

63
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**" ESTUDIO DEL CONTENIDO DE OXALATOS
PRESENTES EN Portulaca oleracea L. (verdolaga)
Y SU EVALUACION GENOTOXICA "**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

María Adriana Herrera Espinosa de los Monteros

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Pedro Valle Vega
1er. VOCAL: Dra. Amanda Galvez Mariscal
SECRETARIO: Dra. Silvia D. Pena Batancourt
SUPLENTE: Prof. Lucía Cornejo Barrera
SUPLENTE: Prof. Ma. Victoria Couñiño Covarrubias

Lugar donde se desarrolló la tesis:

Departamento de Alimentos y Biotecnología
División de Ingeniería, Facultad de Química, UNAM.

Departamento de Biología del desarrollo,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

DIRECTOR DE TESIS:


Dra. Silvia D. Pena Batancourt

ASESOR TECNICO:


Dr. Javier Espinosa Aguirre

SUSTENTANTE:


María Adriana Herrera Espinosa de los Monteros

AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad Nacional Autónoma de México
A la Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco
Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM
Instituciones que hicieron posible mi participación**

A la Dra. Sávila Peña por su ayuda desinteresada en la dirección de mi tesis; en la cual me tuvo infinita paciencia sobre todo en mis momentos mas difíciles del desarrollo y estructuración de mi trabajo.

Al Dr. Javier Espinosa por su invaluable e incondicional ayuda en la interpretación de mutagénesis y antimutagénesis.

A la Dra. Amanda Galvez por su exhaustiva y atinada revisión de la tesis,

A los profesores, investigadores, técnicos, compañeros estudiantes que me brindaron su asesoría oportuna en la realización de esta investigación.

A todos mis grandes amigos (Jaime, Alejandro, Carmen Chijate, Carmen González, Emma, Elizabeth García, Laura León, Angeles, Jazmin, Sergio, Faustino, Jorge Leyba, Arturo, etc.) que me brindaron su apoyo, su amor, su tiempo cuando mas lo necesité. Con ustedes compartí muchas alegrías y tristezas inolvidables; gracias a ustedes y a mi linda Universidad tuve un desarrollo profesional muy bello.

Un corazón agradecido es un corazón alegre, que puede encontrar siempre algo extraordinario aún en las cosas mas comunes!

Y eso quiero ser para cada uno de ustedes un corazón que toda la vida les estará eternamente agradecido por todo cuanto pudieron brindarme...

Gracias

Esta tesis la dedico a mi MADRE Y A DIOS...

A Dios, porque él siempre ha estado conmigo desde el día en que nací. Gracias Señor mío por todas tus bondades, porque siempre me diste las fuerzas para seguir adelante y no permitiste que me quedara a la mitad de mi duro camino. Gracias porque me dejaste llegar a la cumbre de lo que algún día siendo niña me lo prometí a mi misma: llegar a tener una carrera universitaria y ejercerla con dignidad y amor. Ahora mi sueño de infancia lo vuelvo realidad gracias a ti y a la fe que has depositado en mí.

A mi madre, porque ella siempre ha sido un ejemplo ha seguir.

***Porque ella me enseñó a valorar todo cuanto tengo,
con su trabajo***

***Porque ella me enseñó a respetar y amar así como
también a perdonar***

***Porque ella, siempre me dió los más sabios consejos
sin que a veces se lo propusiera, ya que los hechos
decían más que las palabras***

***Porque gracias a la educación que me diste soy lo que
ahora me propongo ser***

***Aquellas largas y duras jornadas de trabajo y de
desvelos constantes no fueron en vano***

***Madre mía, ahora te entrego el fruto de lo que alguna
vez sembraste***

***Para ti mamá Rosita, con todo respeto, gratitud e
infinito amor***

Dios te bendiga hoy y siempre!!

El amor y la amistad que prevalecen en el hogar son parte fundamental para que salgan muy bien las cosas . El amor que siempre me han brindado mis hermanos, sobrinos y demás familiares ha sido un gran aliciente para seguir en este duro camino no sólo de la universidad sino de la vida, por lo cual quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A tí Laura, mujer incomparable que no cambiaría por nada en el mundo, pues has sido para mí la mejor hermana, madre, amiga que Dios me haya mandado. Gracias por todo el apoyo que siempre me has brindado y por estar a mi lado en los momentos mas difícilísimos de mi vida.

A tí mi traviesa Fanny, a la bonita Karol, a Noé y a mi Tita por todos momentos agradables que ma han hecho pasar con sus ocurrencias y porque siempre estuvieron al pendiente del desarrollo de mi tesis.

A tí Martha, porque me educaste con mano firme y dura. Gracias por preocuparte por mí .

A tí mi niña pequeña, a tí mi Rosita , porque siempre me has comprendido mis malos ratos t porque siempre has estado conmigo en la buenas y en las malas y por todo el amor de hermana que siempre me has brindado.

A tí Roberto, por todos los buenos consejos que ma diste, por tu apoyo y comprensión, gracias por hacer que el camino hacia mi gran meta fuera menos pesado pues siempre tuviste para mí una sonrisa, pensamientos que me alentaban, y muchas ideas locas que siempre me hicieron reír y olvidar mis pesares.

Con el amor, apoyo y comprensión de todos ustedes he logrado terminar mi sueño anhelado

Gracias, muchas gracias por todo
adorada familia

LOS AMA ADRIANA!

INDICE

Página

CAPITULO 1

1. Introducción	1
1.1 El hombre y la dieta.....	1
1.2 Contaminación natural de los alimentos.....	3
1.3 Generalidades de <u>Portulaca oleracea L.</u> (verdolaga).....	4
1.3.1. Clasificación botánica.....	7
1.4 Distribución y toxicidad del ácido oxálico y oxalatos.....	8
1.5 Química de los oxalatos.....	12
1.6 Biosíntesis de oxalatos.....	14
1.7 Mecanismo de acción de oxalatos.....	15
1.8 Metabolismo de los oxalatos	15
1.9 Mutagénesis.....	16
1.10 Justificación.....	22
1.11 Objetivos.....	24

CAPITULO 2

2. Materiales y métodos	25
2.1 Reactivos.....	25
2.2 Materiales.....	27
2.3 Equipos.....	28
2.4 Trabajos personales.....	29
2.4.1 Análisis Proximal (AOAC 1990).....	30
2.4.2 Análisis de minerales.....	37
2.4.3 Análisis de plomo (Merk,1989).....	45
2.4.4 Análisis de oxalatos (Método directo volumétrico)....	46
2.4.5 Prueba de Genotoxicidad de oxalatos in vitro.....	49
2.4.5.1. Prueba de mutagénesis de ácido oxálico.....	56
2.4.5.2. Prueba de antimutagénesis de ácido oxálico..	57

CAPITULO 3

3. Resultados y discusión	62
3.1 Análisis proximal de <u>Portulaca oleracea L.</u>	62
3.2 Análisis de minerales de <u>Portulaca oleracea L.</u>	64
3.3 Análisis de plomo.....	67
3.4 Análisis de oxalatos en <u>Portulaca oleracea L.</u>	67
3.5 Prueba de mutagénesis de ácido oxálico.....	71
3.5.1 Prueba de antimutagénesis de ácido oxálico.....	76

CAPITULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones	82
Bibliografía	84

Cuadros

3.1 Análisis proximal de <u>P. oleracea L.</u> (verdolaga).....	63
3.2 Análisis de minerales de <u>P. oleracea L.</u>	65
3.3 Análisis de oxalatos en <u>P. oleracea L.</u>	66
2.1 Protocolo de mutagénesis del ácido oxálico.....	60
3.4 Mutagénesis del ácido oxálico, sin inducción hepática.....	72
3.5 Mutagénesis del ácido oxálico con inducción hepática.....	73
2.2 Protocolo de antimutagénesis del ácido oxálico.....	61
3.6 Antimutagénesis del ácido oxálico, sin inducción hepática...	78
3.7 Antimutagénesis del ácido oxálico, con inducción hepática...	79

Gráficas

1. Mutagénesis del ácido oxálico sin inducción hepática.....	74
2. Mutagénesis del ácido oxálico con inducción hepática.....	75
3. Antimutagénesis del ácido oxálico sin inducción hepática....	80
4. Antimutagénesis del ácido oxálico con inducción hepática....	81

Anexos

Anexo 1	Producción agrícola nacional de verdolaga en 1992.....	90
Anexo 2	Producción agrícola de verdolaga por entidades federativas durante 1992.....	91
Anexo 3	Producción agrícola de verdolaga por entidades federativas durante otoño- invierno 1991-1992.....	92
Anexo 4	Producción agrícola de verdolaga por entidades federativas en primavera-verano.....	93
Anexo 5	Análisis estadístico.....	94
Anexo 6	Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis proximal de la verdolaga.....	96
Anexo 7	Análisis estadístico de los niveles de oxalatos encontrados en verdolaga.....	97

CAPITULO I

1. Introducción

1.1 El hombre y la dieta

El hombre, como animal heterótrofo cubre sus necesidades nutricias con alimentos de origen vegetal y animal.

La selección de los alimentos se basa en las propiedades organolépticas, las posibilidades de obtención y almacenamiento así como la ausencia de elementos tóxicos. Todo esto forma parte del comportamiento alimentario del hombre y constituye un capital cultural que diferencia las distintas poblaciones. Sabemos hoy en día que gracias a la transformación de los alimentos se eliminan o se potencializan los metabolitos secundarios naturales y aquellos introducidos por el hombre.

Los vegetales, habituales en la nutrición humana además de nutrimentos, contienen proporciones variables de sustancias sin valor nutritivo: inhibidores de enzimas, saponinas, fitatos glucosinolatos, ácido arsénico, cianuro, aflatoxinas, entre otras.

Los vegetales constituyen un alimento de gran aceptación en el mercado nacional debido a su alto contenido en minerales, vitaminas y su bajo costo.

De la familia de las Portulaceas, la verdolaga representa una de las más utilizadas en la dieta del mexicano. El aspecto nutricional y agrícola de la planta ha sido extensamente estudiado mientras que las sustancias antinutritivas ha sido abandonada.

En la actualidad los ingresos por familia son cada vez menores supliendo con vegetales aproximadamente el 50% de su dieta, los especialistas en Tecnología de Alimentos debemos considerar, analizar y valorar no sólo la presencia de sustancias químicas como plaguicidas, aditivos, metales pesados, sino también las sustancias presentes naturalmente en los mismos como taninos, alcaloides, oxalatos, glucosinolatos y nitratos para asegurar la calidad del alimento y por ende la salud y bienestar de los consumidores.

1.2 Contaminación natural de los alimentos

Desde la antigüedad los alimentos se han contaminado de forma natural, por microorganismos, o por malas prácticas culinarias. Los alimentos han sido involucrados como causas de ciertos tipos de cánceres: colón, próstata, etc. Debemos, sin duda, buscar no sólo los contaminantes sintéticos como posibles causas sino además los presentes de manera natural.

La contaminación de los alimentos puede presentarse a distintos niveles: desde el campo, los procesos de elaboración y envasado; en el hogar, por sobrecalentamiento, sobrecongelación, freído, ahumado y esterilización.

Existen sustancias químicas que son perjudiciales para las células de un organismo heterótrofo (12) y que se encuentran como productos naturales las cuales actúan como defensa en contra de infecciones bacterianas, fúngicas, ataques de insectos e inclusive contra herbívoros. Sin embargo éstas sustancias pueden actuar como agentes mutágenos o cancerígenos, jugando el papel de iniciadores endógenos de procesos degenerativos, como el daño al material genético (ADN), el envejecimiento y las enfermedades cardíacas (8,9,10,11).

La discordancia encontrada entre el valor biológico de los alimentos, definido a partir de su composición química o con modelos experimentales animales, condujo al descubrimiento de las sustancias tóxicas naturales.

1.3 Generalidades de Portulaca oleracea (verdolaga)

Las portuláceas son hierbas suculentas que poseen un 90.64% de humedad (7) y un contenido importante de compuestos fenólicos, flavonoles y c-glicosiflavonoides, que han permitido establecer relaciones filogénicas entre las familias de su mismo orden (2). Contienen cierto número de ácidos orgánicos, productos metabólicos de las células: ácido fórmico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico, ácido acotínico, ácido fumárico, tartárico y benzoico. Todos éstos, son solubles en agua y dos de ellos, el fórmico y el acético, son volátiles (32). El extracto de esta planta contiene compuestos químicos, farmacológicamente activos como: catecolaminas, dopa, dopamina y noradrenalina, que funcionan como agentes relajantes musculares (48).

