el contrario se acepta la H_a la cual nos indica que los datos no siguen una distribución normal.

De acuerdo con la Tabla 20. El *p-valor* es mayor al nivel de significancia del 0.05 en los tres tratamientos lo que indica que los resultados analizados para el contenido de mimosina presentan una distribución normal ya que el *p-valor* en los tres tratamientos es mayor al nivel de significancia (Alpha de 0.05).

Tabla 21. Análisis de Datos

Tratamiento	Media	Desv. Estándar	N
Horneado	23.1374	4.73680	9
Hervido	27.9144	1.16252	9
Ultrasonido	30.9681	0.59393	9

Tabla 22. Prueba univariante del estadístico Shapiro-Wilk.

	Variable	Estadística	P – valor
1	Horneado	0.9371	0.5522
2	Hervido	0.9105	0.3195
3	Ultrasonido	0.9094	0.3115

Computed by R MVN package, version 5.9.

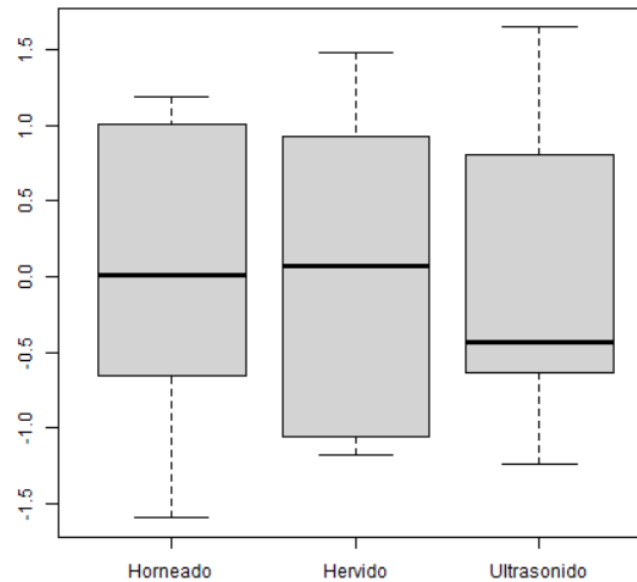


Figura 21. Diagrama de caja y bigote de los tratamientos de hervido, horneado y ultrasonido del contenido de proteína.

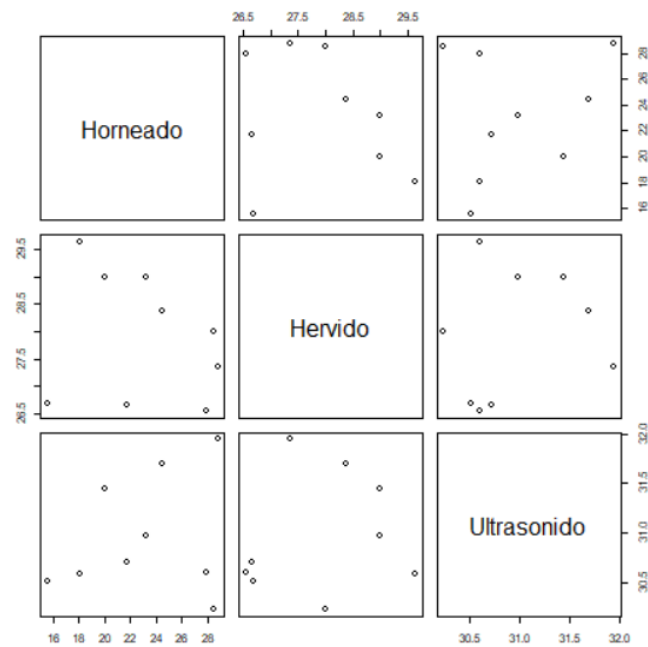


Figura 22. Distribución de los datos para tratamientos de hervido, horneado y ultrasonido del contenido de proteína.

Tabla 23. Análisis de la normalidad de los datos de los diferentes tratamientos sobre el contenido de proteína.