La Portulaca oleracea L. (verdolaga) es una planta de hábito rastrero y de ciclo anual; de raíz pivotante y tiende a formar una mata de 20 a 40 cm de longitud. Presenta hojas espatuladas de 1 a 3 cm de largo obovadas, carnosas y crecen en disposición alterna o en agregaciones alrededor de los tallos rojizos y glabros de la planta; flores con 2 sépalos y 5 pétalos. El ovario semiinfero y un fruto capsular, con semillas de 1 mm de longitud de color negro. La planta tiene sabor ligeramente ácido y es comestible (1, 3); considerada como la hortaliza más ampliamente distribuida en el mundo, crece desde campos húmedos y de cultivo, hasta en las orillas de las carreteras y calles citadinas.

La producción agrícola nacional de verdolaga para 1992 en México durante las temporadas otoño-invierno, primavera-verano fue de 384 y 456 toneladas con un valor total de 307,200 y 345,600 nuevos pesos respectivamente (Anexo 1).

Las entidades federativas que sobresalen por su producción son: Baja California Norte (48 toneladas) y Morelos (792), con un valor total de producción de N\$ 60,000 y N\$ 592,800 respectivamente durante el año 1992 (Anexo 2). El Estado de Baja California Norte no tiene producción de verdolaga durante la temporada otoño-invierno, mientras que el Estado de Morelos produce verdolaga todo el año y en grandes proporciones (Anexo 3).

En el sur de México, se encuentran ampliamente distribuidas.

Entre las especies de interés nutricional se encuentra la Portulaca oleracea L. y de ornamento, Portulaca pilosa L., y Portulaca grandiflora.

En México la Portulaca oleracea L. se le conoce con diferentes nombres indígenas.

En Michoacán (lengua tarasca): Acahue-Cashacua. En Oaxaca, (lengua zapoteca): Zeeche, Zheezhe, Shenche, Nocuana-zeeche, Pitu-lé, Xeedxe. Tequitl, en San Luis Potosí; Pitzitzamal, (lengua huasteca), en el sureste de San Luis Potosí; Tzutcani, (lengua otomí), en Ixmiquilpan, Hidalgo; Verdolaga, en la región Central del País; Kukul en Yucatán; Itz-mi-quitl, (lengua azteca) y Xpuh, lengua totonaca de la sierra norte de Puebla .

Existen además otras variedades de verdolaga distribuidas en nuestro país de interés ornamental:

Verdolaga de agua, Jussiaea repens L. -Onagraceas (Jalisco, Veracruz, Oaxaca, México)

Verdolaga blanca, Trianthema portulacastrum L. -Aizoáceas (Tabasco, Sinaloa, D.F.)

Verdolaga bronce, Trianthema portulacastrum L. -Aizoáceas (Tabasco, Sinaloa, D.F.)

Verdolaga de mar, Borrichia arborescens L. DC.- Compuestas
(Yucatán)

Verdolaga del mar, Borrichia frutescens L. DC.- Compuestas
(Tamaulipas a San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán)

Verdolaga de playa, Sesuvium portulacastrum L.- Aizoáceas
Planta de terrenos salados

Verdolaga de puerco, Alternanthera versipennis L. Kuntz.- Amarantáceas
(D.F., Oaxaca, Durango) .

La Portulaca oleracea L. (verdolaga), posee una importancia nutricional considerable en todo México, donde se consumen sus tallos y sus hojas en forma cruda ó cocida, sola o combinada, y como bebida.

La población infantil de los países en vía de desarrollo, satisface su demanda nutricional con este vegetal, rico en vitaminas y minerales (6,7) UNICEF 1980.

1.3.1 Clasificación botánica (1, 2)

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Arquiclamideas
Orden: Caryophyllales

Familia: Portulacaceae
Subfamilia: Portulaceae
Género: Portulaca
Especie: Portulaca oleracea L.

1.4 Distribución y toxicidad del ácido oxálico

El ácido oxálico (COOH-COOH) esta presente en numerosas plantas en forma libre o en forma de sales de sodio, potasio y calcio, éstas últimas insolubles en agua (12).

Los géneros vegetales que contienen cantidades importantes de oxalatos incluyen entre otras Halogeton (barrilla), Rumex (lengua de vaca), Sarcobatus (palo de grasa), Portulaca (verdolaga), Beta (betabel), Salsola (rodadora) (3).

Los oxalatos se encuentran en niveles elevados en los miembros de la familia Portulacaceae, por lo general en las hojas más que en los tallos, tendiendo a acumularse durante la noche e incrementándose conforme avanza su estado de madurez (44).

El ácido oxálico, interfiere con la asimilación del calcio y formación de cálculos renales, son consecuencia de la débil disociación de las sales de oxalato cálcico (12). La toxicidad del ácido oxálico es baja; la dosis letal mínima en el hombre es

de 5g para un adulto (12). Alrededor del 50 % de los cálculos renales son producidos por el oxalato cálcico. Estos aparecen frecuentemente entre las personas que se alimentan con dietas ricas en vegetales en las que los componentes fundamentalmente son espinaca y ruibarbo, las cuales contienen cantidades elevadas de oxalatos. Sin embargo, los cristales de oxalato cálcico son también patognómicos de la oxaluria, una alteración hereditaria correspondiente al metabolismo de glicina, en la cual prácticamente toda la glicina sintetizada es metabolizada a ácido oxálico, vía ácido glioxílico (52).

El ácido oxálico no es tóxico por su acidez sino por las reacciones del ión oxalato, éste es el único ácido orgánico de las plantas el cual es tóxico para el ganado bajo condiciones naturales (31). El ácido oxálico es, un ácido débil y sólo en forma muy concentrada provoca la destrucción del tejido vivo (3).

Las hojas de alfalfa son ricas en calcio, por lo que pueden ser utilizadas para alimentar temporalmente a los animales que apacentan en agostaderos con poblaciones elevadas de plantas ricas en oxalatos (3). La administración del sacarato cálcico, la creta preparada, el agua de cal, las sales de magnesia son algunos de los tratamientos que se dan a personas con oxaluria. También se

prescriben tisanas diuréticas y se favorece la eliminación del tóxico con ejercicios pasivos y masaje principalmente de la región lumbar (53).

Desde el punto de vista nutricional, el problema principal de los oxalatos es el de interferir en la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria. Si consideramos que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1 g de calcio, la disponibilidad de calcio de un alimento está determinada por la relación ácido oxálico-calcio. Algunos alimentos tienen relaciones altas: ruibarbo, 25; espinacas, 10; papas, 5; cacao, 6.6; té, 2.6. Todos los alimentos que tengan una relación superior a 2.25 constituyen una mala fuente de calcio y generalmente se consideran descalcificantes (12).

Al evaluar el riesgo tóxico al que se ven sometidos los consumidores debemos considerar diversos factores: no sólo la presencia del vegetal sino la genética, deficiencias enzimáticas, predisposición a la formación de cristales de calcio y el efecto de la dieta para hacer posible la manifestación de su toxicidad en forma aguda, es decir, su efecto dañino en el tracto gastrointestinal (12).

El efecto antinutritivo del oxalato queda claramente ilustrado en los resultados obtenidos en un experimento basado en la determinación de calcio durante seis días, en mujeres que recibieron alternativamente 3/4 partes del aporte total de calcio a partir de leche o de espinacas.

El coeficiente de absorción (CAD) del calcio de la leche es superior. Con la administración de espinacas se observa una disminución del coeficiente de absorción y la retención del calcio en el organismo es de 1/3 con respecto a la obtenida con la leche. El aporte de calcio debe ser como mínimo suficiente para satisfacer las necesidades del organismo considerando las cantidades que quedan complejadas por el alimento (12).

Los oxalatos producen disminución de calcio en la sangre, originando hipocalcemia. Al bajar el nivel en calcio de la sangre disminuye considerablemente el poder coagulante de la misma y si este proceso avanza, se produce en el animal serios trastornos metabólicos. El precipitado insoluble bloquea los túbulos renales causando uremia, nefritis y cálculos renales. En casos extremos el riñón puede incluso reventarse. Por lo general los síntomas aparecen de 2 a 6 horas después del envenenamiento y consisten en depresión, disnea, postración, coma y muerte (3).

La ingestión de oxalatos a través de la dieta rica en vegetales, produce síntomas de envenenamiento, efectos dañinos en el tracto intestinal e hipocalcemia. Se ha establecido que en general las plantas que contengan más del 10% de oxalato en base seca pueden ocasionar efectos tóxicos (13). Los efectos tóxicos crónicos dependen del tiempo de consumo y de la carencia de vitamina D. Esta vitamina es la responsable de la formación del 1, 2, 5-dihidroxicolecalciferol, hormona esteroide producida en el riñón, encargada de regular el metabolismo del calcio, sobre todo su absorción en el intestino (51, Fasset, 1973).

Las dosis letales medias (DL_{50}) para las distintas especies son:

DL_{50} (humano, vía oral) = 5g/68 Kg de peso

DL_{50} (perros) = 1g/Kg

DL_{100} (ratón, vía parental) I.P. = 150 mg/Kg

DL_{100} (conejo, vía parental) I.M. = 200 mg/Kg

Límite de exposición ($H_2C_2O_4$) = 1mg/m³

1.5 Química de oxalatos

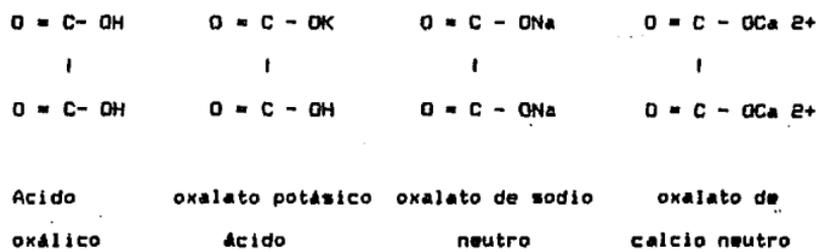
Los oxalatos (Figura 1), son sales o ésteres formados a partir del ácido oxálico, generalmente de sodio, potasio o calcio. Los oxalatos de sodio y potasio son solubles en agua y los de

calcio son insolubles a pH neutro o alcalino, pero solubles en ácido (30). Tienen sabor muy desagradable (34). Por la acción del calor los oxalatos se descomponen. Los alcalinos, forman carbonato alcalino desprendiéndose óxido de carbono; los restantes oxalatos forman óxido, por ejemplo, el oxalato cálcico y el oxalato magnésico (53). Esto se logra a temperaturas superiores a los 500°C.

La espinaca ha sido ampliamente estudiada, por diversos autores, donde se han utilizado diferentes métodos de cocimiento y conservación con el fin de reducir el nivel de oxalatos en la misma (42, 45, 49). Se han reportado valores de oxalatos en espinaca fresca de 10.85% (Toma, 1979).

Estudios recientes han demostrado que algunos microorganismos como Aspergillus niger pueden adaptar ciertas actividades enzimáticas para la producción de oxalatos (Jefferson and J.L., Harrison, 1971).

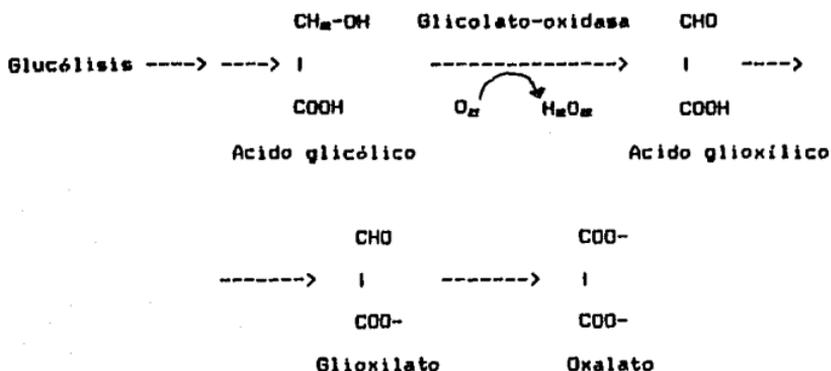
Figura 1.- Estructura del ácido oxálico y sus sales correspondientes



1.6 Biosíntesis de oxalatos

Los oxalatos se originan a partir del metabolismo de los carbohidratos (Fasset, 1979) por la vía glucolítica de la formación del ácido glicólico y su subsecuente oxidación a ácido glioxílico (Figura 2). Este proceso se lleva a cabo por la acción del oxígeno atmosférico y de un enzima muy activo, la glicolato-oxidasa, que es una oxidasa flavínica localizada en los microcuerpos o peroxisomas de las plantas. La oxidación del glicolato forma peróxido de hidrógeno, el cual se descompone por la catalasa presente en los peroxisomas. El glioxilato es ulteriormente metabolizado a otros productos, tales como glicina, oxalato, formiato o CO_2 , según la especie (14, 50).

Figura 2.- Biosíntesis de oxalatos



1.7 Mecanismo de acción de oxalatos

Los oxalatos actúan como agentes quelantes y reductores directamente en el metabolismo de los iones calcio disminuyendo su concentración plasmática e interviniendo en la formación de cristales de calcio (Si, Fasset, 1979).