Descriptive Statistics										
	n	Mean	Std.Dev.	Median	Min	Max	25th	75th	Skewness	Kurtosis
Horneado	9.000	23.137	4.737	23.180	15.582	28.780	20.042	27.923	-.156	-1.591
Hervido	9.000	27.914	1.163	27.995	26.545	29.642	26.684	28.991	.081	-1.778
Ultrasonido	9.000	30.968	.594	30.711	30.229	31.948	30.593	31.447	.436	-1.531

Variables are not standardized

Univariate Tests				
	Variable	Test	Statistic	P Value
1	Horneado	Shapiro-Wilk	0.9371	0.5522
2	Hervido	Shapiro-Wilk	0.9094	0.3115
3	Ultrasonido	Shapiro-Wilk	0.9105	0.3195

Computed by R MVN package, version 5.9

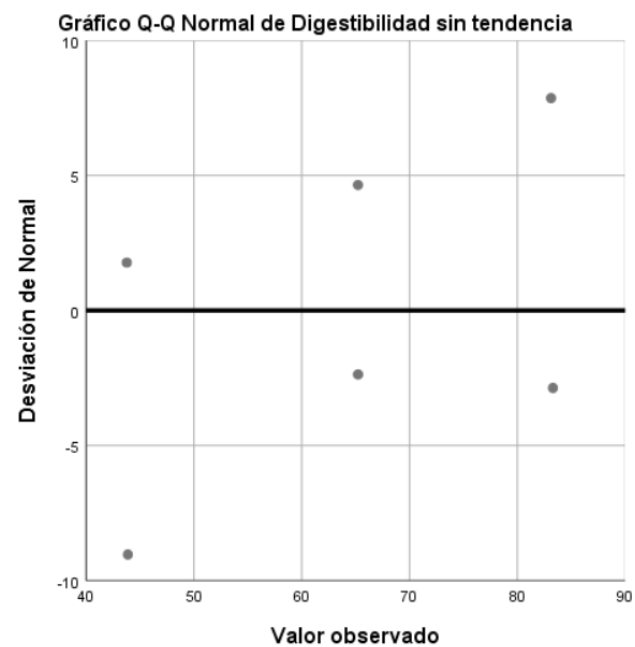
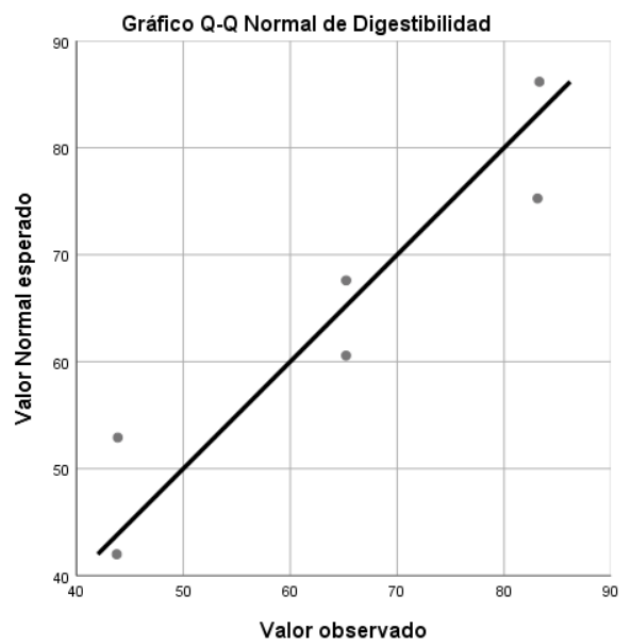


Figura 23. Gráficos de Q-Q para el contenido de proteína.

ANEXO D.

Análisis de normalidad para los datos del contenido de mimosina de los diferentes tratamientos.

Factores intra-sujetos			
Medida: contenido_mimosina			
	Variable dependiente		
tratamientos			
1	Hervido		
2	Horneado		
3	Ultrasonido		

Estadísticos descriptivos			
	Media	Desv. Desviación	N
Hervido	123.0594	8.42740	18
Horneado	128.8900	11.64228	18
Ultrasonido	84.9800	6.96600	18

Figura 24. Resultados del análisis de normalidad para los diferentes tratamientos.

Prueba de esfericidad de Mauchly ^a							
Medida: contenido_mimosina							
Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Greenhouse-Geisser	Épsilon ^b Huynh-Feldt	Límite inferior
tratamientos	.536	9.981	2	.007	.683	.722	.500

Prueba la hipótesis nula de que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Intersección
Diseño intra-sujetos: tratamientos

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos intra-sujetos.

Figura 25. Resultados del análisis de esfericidad de Mauchly de los tratamientos.

En la Tabla 24 se observan los efectos de los tratamientos entre ellos a sus diferentes tiempos ajustados mediante Greenhouse-Geisser para la esfericidad a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 24. Pruebas de ajuste de esfericidad de los tratamientos.