1.8 Metabolismo de los oxalatos

Los oxalatos solubles y el ácido oxálico son absorbidos a nivel intestinal; pasan por el hígado donde son elaborados, sintetizados y expulsados a la sangre para su asimilación al organismo y posterior eliminación. Los oxalatos, como todas las sustancias solubles se eliminan por el riñón en forma independiente al calcio. Sin embargo, en el riñón por mecanismos de alteración de la reabsorción a nivel tubular o por exceso de sustancias, los oxalatos se precipitan a través de un pH modificado y entonces ambas sustancias diluidas (oxalato y calcio) se unen para formar un compuesto sólido; esto se lleva a cabo en la porción terminal del túbulo y cae a las cavidades renales en forma de cálculo. El cálculo puede ser eliminado de inmediato porque es pequeño, pero también puede acumularse, precipitarse más, el problema persistir y hacerse un cálculo grande.

Los excedentes son eliminados por vía renal, en forma separada y es en el túbulo contorneado distal y el túbulo colector en que por transtornos de la reabsorción o por cambios en el pH y la osmolaridad pueden unirse ambos solutos (oxalatos y calcio) para formar cuerpos sólidos (cálculos renales). Estos cristales que se acumulan en la vejiga y en la uretra pueden provocar irritación e inflamación con desórdenes posteriores como disuria y también pueden favorecer la presencia de infecciones (51).

1.9 Mutagénesis

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituye el material genético (DNA). Este cambio puede ocurrir en los genes o en los cromosomas.

Las alteraciones intragénicas pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento ("frameshift"). La primera resulta de una transición o reemplazo de una base por otra del mismo tipo, o de una transversión, en la que una base es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia nucleotídica por eliminación o por adición de bases. Las anomalías cromosómicas, pueden deberse a rearrreglos estructurales, tales como inversión o traslocación, o anomalías numéricas, como eliminación o adquisición de genes o

pedazos de cromosomas, o cromosomas completos.

Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético, o sobre otros componentes celulares ligados en su funcionamiento, como por ejemplo, los que participan en la división celular, las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del DNA. Las mutaciones pueden ser ventajosas, neutras o tener manifestaciones patológicas, entre las que incluyen padecimientos congénitos y cáncer.

Es evidente que si se pretende estimar el riesgo que representa un compuesto para el hombre, las pruebas de mutagénesis con y sin inhibidores enzimáticos, son las fuentes idóneas.

Los experimentos con sistemas biológicos (virus, hongos, bacterias, plantas, insectos, cultivos de células de mamíferos, ratones, ratas, etc.) resultan valiosos para evaluar los efectos genéticos de los agentes químicos, dada su reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y corta duración.

Una de las pruebas más difundidas para la evaluación de mutaciones génicas es la prueba de Ames con Salmonella typhimurium (Ames, 1975).

Las cepas mutantes (auxótrofas his-), a diferencia de las silvestres (protótrofas, his+), requieren histidina para su crecimiento debido a que presentan una mutación en el operón de la histidina. La prueba se basa en la capacidad del agente químico

para actuar sobre dicho operón, revirtiendo el fenotipo, lo que permite a la cepa crecer en medios que carecen del aminoácido o con cantidades limitantes del mismo.

Una de las ventajas de esta prueba es que permite conocer no tan solo si un agente es mutágeno, sino también el tipo de mecanismo a través del cual induce la mutación. Esto es debido a que las cepas de prueba se obtuvieron mediante la inducción de mutaciones de tipo de sustitución de bases (cepas TA 1535 y TA 100) o desfaseamiento de la secuencia nucleotídica (cepas TA 98, TA 1537, TA 1538), lo que implica que su reversión requiere de sustitución de la base adecuada en el primer caso o eliminación de bases en el segundo para correr la secuencia y restablecer el código genético (20).

La acción directa de los agentes químicos sobre los componentes celulares, constituyen un riesgo para la población. Sobre todo por exposición crónica, aún cuando no se alcancen niveles muy altos de estas sustancias. Estos niveles aumentan, inclusive, al cocinar y al preparar los alimentos de uso diario, pero no presentan riesgo para ciertos seres humanos y animales, que han desarrollado un tipo de resistencia (8, 9, 10, 11, 20, 21, 22).

En los vegetales comestibles se han identificado una amplia variedad de factores genotóxicos naturales, como los compuestos

fenólicos, que se unen a los receptores celulares, ocasionando la proliferación celular; la quercetina, un bioflavonoide extensamente distribuido en las plantas superiores; las hidrazinas, compuestos naturales presentes en los hongos comestibles; el safrol, que se encuentra en la raíz del sazafrán. Los apios, higos, perejil, chirivías, contienen furocumarinas que al ser activadas por la luz, forman carcinógenos potentes; las quinonas presentes en el ruibarbo actúan como electrófilos o aceptando electrones para formar semiquinonas, que a su vez reaccionan directamente con el DNA, o bien favorecen la formación de superóxidos repercutiendo en la lipoperoxidación con la consecuente generación de mutágenos (5, 8, 9, 10, 21, 23).

Para poder afirmar que un metabolito posee actividad genotóxica, debe ser capaz de realizar dos funciones: introducir una lesión premutagénica al ADN y al mismo tiempo inducir el sistema que procesará la lesión del ADN necesaria para producir una mutación. Además debe comprobarse su mutagenicidad tanto en los sistemas bacterianos como en mamíferos, determinando sus metabolitos intermediarios, sustitutos inocuos y tiempos de exposición y consumo. Sin embargo las regulaciones de exposición a los agentes químicos no reducen el riesgo de cáncer, puesto que en el ambiente, un organismo está expuesto a muchos de ellos, incluyendo los presentes en forma natural, que no se han estudiado

(8, 10, 21), así como el tipo de vida, hábitos sociales (fumar, beber), etc. Además, los individuos poseen mecanismos de protección, (reparación, inmunológicos...) que pueden impedir o disminuir la ocurrencia del daño. Se ha observado que cada persona puede verse afectada en forma diferente después de una exposición comparable a una misma sustancia (20).

Antimutágeno es, cualquier agente que reduce la aparente reacción espontánea inductora de mutaciones, sin tomar en consideración los mecanismos involucrados. Actualmente, los antimutágenos se han dividido en desmutágenos y en bio-antimutágenos (24, 25, 26).

Un desmutágeno puede ser, la mayoría de las veces, un metabolito de alto peso molecular que prevalece biológicamente y que reacciona o se une preferentemente a mutágenos y a radicales libres (24, 26).

Los desmutágenos, en primera instancia, pueden causar modificaciones químicas y bioquímicas de los mutágenos y carcinógenos previamente al daño que pudieran causar en el DNA, neutralizando las lesiones mutagénicas o premutagénicas causadas por compuestos químicos o por los propios mecanismos de reparación del DNA . Por otra parte, los bio-antimutágenos reducen las mutaciones que interfieren en los procesos celulares de fijación

de la mutación, interviniendo incluso en los procesos de reparación y replicación del DNA de las células afectadas (9, 24, 25, 26).

En general, la antimutagénesis puede actuar previniendo la formación de mutágenos, interceptando y eliminando tales mutágenos vía tisular o intracelular ó interceptando a los mutágenos con enzimas o con compuestos presentes en los líquidos intra y extracelulares (24, 26).

Estudios epidemiológicos, han revelado que un número de micronutrientes pueden tener efecto anticarcinogénico, por ejemplo, la vitamina A, C y E; el betacaroteno, el selenio y el calcio. Estos estudios, indican que vegetales, granos y frutas pueden contener en cantidades menores, constituyentes no nutritivos con actividad anticarcinogénica. Tal es el caso de la fibra cruda. El ajo, col, semilla de soya, jengibre, zanahoria, cebolla, limón, naranja, uva, trigo entero, arroz moreno, tomate, papa, berenjena, pimienta, coliflor, cebada, avena, menta, orégano, pepino, romero, tomillo, cebollina, clavo, anís, bayas, son algunos alimentos que posiblemente presentan actividad anticarcinogénica (5).

1.10 Justificación

El consumo de Portulaca oleracea L. (verdolaga) forma parte de nuestra dieta. La producción agrícola nacional de verdolaga para 1992 fue de 840 toneladas, por lo tanto, podemos asumir que hay un alto consumo de este vegetal, sobre todo por las clases populares. Este vegetal se caracteriza por ser un alimento barato, delicioso y nutritivo. Su valor nutricional, estriba en ser un importante portador de nutrimentos especialmente vitaminas y minerales. Sin embargo, también existe la posibilidad de encontrar en la verdolaga compuestos químicos tóxicos presentes de manera natural y en concentraciones probablemente elevadas. Tal es el caso de los oxalatos [Stuart, A. 1989]. Se han reportado en verdolaga concentraciones de oxalatos en base seca del 8% [Peña, Silvia, 1991] y 9.69% [Tabekhia, H. 1979]. Ahora bien, la espinaca (Spinacia oleracea L.), posee concentraciones de oxalatos del 10.85% en base seca [Toma, R. 1979]. Ambas plantas pertenecen a la misma especie, por lo tanto, creemos que la verdolaga elegida para este estudio poseerá también concentraciones elevadas de oxalatos.

Algunos investigadores han sometido a la verdolaga a diversos métodos de cocción [Toma, R. 1979] con el fin de lograr una disminución significativa de estos niveles de oxalatos. Por otro lado, se ha establecido que en general las plantas que contengan

un 10% de oxalatos en base seca pueden ocasionar efectos tóxicos [Cheeke, P. 1985] e inclusive genotóxicos dada esa elevada concentración [Espinosa A. Javier; comunicación personal Departamento de Investigaciones Biomédicas, 1994]. Sin embargo, si bien es necesario probar la mutagenicidad de un compuesto que está en contacto con el ser humano a través de los alimentos, también resulta de gran interés estudiar los posibles efectos antimutagénicos, ya que muchos compuestos químicos presentes en las plantas poseen esta actividad.

Puesto que hasta el momento no se han realizado estudios en base a la actividad mutagénica y antimutagénica de los oxalatos, surge la necesidad de llevar a cabo un estudio toxicológico y genotóxico de estos compuestos presentes en Portulaca oleracea L. (verdolaga).

1.11 Objetivos

Objetivo general:

- 1.- Realizar un estudio químico y genotóxico de los oxalatos presentes en Portulaca oleracea L. (verdolaga).

Objetivos específicos:

- 1.- Cuantificar los oxalatos presentes en verdolaga antes y después de los tratamientos térmicos.
- 3.- Probar la mutagenicidad y antimutagenicidad del ácido oxálico en Salmonella typhimurium

de las cuales se desprenden las siguientes hipótesis:

- 1.- La concentración de oxalatos en Portulaca oleracea L. (verdolaga) es elevada.
- 2.- Los oxalatos son compuestos termolábiles, por lo que con un tratamiento térmico, disminuirán de manera significativa.
- 3.- El ácido oxálico es un agente tóxico a nivel celular.

CAPITULO 2

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

- Agua destilada
- Acido sulfúrico concentrado 0.25N, 1N
- Mezcla catalizadora
- Acido bórico al 4%
- Acido clorhídrico 0.1N, 0.6N, 1N, 6N, 25%
- Pastillas de cinc
- Hidróxido de sodio al 33%, 0.31N, 10%, 5N
- Asbesto de fibra larga
- Acido-etilén-diamino-tetracético 0.02N
- Calcóncarboxílico (indicador)
- Solución reguladora de amonios 0.01N
- Negro de eriocromo (indicador)
- Calcón
- Solución de agua destilada-molibdovanadato de amonio
- Solución patrón de fósforo (0.1mg/ml)
- Cianuro de potasio
- Ferrocianuro de potasio
- Trietanolamina-calcón
- Hidróxido de amonio diluido 1N, 5M, 2%
- 2,4-dinitrofenol
- Ortofenentrolina al 1.5% en etanol al 95%
- Clorhidrato de hidroxilamina al 10%
- Disolución patrón de hierro (10 ppm)
- Tetracloruro de carbono
- Azul de timol (indicador)
- Solución de carbamato al 0.2 %
- Disolución de ditizón en tetracloruro de carbono al 0.01 %
- Eter dietílico
- Citrato de amonio 0.4M
- Disolución patrón de cinc (2ug/ml)
- Solución de ditizona
- Solución patrón de plomo (1mg/ml)
- Solución de tartrato sódico-potasio
- Solución valorada de permanganato de potasio 0.02N
- Solución patrón de oxalatos al 1% ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$)
- Solución de cloruro de calcio (1000ppm de Ca^{2+})
- Acido oxálico puro, grado reactivo
- Medio mínimo E. de Vogel-Bonner
- Agar de superficie (Bacto agar 0.6g, cloruro de sodio 0.5g, agua destilada 100ml)

- Caldo nutritivo
- Solución buffer de fosfatos pH=7.4
- Homogenado hepático (fracción S-9)
- Cepa pura de Salmonella typhimurium *
- 2-aminoantraceno (0.01g/1000 ul, 100ug/1000ul)
- 1-nitropireno (0.05ug/10ul, 5ng/10ul)
- Mezcla crómica al 5%
- Cloruro de potasio al 0.15M
- L-histidina 0.5mM/biotina 0.5mM
- L-histidina 0.1M/biotina 0.5mM
- Cloruro de magnesio 0.4M/cloruro de potasio 1.65M

* Donación del doctor Bruce N. Ames, Biochemistry Department
University of California, Berkeley, California, USA.

2.2. Materiales

- Verdolaga fresca
- Papel aluminio
- Tijeras
- Frascos de vidrio con tapaderas
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Pinzas
- Guantes de asbesto
- Matraces Kjeldhal
- Matraces erlenmeyer de 100ml, 250ml, 125ml
- Vasos para grasa, anillos y juntas de hule Goldfish
- Portacartuchos
- Papel filtro Whatman No 5
- Vasos Berzelius de 500ml
- Pipetas de 5ml
- Embudo de tallo largo para filtración
- Embudo de separación
- Matraces volumétricos de 25ml, 50ml, 100ml y 250ml
- Piseta de 200ml
- Probeta graduada de 5ml, 10ml, 20ml, 50ml, 100ml y 250ml
- Pipetas volumétricas de 1ml, 2ml, 5ml y 10 ml
- Tubos o celdas para espectrofotómetro
- Matraces aforados de 1000ml
- Perlas de vidrio
- Mortero con pistilo
- Tubos para centrifuga
- Termómetro de 200°C
- Parrilla eléctrica
- Soporte
- Recipiente para baño maría
- Tubos de ensayo de 22*150 con tapón
- Tubos de ensayo de 13*150 con tapón
- Filtros millipore
- Frascos viales
- Puntos desechables
- Mechero, triple metálico, tela de asbesto
- Cajas de Petri

2.3. Equipos

- Bomba para vacío marca Felisa, modelo 1402
- Espectrofotómetro marca Spectronic 21D, Milton Roy
- Medidor de pH Conductronic pH 20
- Centrífuga de 3000 rpm marca IEC, Model 2K
- Vortex marca Sybron
- Estufa con vacío Electric Company Blue M & Thelco
- Mufia marca West, Caisa Huppert
- Digestor macroKjeldhal marca Labconco
- Equipo para Goldfish marca Labconco
- Equipo para fibra cruda marca Labconco, modelo EFC-600
- Balanza granataria marca Ohaus, capacidad 2Kg
- Balanza analítica marca Mettler H35 AR
- Flamómetro marca Corning 400
- Incubadora estática e incubadora con agitación marca American Optical
- Autoclave marca AESA, modelo CV 300

2.4. Trabajos personales

Muestra vegetal.

Para el presente estudio, se utilizó la porción comestible (tallos y hojas) de Portulaca oleracea L. (verdolaga), la cual se adquirió de la Central de abastos, Iztapalapa, Distrito Federal en Enero de 1993.

Preparación de las muestras

a) Muestra cruda: La verdolaga fresca se limpió, se secó durante dos días a una temperatura de 44°C y se molió manualmente en mortero, colocando la muestra en un recipiente cerrado a temperatura ambiente.

b) Muestra cocida: La muestra de verdolaga limpia (150 g aproximadamente) se sometió a un proceso de cocción en un recipiente cubierto durante 10 y 15 minutos a temperatura de ebullición del agua (90°C) en un volumen inicial de 350 ml de agua suficiente para cubrir la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de cocción, se separaron las tortas del líquido de cocción para su secado en charolas de aluminio durante dos días a 44°C. Las muestras secas se molieron en un mortero y se guardaron en un recipiente cerrado.

2.4.1 Análisis proximal (AOAC, 1990)

Determinación de humedad.

Fundamento

Esta técnica se basa en la evaporación total del agua mediante calor. Se considera que la pérdida de peso es agua. Si la muestra que se va a secar solo servirá para determinar humedad, se utilizan temperaturas de 100 hasta 105°C por un período de 4 horas.

Si la muestra a secar se utilizará para hacer otras determinaciones deberá hacerse entre 55° a 60°C durante toda la noche.

Conocer el contenido de humedad de un alimento es de gran importancia para poder darle un valor real a la cantidad de los demás componentes que lo constituyen.

Procedimiento:

Se pesaron 150g de cada muestra por separado en charolas de aluminio (previamente pesadas) . Las muestras se secaron durante 2 días en la estufa con una temperatura de 44°C. Se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador, para después pesar una vez alcanzado el equilibrio con la temperatura ambiente.

Cálculos para determinar el % de humedad de la muestra:

Humedad= $(A-B)*100 / M$, donde

A= Peso de la charola + muestra

B= Peso de charola + muestra después de secar en la estufa

M= Peso de la muestra

% Materia seca= $100 - \% \text{ humedad}$

Determinación de Cenizas

Fundamento:

Esta determinación se basa en someter la muestra a combustión entre 550 hasta 600°C. La materia orgánica se oxida y las cenizas resultantes son consideradas la parte mineral del alimento.

Procedimiento:

Se pesaron de 1 a 2 gramos de muestra, en crisoles de porcelana previamente pesados y calcinados durante dos horas a 600°C; las muestras se sometieron a una temperatura de 550°C durante el tiempo necesario para obtener cenizas blancas o grises homogéneas. Se debe tener cuidado que la temperatura no exceda los 550°C, pues de lo contrario se produce la volatilización de los cloruros.

Obtenidas las cenizas, se transfirieron al desecador para su cálculo.

Cálculos para la determinación cenizas:

% Cenizas en base seca= $\text{Peso de las cenizas} \times 100 / \text{Peso de muestra}$

$(\% \text{ Cenizas en B.S.}) \times (\% \text{ Materia seca})$

% Cenizas en base húmeda= -----

100

% Materia orgánica= $100 - \% \text{ Cenizas en base seca}$

Determinación de proteínas

(Método macroKjeldhal, AOAC, 1970)

Fundamento:

El método consta de dos fases: la digestión, en la cual se lleva a cabo la destrucción de la materia orgánica y la fijación de nitrógeno como sulfato ácido de amonio y destilación en donde se libera el nitrógeno en forma de amoníaco, que se recibe en una solución de ácido bórico, formando el borato de amonio que se titula con solución de ácido clorhídrico 0.1N.

Para estimar el contenido de proteína en base el contenido de nitrógeno, se multiplica este último por un factor llamado factor nitrógeno, el cual se calcula en base contenido de nitrógeno en

las proteínas. En la mayoría de las proteínas vegetales el promedio de nitrógeno, es de un 16%, esto significa que cada unidad de nitrógeno está contenida en 6.25 unidades de proteína.

El contenido de proteína calculado de esta manera no puede asegurarse que provenga exclusivamente de proteínas, razón por la cual el resultado obtenido se le llama proteína cruda.

Procedimiento:

Se pesaron 1g de muestra, 10g de muestra catalizadora y se adicionaron 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y tres perlas de vidrio, posteriormente se procedió a digerir la muestra hasta obtener una solución de color verde transparente.

Una vez enfriado a temperatura ambiente, se añadieron al matraz 300 ml de agua destilada, granallas de cinc, 100 ml de hidróxido de sodio al 33% y se procedió a la destilación. El destilado (250 ml), se recibió en una solución de ácido bórico al 4% al que se le añadieron previamente tres gotas del indicador, por último se procedió a la titulación.

Cálculos a considerar en la determinación de proteínas según el Método macroKjeldhal:

% Nitrógeno = $\text{ml}_{\text{HCl}} * \text{N}_{\text{HCl}} * \text{meq N} * 100 / \text{Peso de muestra}$

% Proteína cruda en base seca = % N * 6.25

% Proteína cruda en B.H. = % Proteína cruda(B.S.) * Materia seca/100

Determinación de grasa cruda

Fundamento:

La volatilización y condensación del éter anhidro sobre la muestra, produce una recirculación continua por medio de la cual se extrae todo el material soluble.

Procedimiento:

Se pesaron de 2 a 3 g de muestra molida y seca en papel filtro, la cual se depositó dentro del portacurcho, colocándolo en la abrazadera del aparato Goldfish. Por otro lado, el vaso para Goldfish se puso a peso constante durante dos horas a una temperatura de 100°C, se enfrió y pesó, después se le añadió éter, aproximadamente 50 ml y se colocó en el aparato para Goldfish.

Se calentó con parrilla eléctrica bajo una campana cerrada durante aproximadamente cuatro horas. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el portacurcho. Se guardó la muestra desengrasada para la determinación posterior de fibra cruda. Después se procedió a la evaporación total del éter. Se secó el extracto a 100°C, se enfrió y pesó.

Cálculo para determinación de grasa cruda:

% Grasa cruda base seca = $\text{Peso de grasa} * 100 / \text{Peso muestra}$

% Grasa cruda base húmeda = $\% \text{ Grasa cruda B.S.} * \% \text{Materia seca} / 100$

Determinación de fibra cruda

Fundamento:

La fibra cruda es la porción indigerible de los alimentos. Está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina principalmente.

La muestra seca y desengrasada se somete a una primera digestión ácida y posteriormente a una segunda digestión alcalina.

La materia orgánica del residuo obtenido es la fibra cruda.

Procedimiento:

Se pesaron de 1 a 2 g de muestra desengrasada, se colocó en el vaso digestor, se adicionaron 200 ml de ácido sulfúrico 0.25 N y se llevó a ebullición durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se filtró en tela de algodón en un Buchner y se lavó con agua destilada caliente, una vez lavado el residuo, este se transfirió cuantitativamente al vaso digestor, se le adicionaron 200 ml de hidróxido de sodio 0.31 N caliente y nuevamente se dejó ebullición durante 30 minutos. Se filtró, se lavó con agua destilada caliente. El residuo limpio se colocó en un crisol de porcelana

puesto previamente a paso constante y se llevó a la estufa para secarlo a 60-70°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, se enfrió y pesó. Posteriormente se colocó en un crisol en la mufla para calcinar el residuo a 550-600°C durante una hora. Se enfrió y pesó.

Cálculos para fibra cruda:

% Fibra cruda sd = % Fibra cruda seca y desengrasada

% Fibra cruda sd = $\text{Peso de fibra} * 100 / \text{Peso muestra}$

Peso Fibra = (Peso crisol + muestra antes de incinerar) - (Peso de crisol después de incinerar)

% Fibra cruda base seca muestra original = $\text{X FCsd} * (100 - \text{X Grasa base seca}) / 100$

% FC base húmeda = $\text{X FCBS} * \text{X Materia seca} / 100$

Determinación de extracto libre de nitrógeno

(Método de Weende)

Fundamento:

El extracto libre de nitrógeno (ELN) mide el contenido de carbohidratos no estructurales presentes en el contenido celular, éstos son monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y almidones.

El ELN se mide a través de un cálculo matemático:

$$\% \text{ ELN (base seca)} = 100 - (\% \text{PC} + \% \text{GC} + \% \text{FC} + \% \text{C})$$

$$\% \text{ ELN (base húmeda)} = \text{ELN (base seca)} * \% \text{ materia seca} / 100$$

$\% \text{ PC} = \% \text{ Proteína cruda}$

$\% \text{ GC} = \% \text{ Grasa cruda}$

$\% \text{ FC} = \% \text{ Fibra cruda}$

$\% \text{ C} = \% \text{ Cenizas}$

2.4.2 Análisis de minerales

Preparación de la muestra

Se pesaron 2 g de muestra seca y molida y se procedió a la determinación de cenizas.

Las cenizas obtenidas se disolvieron con 5 ml de ácido clorhídrico 6 N, se calentó hasta ebullición. Posteriormente se aforó a 100 ml con agua destilada. Finalmente se filtró y guardó la solución.

Determinación de calcio (Ca)

Procedimiento:

Se tomó una alícuota de 10 ml del filtrado anterior, se añadieron 5 ml de hidróxido de sodio 5 N, 1 ml de calcón, 10 gotas de cianuro de potasio, 10 gotas de clorhidrato de hidroxilamina, 10 gotas de trietanolamina y se procedió a la titulación con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.02N.

Cálculos:

$$\text{meq Ca/l} = \text{ml EDTA} * \text{N EDTA} * 1000 * \text{dilución} / \text{alícuota}$$

Determinación de calcio y magnesio (Ca y Mg)

Procedimiento:

Se tomó una alícuota de 10 ml del filtrado, se añadieron 20 gotas de solución reguladora de amonio, 5 gotas de negro de eriocromo, 10 gotas de cianuro de potasio, 10 gotas de clorhidrato de hidroxilamina, 10 gotas de ferrocianuro de potasio y 10 gotas de trietanolamina; finalmente se procedió a titular con ácidoetilendiaminotetracético 0.02N (EDTA).