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro sin centralidad	Potencia observada ^a
Tratamientos	Esfericidad asumida	20472.765	2	10236.383	779.206	0.000	0.979	1558.413	1.000
	Greenhouse-Geisser	20472.765	1.366	14987.124	779.206	0.000	0.979	1064.414	1.000
	Huynh-Feldt	20472.765	1.445	14169.679	779.206	0.000	0.979	1125.820	1.000
	Límite inferior	20472.765	1.000	20472.765	779.206	0.000	0.979	779.206	1.000
Error(tratamientos)	Esfericidad asumida	446.656	34	13.137					
	Greenhouse-Geisser	446.656	23.222	19.234					
	Huynh-Feldt	446.656	24.562	18.185					
	Límite inferior	446.656	17.000	26.274					

ANEXO E.

A continuación, se muestra el análisis estadístico (ANOVA de una vía) para la prueba de bioaccesibilidad en dónde la columna uno se refiere a la harina sin tratamiento, la columna dos se refiere a la harina de semilla de guaje con tratamiento de ultrasonido a 30 min y la columna 3 se refiere a la semilla fresca de guaje.

Tabla 25. Análisis de varianza de un factor para el estudio de bioaccesibilidad.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	2	130.45	65.225	5E-05		
Columna 2	2	166.42	83.21	0.0162		
Columna 3	2	87.64	43.82	0.005		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Libertad de los cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1555.4709	2	777.73545	109797.9459	5.04936E-08	9.552094496
Dentro de los grupos	0.02125	3	0.007083333			
Total	1555.49215	5				
Existen diferencias significativas por lo menos entre dos de los tratamientos						

Se realiza una prueba de Tukey sacando el *valor-q* de tablas y el *valor q*- de las medias:

Y2-Y3	39.39	> 0.3517
Y1-Y3	21.405	> 0.3518
Y2-Y1	17.985	> 0.3519

Por lo que se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 26. Estimaciones posteriores e intervalos creíbles al 95% de la digestibilidad según grupos experimentales.

Parámetro	Moda	Media	Varianza	95% Intervalo creíble	
				Límite inferior	Límite superior
Grupos = A	65.221	65.221	0.01	65.037	65.406
Grupos = B	83.208	83.208	0.01	83.023	83.392
Grupos = C	43.823	43.823	0.01	43.639	44.008

a. Variable dependiente: Digestibilidad

b. Modelo: Grupos

c. Asumir previas de referencia estándar.

ANEXO F

Los porcentajes de bioaccesibilidad *in vitro* obtenidos de seis réplicas independientes (n=6) para las muestras A (harina de guaje sin tratamiento), B (harina de guaje tratada con ultrasonido 30 min) y C (semilla fresca de guaje) se presentan en la Tabla 20. Previa verificación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, los datos se sometieron a un ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc HSD de Tukey ($\alpha = 0.05$) utilizando el software SPSS Statistics, con el fin de identificar diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de bioaccesibilidad *in vitro* de las tres condiciones evaluadas.

Tabla 27. Porcentajes de bioaccesibilidad *in vitro* de harina de guaje (*Leucaena leucocephala*) en tres condiciones experimentales.

Tratamiento	Bioaccesibilidad (%)
A	65.22
A	65.23
B	83.12
B	83.30
C	43.87
C	43.77

*Los valores corresponden a la media $\pm$ DE de seis réplicas independientes (sextuplicado) para cada muestra evaluada en el estudio de bioaccesibilidad *in vitro*. Las determinaciones se realizaron por duplicado dentro de cada réplica.



Todos los derechos reservados

Ninguna parte de esta publicación puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio, sea este electrónico ni mecánico, incluyendo fotocopiado o por grabación, ni por ningún sistema de almacenamiento y recuperación de información, sin permiso por escrito del autor.

Esta obra se terminó de imprimir y encuadernar el día 25 de mayo de 2026, en los talleres de A tu estilo, cel y whatsapp: 953 101 4300, 2211650383, facebook e instagram: atu3stilo, correo electrónico: atu3stilo@gmail.com.

Se utilizaron en la formación de la cubierta, caracteres tipo LT Acumin Variable Concept bold, semibold y black, de 12, 14, 16, 18 y 20 pts. El papel del interior: tipo bond PaperTech de 75 g/m². Portada impresa digitalmente en pasta rígida laminado con BOPP mate y cartón de 2.5 mm.

La edición consta de 08 ejemplares

Hecho en México