Cálculos:

meq Ca-Mg/l = ml EDTA * N EDTA * 1000 * dilución / Alicuota

Determinación de magnesio (Mg)

Conociendo el valor de meq Ca-Mg/l y el valor de meq Ca/l, se puede conocer el valor de meq Mg/l por diferencia de los primeros valores.

Determinación de fósforo (P)

Fundamento:

La determinación de fósforo se basa en la reacción de los iones fosfato ($(PO_4)_3^-$), con los iones molibdato ((MoO_4)) y los vanadato ((VO_3^-)) en un medio fuertemente ácido para producir un compuesto de color amarillo llamado ácido molibdofosfórico.

El desarrollo de color se mide espectrofotométricamente.

Procedimiento:

A una alícuota de 2 ml se le añadieron 10 ml de reactivo de molibdovanadato y se aforó a 50 ml con agua destilada. Se agitó y dejó reposar durante 10 minutos; a continuación se procedió a leer la absorbancia a 400 nanómetros.

Se utilizó una solución patrón de fósforo (0.1 mg/ml), de la cual se tomaron diferentes alícuotas y se procedió de la misma forma que para la muestra. Para conocer la concentración de fósforo en la disolución se interpoló el valor de su absorbancia en la curva de calibrado que se trazó mediante las lecturas correspondientes a las disoluciones patrón de fósforo.

Cálculos:

mg P = Absorbancia / Pendiente de la curva patrón

$$\begin{aligned} & \text{50} \\ \text{mg P} & * \frac{\text{-----}}{\text{alícuota}} * 100 \\ \text{XP} & = \frac{\text{-----}}{1000 * \text{Peso muestra}} \end{aligned}$$

Determinación de hierro (Fe)

Fundamento:

El hierro se determina previa reducción al estado ferroso mediante el cloruro de hidroxilamina y formación subsiguiente de un complejo ferroso con la ortofenantrolina que es un compuesto con anillos quelados de color rojo intenso.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota de 5 ml de filtrado, el cual se ajustó a un pH entre 1.5 y 2.7, seguidamente se añadieron 2 ml de clorhidrato de hidroxilamina y 1 ml de una solución de ortofenantrolina al 1.5% y se aforó a 50 ml con agua destilada; a continuación se procedió a la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 490 nm.

La concentración de hierro en la disolución se dedujo de la curva de calibrado que se trazó mediante las lecturas correspondientes a las disoluciones patrón de hierro.

Se trabajó con una solución patrón de hierro de 10 ug/ml, se procedió de igual forma que la muestra.

Cálculos:

mg Fe = Absorbancia / Pendiente de la curva patrón

$$\text{mg Fe} * (50/\text{alícuota}) * 100$$

$$\% \text{ Fe} = \frac{\text{mg Fe} * (50/\text{alícuota}) * 100}{1000 * \text{Peso muestra}}$$

$$1000 * \text{Peso muestra}$$

Determinación de cinc (Zn)

Fundamento:

La forma ácida de la difeniltiocarbazona (ditizón) es soluble en tetracloruro de carbono, mientras que la sal de amonio es soluble en agua que contenga un ligero exceso de hidróxido de amonio. El ditizón forma complejos con el cinc, el cual puede ser extraído de una solución acuosa por tetracloruro de carbono a pH entre 8 y 10.

Procedimiento:

Se colocó en un embudo de separación una alícuota de 5 ml, se le añadieron 40 ml de ácido clorhídrico 0.02N, 50 ml de solución reguladora de citrato amónico y 3 ml de una solución de carbamatos. Se ajustó el pH a 8.5-8.8 con hidróxido de amonio o ácido clorhídrico. Se añadieron 10 ml de solución de ditizón y se agitó durante 5 minutos. La fase orgánica se transfirió a otro embudo de separación y se adicionaron 25 ml de hidróxido de amonio 0.01 N y se agitó. De la fase orgánica se tomó una alícuota de 5 ml y se aforó a 50 ml con tetracloruro de carbono, se midió la absorbancia a 540 nm. La cantidad de cinc presente se determinó por comparación con una curva patrón preparada de forma idéntica, pero con cantidades conocidas de cinc.

La solución patrón de cinc tenía una concentración de 2 µg/ml.

Cálculos:

mg Zn = Absorbancia / Pendiente de la curva patrón

mg Zn * (50/alicuota) * 100

% Zn = -----

1000 * Peso muestra

Determinación de sodio (Na) y potasio (K)

(Excitación por flama)

Fundamento:

Cuando se rocía una muestra a la flama, el disolvente se evapora o quema, dejando partículas diminutas de los compuestos sólidos presentes en la muestra. Estos se evaporan y se convierten parcialmente en átomos gaseosos. Una pequeña fracción de éstos átomos son excitados por la energía térmica. Estos átomos excitados no son estables por largos períodos y regresan al estado basal con emisión de luz ultravioleta o visible. Esta luz incide sobre un fototubo y se convierte en corriente eléctrica que se amplifica y mide, o bien, directamente.

El poder radiante de la luz emitida depende del número de átomos excitados en la flama. El poder radiante será directamente proporcional a la concentración del elemento que se desea determinar en la muestra.

Procedimiento:

Se prepararon estándares de sodio y potasio para las curvas patrón de ambos minerales.

La solución problema se introdujo en la llama exactamente en las mismas condiciones que se siguieron para la preparación de la curva patrón. Para asegurar que las condiciones se mantuvieran constantes, se verificaron los estándares antes y después del análisis. Antes de leer en el flamómetro, se calibró el aparato con las soluciones estándar a una concentración de 50 ppm cada uno. Se colocaron 20 ml de filtrado en el flamómetro y se tomó la lectura correspondiente.

Cálculos:

Lectura * dilución

ppm Na ó K = -----

Pendiente de la curva patrón

ppm Na ó K * (100/1000) * 100

% Na ó K = -----

1000 * Peso muestra

2.4.3 Determinación de plomo (Pb)

Procedimiento:

Se tomó una alícuota de 10 ml de filtrado, el cual se acidificó con ácido clorhídrico al 25%. Se calentó la solución durante 5 minutos para después neutralizarla con solución de amoníaco. Posteriormente se colocó la solución en un embudo de separación, donde se le añadieron 5 ml de solución I+, 5 ml de solución II+ y 25 ml de solución de ditizona; se agitó durante 5 minutos. La fase orgánica se filtró, aforó a 50 ml y se procedió a leer absorbancia a 515 nm.

La cantidad de plomo presente se determinó por comparación con una curva patrón preparada de forma idéntica, pero con cantidades conocidas de plomo. De igual manera se corrió un blanco.

La solución estándar de plomo tenía una concentración de 1 mg/ml

Cálculos:

Absorbancia

mg Pb= -----

Pendiente curva patrón

$$\% \text{ Pb} = \frac{\text{mg Pb} * (50/\text{alícuota})}{1000 * \text{Peso de muestra}}$$

+ Solución I: 20 g de cloruro de sodio + 10 ml de hidróxido de hidracino más 70 ml de ácido clorhídrico 1N.

+ Solución II: 20 g d carbonato de potasio + 5 g de cianuro de potasio + 5g de tartrato sódico potásico + 20 ml de solución de amoniaco al 25%.

2.4.4 Análisis de oxalatos C_2O_4 (Método Directo Volumétrico)

Fundamento:

La porción mineral de la muestra en medio ácido y los oxalatos se precipitan como oxalatos de calcio al reaccionar con una solución de calcio, separándose por centrifugación y disolviéndose con ácido sulfúrico diluido, para ser cuantificados por titulación con permanganato de potasio, al ocurrir una reacción de oxido-reducción en la que la solución sulfúrica del ácido oxálico decolora al permanganato. El MnO_4 colorido se reduce al ion manganoso Mn^{2+} (incoloro en solución).

Procedimiento:

Se pesó 1 g de muestra, se le añadieron 50 ml de ácido clorhídrico 1N, para llevarla a digestión por 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se enfrió, filtró y aforó a 50 ml con ácido clorhídrico 1N. Después se tomó una alícuota de 6 ml del filtrado a la cual se añadió 6 ml de una solución de calcio (1000 ppm Ca^{2+}); se ajustó el pH entre 8 y 9 con hidróxido de amonio 5M y enseguida se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. Transcurrido este tiempo, se decantó y al precipitado se le adicionaron 2 ml de hidróxido de amonio al 2%, se mezcló y repitió la centrifugación. Después de este tiempo, al precipitado obtenido se le adicionaron 6 ml de ácido sulfúrico 1N para posteriormente titular a 70°C con una solución de permanganato de potasio 0.02N, con agitación constante.

Cálculos:

(M-B) (V) (N) (C) (L)

ppm $\text{CaO}_e =$ -----

(S) (A) (W) (0.02)

donde:

M= ml KMnO_4 valorado gastados en la titulación de la muestra

B= ml KMnO_4 valorado gastados en la titulación del blanco

V= Volumen de aforo del extracto en ml

S= Volumen KMnO_4 valorado gastados en la titulación del patrón

A= Alicuota del extracto utilizada para el análisis

N= Normalidad del KMnO_4

W= Peso de la muestra en Kg

L= Alicuota del patrón de oxalatos en ml

C= Concentración del patrón de oxalatos (mg/ml)

2.4.5 Prueba de genotoxicidad de oxalatos in vitro

Para la realización de esta prueba, se utilizó ácido oxálico puro. Se trabajaron cinco cepas diferentes de Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA1538, TA98 Y TA100 con el fin de corroborar el tipo de mutación que causaría la sustancia problema. Asimismo se trabajaron con dos mutágenos como controles: el 2-aminoantraceno acompañado de homogenado hepático (fracción S-9) y el 1-nitropireno.

Medios y soluciones

L-histidina 0.5mM- Biotina 0.5mM

Se disolvieron 0.0077g de histidina más 0.0122g de biotina en 100 ml de agua destilada. Se guardó a 4°C en la obscuridad.

L-histidina 0.1M - Biotina 0.5mM

Se disolvieron 1.5516g de histidina más 0.0122g de biotina en 100 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave y guardó a 4°C en la obscuridad.

Solución de Sales Voguel-Bonner

En 600 ml de agua destilada se disolvieron

Sulfato de magnesio heptahidratado	10g
Acido cítrico monohidratado	100g
Fosfato de potasio monobásico anhidro	500g
Fosfato de sodio Amonio tetrahidratado	175g

Se filtró la solución y se agregó agua destilada suficiente para completar 1000 ml. Se añadió 1 ml de cloroformo y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución de Cristal Violeta

Se disolvieron 10 mg de cristal violeta en 10 ml de agua destilada. Se almacenó a 4°C.

Solución de Ampicilina

Se disolvieron 0.25g de ampicilina en 10 ml de una solución 0.02N de hidróxido de sodio. Se almacenó a 4°C.

Solución de Tetraciclina

Se disolvieron 0.0625g de tetraciclina en 10 ml de una solución 0.02N de ácido clorhídrico. Se almacenó a 4°C y protegido de la luz.

Agar de Superficie

Componentes:	Bacto agar	0.6g
	Cloruro de sodio	0.5g
	Agua destilada	100 ml
	Sol.Histidina 0,5mM-Biotina 0.5mM	10 ml

Se pesaron los ingredientes, se agregó el agua destilada y se añadió la solución de histidina 0.5mM-biotina 0.5mM. Se esterilizó en autoclave y se distribuyó en tubos con tapón de rosca estériles a razón de 2.5 ml por tubo.

Medio Mínimo E. de Voguel-Bonner

Componentes:	Bacto agar	7.5g
	Dextrosa	10.0g
	Sol. de Sales de Voguel-Bonner	10 ml

En un matraz de 1000 ml se colocó el bacto agar y se añadieron 300 ml de agua. En un matraz de 250 ml se disolvió la dextrosa en 100 ml de agua destilada. En otro matraz de 250 ml se mezcló la sol. de sales Voguel-Bonner con 100 ml de agua. Los tres matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C por 20 min. Se unieron las soluciones en el matraz de 1 l, se mezclaron perfectamente y se distribuyeron en cajas de petri estériles de 15x100 (aproximadamente 30 ml por caja).

Medio Mínimo E. Vogel-Bonner complementado con histidina

Se agregó 0.1 ml de una solución estéril de histidina 0.1M-Biotina 0.5 mM a la superficie del medio mínimo, se distribuyó uniformemente con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril hasta lograr su sequedad.

Obtención y mantenimiento de las cepas de prueba (TA98, TA1535, TA1537, TA1538, TA100)

Las cepas vienen en agar blando dentro de frascos de vidrio con tapa de rosca. Inmediatamente se tomó una asada del cultivo, se sembró en 5 ml de caldo nutritivo estéril y se incubó durante 16 hrs a 37°C con agitación.

Se prepararon los cultivos de reserva colocando 0.8 ml de la suspensión bacteriana más 0.07 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congeló rápidamente sobre hielo seco para mantenerlos después a -70°C.

Para evitar congelar y descongelar los cultivos de reserva se prepararon cajas de Petri con medio mínimo complementado con histidina en las que se sembró por estria una asada del cultivo las cuales se guardaron a 4°C hasta por 1 o 2 meses; se tomó una

colonia que se sembró en 5 ml de caldo nutritivo al que se añadieron 5 ul de una solución de ampicilina y se incubó por 16 hrs a 37°C con agitación.

Para obtener nuevos cultivos de reserva se tomaron de los cultivos de reserva a -70°C preparados inicialmente.

Requerimiento de la presencia de los marcadores genéticos y determinación de la frecuencia de reversión espontánea

Requerimiento de Histidina

Se sembró por medio de estrias el cultivo de 16 horas sobre cajas que contienen medio mínimo de Vogel-Bonner. Se hizo lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina. Solamente debe haber crecimiento en las cajas complementadas con histidina.

Sensibilidad al Cristal Violeta

Esta prueba se utilizó para verificar la presencia del marcador "rfa" (modificación de la pared celular). En una caja de medio mínimo complementado con histidina se trazó una línea con la solución de cristal violeta y se dejó secar completamente. Se tomó

una asada del cultivo y se trazó una línea perpendicular a la del cristal violeta. Se incubó a 37°C por 24 hrs. Una zona clara de inhibición sobre la línea del colorante indica la presencia del marcador.

Presencia del Plásmido

Para esta prueba se utilizaron dos cajas de medio mínimo complementado con histidina, una para ampicilina y otra para tetraciclina. Se procedió de igual manera que con la prueba al cristal violeta, solo que sustituyendo el cristal violeta por el antibiótico. Las cepas que contienen el plásmido no deben mostrar inhibición al crecimiento.

Frecuencia de reversión espontánea

Se colocó 0.1 ml del cultivo en un tubo de ensayo con tapón de rosca el cual contenía 2.5 ml de agar de superficie a 45°C, se agitó con ayuda de un vortex, se vació el contenido sobre medio mínimo de Voguel-Bonner, de manera uniforme, se dejó solidificar e incubar a 37°C. Esta prueba se hizo por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias de revertantes espontáneas que resultaron y se comprobó

la presencia de una densa capa de pequeñas colonias (con ayuda de un microscopio de disección) que resultaran como consecuencia de las trazas de histidina presentes en el agar de superficie. Esta capa de colonias tiende a desaparecer cuando el compuesto que se prueba es tóxico.

Obtención de la fracción S-9

Bajo condiciones asépticas se extrajeron de ratas machos, los hígados y se colocaron en 15 ml de una sol. de KCl 0.15 M a 4°C. Se pesaron los hígados y se transfirieron a recipientes que contenían 3 ml de KCl 0.15 M por gramo de hígado. Se cortaron y homogenizaron con un Potter-Elvehjem. Después se centrifugaron a 9000 rpm por 10 min y el sobrenadante (fracción S-9) se distribuyó en viales con tapón de rosca a razón de 1 ml. Se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se mantuvieron a 80°C. Cuando sea requerida se descongela una porción de la fracción S-9.

Mezcla S-9/ml para la prueba de mutagenicidad

Glucosa 6-fosfato	0.0013g/ml
NADP	0.003g/ml
Sol. MgCl ₂ 0.4M/KCl 1.65M	0.02 ml/ml
Amortiguador de fosfatos	0.2M pH=7.4 0.9 ml
Fracción S-9	0.1 ml/ml

Los cloruros y el buffer se mantuvieron a 4°C. Se calculó la cantidad de nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP) y glucosa 6-fosfato que se va a utilizar, se disolvieron en el amortiguador y se añadió de cloruros. La solución resultante se filtró en un filtro Millipore estéril. La mezcla S-9 se mantuvo a refrigeración (4°C).

2.4.5.1 Prueba de mutagénesis de ácido oxálico

Protocolo de mutagénesis

A los tubos 1, 3, 4, 5, 6 que se muestran en el cuadro 2.1 se le añadieron 0.4 ml de cultivo bacteriano de 16 hrs.; 2.4, 2.36, 2.32, 2.20, 2.0 ml de amortiguador de fosfatos respectivamente. A los tubos 3, 4, 5, 6 se adicionaron 40, 80, 200 y 400 ul de solución del compuesto problema.

A los tubos 2, 7, 8, 9, y 10 se añadieron 0.4 ml de cultivo bacteriano, 2.0 ml de fracción S-9, 0.36, 0.32, 0.20, 0.0 ml de amortiguador de fosfatos y 40, 80, 200 y 400 ul de solución problema respectivamente. Al tubo 11 se adicionaron 0.4 ml de cultivo bacteriano, 2.0 ml de fracción S-9, 0.36 ml de amortiguador de fosfatos y 40 ul de 2-aminoantraceno. Para el tubo 12, se colocaron 0.4 ml del cultivo bacteriano, 2.36 ml de amortiguador y 40 ul de 1-nitropireno. Todos los tubos se llevaron

a incubación con agitación a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se colocaron 0.7 ml de la solución de cada tubo en 2.5 ml de agar de superficie precalentado a 45°C. El contenido de la mezcla se agitó con ayuda de un vortex y se distribuyó sobre el medio mínimo de Vogel-Bonner, de manera que quedara una capa uniforme. El procedimiento anterior se efectuó rápidamente ya que la mezcla S-9 podía inactivarse a 45°C. Las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se incubaron invertidas a 37°C por 72 hrs. Cada punto se hizo por triplicado.

Para determinar si la ausencia de colonias revertantes se debe a un resultado negativo o a la presencia de toxicidad, se recomienda observar las cajas de Petri en un microscopio estereoscópico. Si la muestra es tóxica, se observará la ausencia del crecimiento de una densa capa de pequeñas colonias, las cuales resultan como consecuencia de las trazas de histidina presentes en el agar de superficie.

2.4.5.2 Prueba de antimutagénesis de ácido oxálico

Protocolo de antimutagénesis

Para el protocolo de antimutagenesis, mostrado en el cuadro 2.2 al tubo 1 se le añadieron 0.4 ml de cultivo bacteriano, 2.4 ml de amortiguador de fosfatos y 40 ul del mutágeno control. Al tubo

2 se le adicionaron 0.4 ml de cultivo bacteriano 2.0 ml de fracción S-9, 0.4 ml de amortiguador y 40 ul de mutágeno. A los tubos 3, 4, 5 y 6 se le agregaron 0.4 ml de cultivo bacteriano, 2.0 ml de fracción S-9, 0.36, 0.32, 0.20, de amortiguador de fosfatos, 40, 80, 200 400 ul de solución problema y 40 ul del mutágeno control respectivamente.

Para el caso del 1-Nitropireno no se añadió fracción S-9, por tanto se complementa el volumen final de 2.8 ml, con solución de amortiguador de fosfatos. Una vez preparados todos los tubos, se procede de igual manera que en el protocolo de mutagénesis.

Interpretación de Resultados

Un resultado positivo del efecto mutagénico de un compuesto dado se define como un aumento del doble en el número de revertantes espontáneas y que tal incremento esté en función de la concentración del compuesto.

La mutagenicidad de un compuesto puede manifestarse a concentraciones por debajo de su nivel tóxico o muy cercanas. El crecimiento de una densa capa de colonias pequeñas que aparece normalmente en las cajas, debido a las trazas de histidina presentes en el agar de superficie, tiende a desaparecer en caso de que la muestra resulte tóxica.

Para que un compuesto dado se considere como agente antimutagénico, el crecimiento de las colonias revertantes debe disminuir en un 50% con respecto al número de colonias inducidas por el mutágeno utilizado como control positivo.

**Cuadro 2.1 Protocolo de mutagénesis de ácido oxálico
en Salmonella typhimurium**

Cepas TA98, TA1535, TA1537, TA1538, TA100

DATO No	CULTIVO BACTERIANO (ml)	FRACCION S-9 (ml)	AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (ml)	ACIDO OXALICO (ug)	COLONIAS REVERTANTES
1	0.4	-	2.4	-	
2	0.4	2	0.4	-	
3	0.4	-	2.36	500	
4	0.4	-	2.32	1000	
5	0.4	-	2.20	2500	
6	0.4	-	2.0	5000	
7	0.4	2.0	0.36	500	
8	0.4	2.0	0.32	1000	
9	0.4	2.0	0.20	2500	
10	0.4	2.0	-	5000	
11	0.4	2.0	0.36	40	2A-A*
12	0.4	-	2.36	40	1n-p*

* Mutágenos control: 2-amino-antraceno (2A-A)=100ug/1000 ul
(Todas las cepas)
nitro-pireno (1N-P) =[3 ug/ml] para la TA100
nitro-pireno (1N-P)=[0.05 ng/10 ul] (TA98)
nitro-pireno (1N-P)=[5ng/10 ul]
(Cepas TA1535, TA1537, TA1538)

Cuadro 2.2 Protocolo de antimutagénesis de ácido oxálico
 en Salmonella typhimurium

Cepa TA98

DATO No	CULTIVO BACTERIANO (ml)	FRACCION S-9 * (ml)	AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (ml)	ACIDO OXALICO (ug)	MUTAGENO COL REVER (ul)
1	0.4	-	2.4	-	40
2	0.4	2.0	0.4	-	40
3	0.4	2.0	0.36	500	40
4	0.4	2.0	0.32	1000	40
5	0.4	2.0	0.20	2500	40
6	0.4	2.0	-	5000	40

Mutágenos: 1-Nitropireno= (5 ng/10 ul)
 2-Aminoantraceno=(100 ug/1000 ul)

* Para el experimento con 1-Nitropireno, no se usó la fracción S-9.

CAPITULO 3

3. Resultados y discusión

Los ensayos de mutagenicidad y antimutagenicidad del Acido oxálico así como el análisis químico de la verdolaga y la cuantificación de los oxalatos, se llevaron a cabo a la par, debido a la disponibilidad existente de equipo y reactivos en el laboratorio.

3.1 Análisis proximal de Portulaca oleracea L. (verdolaga)

Los resultados analíticos obtenidos, fueron evaluados estadísticamente siguiendo las metodologías del análisis de varianza (S²), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y media aritmética (X) Anexo 5.

La verdolaga fresca y cruda fue analizada mediante un análisis proximal. El cuadro 3.1 proporciona la composición nutricional de la verdolaga. Como se observa, este vegetal se caracterizó por su baja concentración de grasa, 2.53 % ; y por su alto contenido de humedad, 94.66 % .

Comparando nuestros resultados con otros autores (Cuadro 1), se observó que existen aparentemente diferencias en los resultados, pero al hacer un análisis estadístico (Anexo 6), solo los minerales y carbohidratos tuvieron una variación estadística significativa. Esto se debió posiblemente a la calidad de los reactivos utilizados en las determinaciones, ya que muchas veces

Cuadro 3.1 Análisis proximal de Portulaca oleracea L. (verdolaga)
(g / 100 g muestra)

ANÁLISIS	BASE SECA	BASE HÚMEDA	*BASE HÚMEDA	+BASE HÚMEDA
HUMEDAD	94.68	---	91	90.54
MATERIA SECA	5.34	---	---	---
CENIZAS	15.95	0.85	---	2.74
PROTEÍNA CRUDA	29.34	1.56	2.3	2.73
GRASA CRUDA	2.53	0.13	0.3	0.22
FIBRA CRUDA	15.02	0.8	0.8	1.00
CARBONHIDRATOS	37.17	1.99	4.9	2.77

* Fuente: Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán " (1987)

+ Fuente: Cerrillo Valdez Martha, Tesis profesional (1991)

por cuestiones de disponibilidad y costo se hacen cambios de los mismos, aún trabajando la misma técnica; así como al margen de error y al analista.

3.2 Análisis de minerales de *Portulaca oleracea* L. (verdolaga)

Como sabemos, cierto número de minerales deben ser ingeridos diariamente para mantener la salud; por tal motivo se realizó el análisis de minerales, con el propósito de determinar si la verdolaga cumplía con los requerimientos diarios recomendados en la dieta (Cuadro 3.2.1).

El cuadro 3.2 presenta la composición mineral de la verdolaga siendo el potasio, 8.2% ; el magnesio, 1.49% y el calcio, 0.89% los mayoritarios; y en menor proporción el cinc, el fósforo y el hierro. Esto nos indica que si consumimos 300 gramos aproximadamente de verdolaga (base seca), se logran cubrir perfectamente los requerimientos de calcio (2670 mg), magnesio (4485 mg), fósforo (1239 mg), cinc (31.2 mg) a excepción del hierro del cual se necesitaría consumir 400 g de la planta para obtener 21 mg de este mineral y así alcanzar dicho requerimiento.

Cuadro 3.2 Análisis de minerales de Portulaca oleracea L. (verdolaga)
(Base seca)

MINERAL	%	(mg/100g muestra)
SODIO (Na)	0.29	2.90
POTASIO (K)	8.2	8200
CALCIO (Ca)	0.89	890
MAGNESIO (Mg)	1.99	1495
FOSFORO (P)	0.413	413
HIERRO (Fe)	0.0052	5.25
CINC (Zn)	0.0104	10.4
PLOMO (Pb)	---	---
TOTAL	11.29	11298

3.3 Análisis de plomo

Del análisis de plomo realizado, se observó que la planta carecía de este metal pesado, lo cual nos da una idea de las buenas prácticas agrícolas al que fue sometido este cultivo de verdolaga en particular.

Toda esta información nutricional de la verdolaga es importante tenerla presente en nuestra alimentación cotidiana, con el propósito de poder variar y alternar con otros alimentos, ya que complementa y asegura al organismo parte de los requerimientos diarios de macronutrientes y micronutrientes y así lograr el buen funcionamiento de nuestro organismo.

3.4 Análisis de oxalatos

La verdolaga además de ser estudiada desde un enfoque nutricional fue evaluada desde el punto de vista toxicológico, tomando como punto de partida a los oxalatos, compuestos químicos presentes en ella de forma natural.

El cuadro 3.3 muestra los resultados obtenidos del análisis de oxalatos en la verdolaga fresca, sucia y cocida a diferentes tiempos. Como se observa, en todas las muestras analizadas los valores de oxalatos oscilaron entre 1% y 2% .

La verdolaga sucia presentó un contenido de oxalatos mayor con respecto a la limpia, esto se debió a la eliminación de los

Cuadro 3.3 Análisis de oxalatos en Portulaca oleracea L. (verdolaga)
Método Directo Volumétrico

MUESTRA	BASE SECA		BASE HUMEDA	
	Oxalatos	Oxalatos	Oxalatos	Oxalatos
	(ppm)	(%)	(ppm)	(%)
VERDOLAGA SUCIA	14579.2	1.65	88.36	0.088
VERDOLAGA FRESCA (Limpia)	10010.0	1.00	53.35	0.0533
VERDOLAGA COCIDA (10 min)	19449.0	1.94	103.66	0.1
VERDOLAGA COCIDA (15 min)	19489.8	1.94	103.89	0.1

oxalatos solubles durante el lavado.

Uno de los intereses principales de este estudio se centró en establecer la posibilidad de lograr una disminución en el contenido de oxalatos por efecto de la temperatura. La literatura reporta diferentes métodos de cocción no sólo para verdolaga sino también para espinaca en los que se añaden diversas sustancias como sal común (3%), leche en polvo descremada (5%), garbanzo (5%) o se lleva a cabo un proceso de blanqueado seguido de la congelación bajo condiciones de trabajo específicas, todo esto con el propósito de disminuir la concentración de los oxalatos. Sin embargo, en este estudio se quiso proceder de una manera más sencilla y apegada a lo que se hace comúnmente en el hogar. Para esto, se coció la verdolaga a diferentes tiempos (10, 15 y 20 minutos) a una temperatura de 90°C con el fin de evaluar el efecto de la temperatura sobre los oxalatos.

En comparación con la verdolaga fresca, la verdolaga sometida a tratamiento térmico de 90°C a diferentes tiempos mostró, en contraparte a lo que se esperaba, más que una disminución en el nivel de oxalatos, una ligera elevación (0.94 %) sin que este aumento fuera estadísticamente significativo (Ver Anexo 7). Este hecho se atribuye a la posible liberación de los oxalatos o del mismo ácido oxálico que se encontraba en el interior de las vacuolas de la planta. Ambos, probablemente unidos a otros compuestos por fuerzas electrostáticas o formando puentes de

hidrógeno. También hay que considerar que al someter una muestra al calor, existe pérdida de agua a nivel celular y por tanto los compuestos insolubles en ella tienden a concentrarse aún más.

Por otra parte, el contenido de oxalatos en la verdolaga cocida se manifestó sin cambios para los tiempos de 10 y 15 minutos por lo que se eliminó el último tratamiento de 20 minutos.

Basándonos en los resultados del cuadro 3 y tomando en cuenta la DL₅₀ para el humano (5 g/ 68 Kg) reportada en la literatura, se puede asumir lo siguiente: para conseguir un efecto dañino de los oxalatos en nuestro organismo se necesitarían consumir 500g (base seca) y 1000g (base húmeda) de verdolaga, fenómeno que no ocurre en nuestra vida diaria, puesto que a lo sumo, una persona consumirá 250g aproximadamente en un platillo, el cual no consume diariamente. Por lo tanto, se puede inferir que los oxalatos no tienen efecto tóxico a corto plazo. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que de que se pudiese manifestar un efecto tóxico crónico si el paciente tuviera un estado fisiopatológico particular que pudiera predisponer la formación de cálculos renales.

3.5 Mutagénesis de ácido oxálico

En los cuadros 3.4 y 3.5 se presentan los resultados del crecimiento alcanzado para las cinco cepas bacterianas, en presencia del ácido oxálico a diferentes concentraciones y en ausencia de él (control). Se observó que este crecimiento fue similar en ambos casos, pues el promedio de colonias revertantes desarrolladas en caso del ácido oxálico no supera ni siquiera en un 50% el promedio de las del control, ya que para que un compuesto se considere mutagénico se necesita que haya un crecimiento bacteriano del 100% o más con respecto al control. Por el contrario en algunos casos se observó una disminución con respecto al blanco, posiblemente por cuestiones técnicas. Todo esto nos hace pensar que el ácido oxálico no tiene efecto mutagénico sobre las cepas de prueba. Esto ocurrió de igual forma en ambas estrategias: con y sin inducción hepática. Los valores presentados son los promedios correspondientes a las tres cajas Petri que contenían el desarrollo microbiano.

En base a estos resultados, se realizaron las gráficas dosis-respuesta del ácido oxálico, con el fin de mostrar de una manera más clara lo dicho anteriormente (Gráfica 1 y 2)

Por otro lado, se detectó la toxicidad del ácido oxálico, es decir, se observó un efecto letal, para las cepas TA98 Y TA1537 a una dosis de 5000ug/caja. Esto se comprobó mediante la

Cuadro 3.4 Metabolismo del ácido oxálico sin inducción hepática

Conc. (a) (μg)	TA99		PROMEDIO TA99 (c)	TA1537		PROMEDIO TA1537	TA1538			PROMEDIO TA1538	
	(b)	(b)		(b)	(b)		(b)	(b)	(b)		
0	47	33	40.33	8	8	7	7.67	37	42	39	39.33
500	53	29	44.33	4	17	13	11.00	34	32	22	29.33
1000	38	35	37.67	9	9	10	9.00	25	21	13	20.00
2500	39	40	41.67	25	7	10	10.67	34	29	29	30
5000	48	41	45.00	13	17	30	16	21	29	29	29.67

Conc. (a) (μg)	TA1535		PROMEDIO TA1535	TA100		PROMEDIO TA100	
	(b)	(b)		(b)	(b)		
0	22	31	26	149	154	140	133
500	26	34	25.67	160	140	136	145.33
1000	38	29	32.67	144	143	114	133.67
2500	25	31	29.67	127	107	92	109.67
5000	35	29	32.67	115	120	109	111.67

(a) Concentración del ácido oxálico (50 μg /caja)

(b) Colonias revertantes por copa (triplicado)

(c) Promedio de revertantes por copa

El promedio de colonias revertantes para cada copa, con el control positivo fue:

TA99, 44.67 TA935, 21.67

TA1537, 29.33 TA100, 129

TA1538, 47.33

Control positivo, metilgms: 1-nitropireno (5 μg /10ul) (Copa TA1535, 1537, 1538)1-Nitropireno (0,83 μg /10 ul) (Copa TA 98)1-Nitropireno (3 μg / ul) (Copa TA 100)

Cuadro 3.5 Metagenesis del ácido Acido oxálico con inducción lumínica

Conc. (a) (ug)	TA99 (b)	PROMEDIO TA99 (c)	TA137	PROMEDIO TA137	TA138	PROMEDIO TA138
0	57	46 45 49.33	13	12 18 14.33	36	22 35 31.00
500	40	44 60 48.00	19	12 15 15.33	15	24 27 26.00
1000	61	66 49 58.67	19	8 13 14.00	23	26 27 26.00
2500	45	39 38 38.60	7	17 16 19.33	30	29 29 29.00
5000	37	32 29 29.66	14	7 10 10.33	38	32 28 32.67

Conc. (a) (ug)	TA135	PROMEDIO TA135	TA100	PROMEDIO TA100
0	33	17 12 25.67	145	148 147 146.00
500	19	16 23 14.67	150	147 104 139.67
1000	17	22 11 16.67	116	149 144 149.67
2500	18	14 16 16.00	175	130 153 153.33
5000	25	24 12 20.33	145	170 173 170.00

(a) Concentración del ácido oxálico (50µg/ml/caja)

(b) Colonias revertantes por cepa (triplicado)

(c) Promedio de revertantes por cepa

El promedio de colonias revertantes para cada cepa, con el control positivo fue:

TA99, 45.33

TA135, 50.33

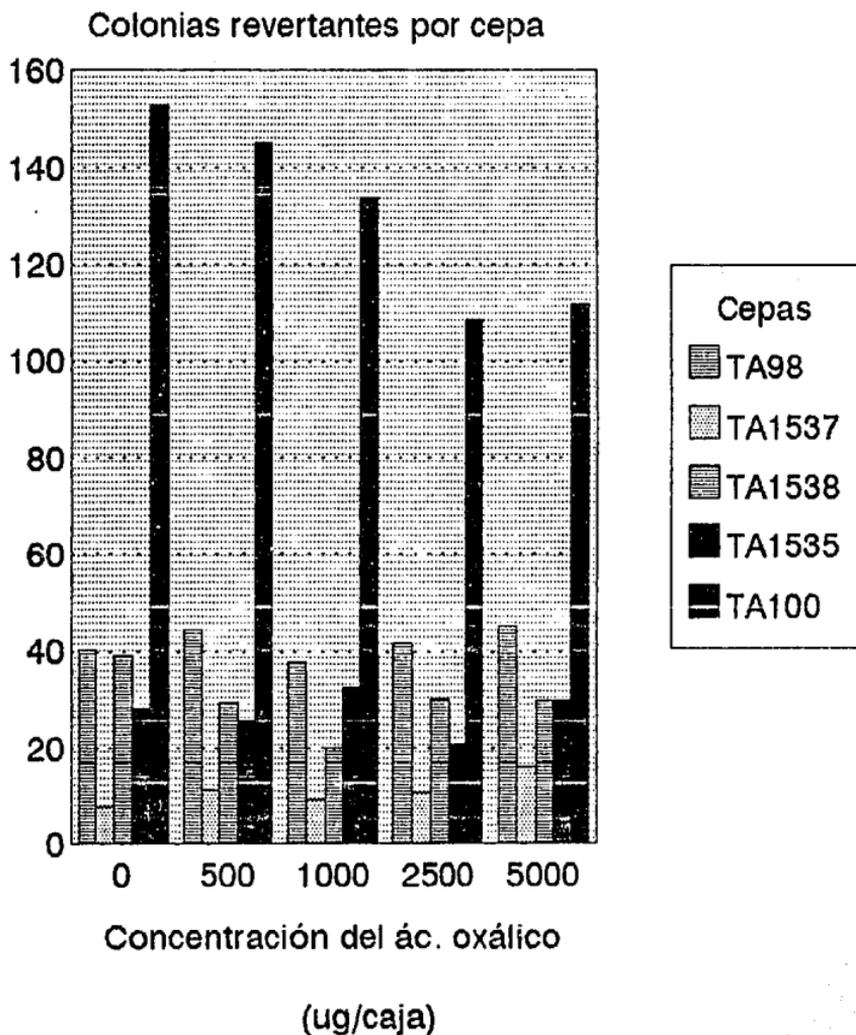
TA137, 39

TA100, 242.67

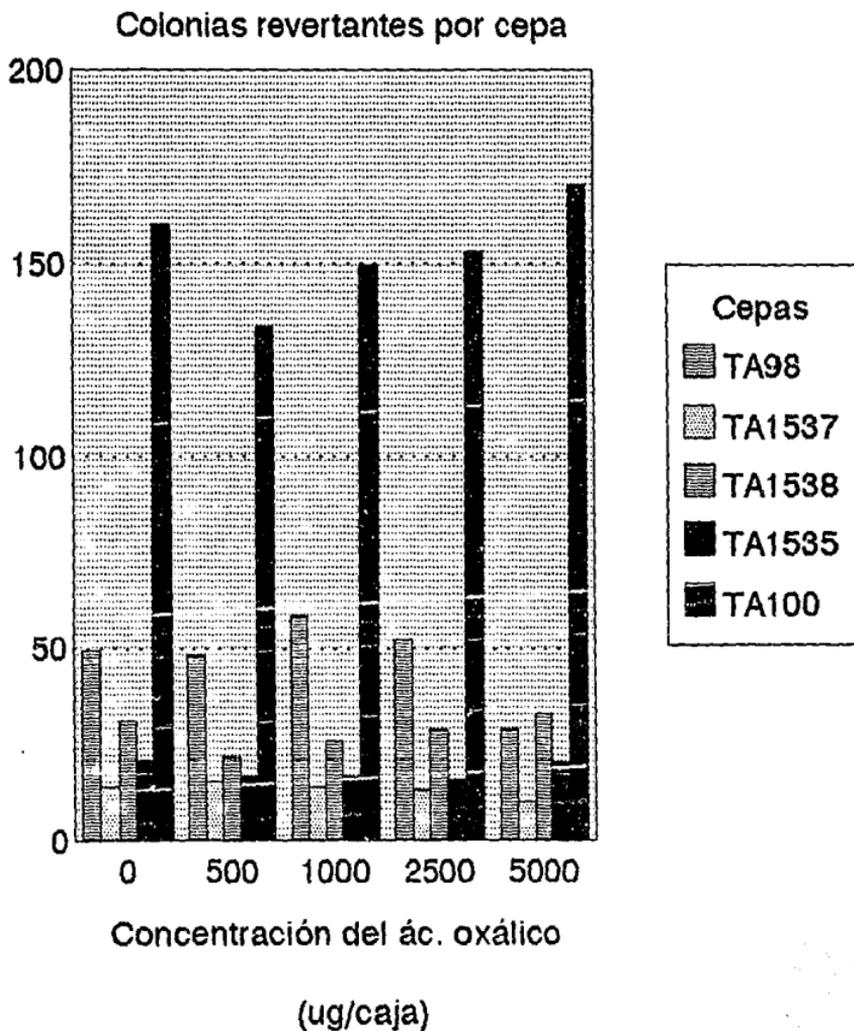
TA138, 306.67

Control positivo, mutágeno: 2-aminoantraceno (100 µg/1000 ul) (Todas las cepas)

Gráfica 1 Mutagénesis del ácido oxálico sin inducción hepática



Gráfica 2 Mutagénesis del ácido oxálico con inducción hepática



observación del crecimiento bacteriano de fondo que se efectuó a las cajas Petri que contenían las colonias revertantes, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Esta prueba sirvió sólo para seleccionar las concentraciones del compuesto problema a las cuales se iba a trabajar en el experimento; esto con el fin de evitar resultados falsos negativos ya que la mutagenicidad de un compuesto puede manifestarse a concentraciones por debajo de su nivel tóxico o muy cercanas a él. Por lo tanto, ésta letalidad que se observó en las cepas de prueba, no se puede traducir en nada con respecto al ser humano, ya que ésta prueba sólo sirvió para algo específico e intrínseco del sistema de prueba.

3.5.1 Prueba de antimutagénesis de ácido oxálico

Para explorar la posible acción antimutagénica del ácido oxálico, se probaron dos mutágenos muy potentes, es decir, dos mutágenos por medio de los cuales se obtuvieran una gran cantidad de colonias mutantes; gracias a este efecto se pueden detectar disminuciones del mismo cuando se prueba un compuesto problema, en este caso, el ácido oxálico. Los mutágenos potentes que se utilizaron para esta prueba fueron: el 1-nitropireno que es un mutágeno directo y el 2-amino-antraceno, el cual necesita de activación metabólica para ser mutagénico.

Los cuadros 3.6 y 3.7 muestran los resultados obtenidos de la antimutagénesis del ácido oxálico, utilizando el 1-nitropireno y el 2-amino-antraceno respectivamente. Estos resultados revelaron la ausencia total de un posible efecto antimutágeno del ácido oxálico sobre las cepas estudiadas. Se observó que en lugar de haber un crecimiento de colonias revertantes mucho menor a la del control positivo, ocurrió todo lo contrario, dicho crecimiento se elevó por encima del control, pero esto se debió principalmente a la acción misma de los mutágenos control más que a un posible efecto de mutagénesis del compuesto problema. Estos resultados se ilustran de manera más clara en las gráficas 3 y 4.

Cuadro 3.6 Antimutagénesis del ácido oxálico sin inducción hepática

	Conc. (a) [µg]	Conc. (b) [ng/ml]	TA 98 (c)			PROMEDIO TA 98 (d).
.	0	0	28	29	32	29.83 .
.	0	0.5	77	96	89	87.33 .
.	400	0.5	134	122	129	128.33 .
.	1000	0.5	115	123	123	120.33 .
.	2500	0.5	139	143	128	137.33 .
.	5000	0.5	100	134	122	121.33 .

(a) Concentración del ácido oxálico (50µg/ul)

(b) Concentración del mutágeno control (1-Nitropireno=5 ng/10 ul)

(c) Colonias revertantes por cepa (triplicado)

(d) Promedio de revertantes por cepa

Cuadro 2.7 Antimutagénesis del ácido oxálico con inducción hupítica

	Conc. (a) (ug)	Vol. (b) (ul)	Conc. (c) (ug/ul)	TA 98 (d)			PROPEDIA TA 98 (e)
.	0	0	0	89	21	25	21.67 .
.	0	2	0.1	432	432	457	439.67 .
.	300	2	0.1	472	445	466	447.67 .
.	1000	2	0.1	450	450	410	436.67 .
.	2300	2	0.1	670	610	650	643.33 .
.	5000	2	0.1	810	908	361	819.67 .

(a) Concentración del ácido oxálico (50ug/ul/caja)

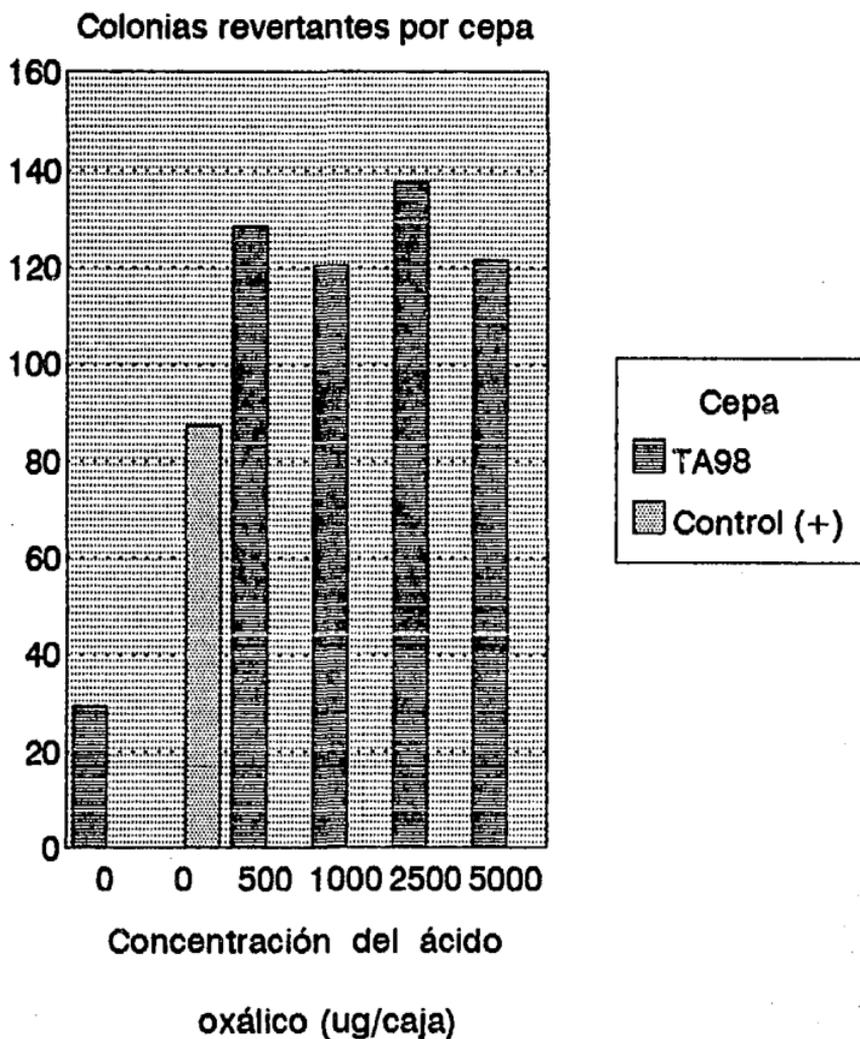
(b) Volumen de homogenado hupítico (fracción 9-9)

(c) Concentración del antígeno control (2-antiostraceno= 100 ug/1000 ul)

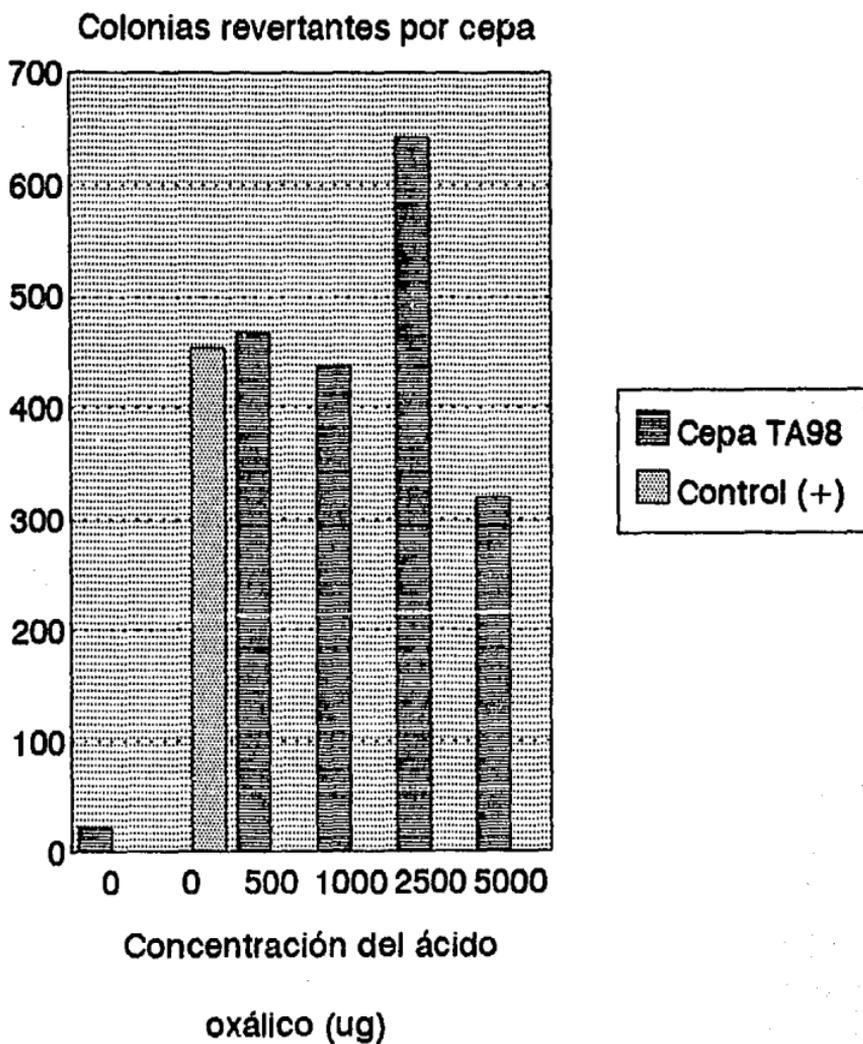
(d) Colonias revertantes por capa (triplicado)

(e) Promedio de revertantes por capa

Gráfica 3 Antimutagénesis del ácido oxálico sin inducción hepática



Gráfica 4 Antimutagénesis del ácido oxálico con inducción hepática



CAPITULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

Portulaca oleracea L. (verdolaga) es un alimento rico en proteínas (29.34%), carbohidratos (37.17%) y fibra cruda (15.02%). Proporciona cantidades apreciables de minerales como potasio (8.2%), magnesio (1.49%) y calcio (0.89%).

La verdolaga fresca y cruda presentó niveles de oxalatos que oscilaron entre un 1% y 2%, niveles bajos comparados con el que reporta la literatura para la espinaca (10%).

Al someter la verdolaga a cocción durante 10 y 15 min, el contenido de oxalatos aumentó aparentemente en un 0.94% con respecto a la fresca, posiblemente esto se deba a cuestiones técnicas del analista más que a una cuestión química. Sin embargo este aumento no fue estadísticamente significativo.

No se observaron variaciones importantes en la disminución de los oxalatos para el intervalo de tiempo evaluado.

La cantidad de oxalatos presentes en verdolaga será siempre variable. Por lo tanto, sería interesante, para estudios

posteriores, monitorear el contenido de oxalatos durante la temporada primavera-verano, ya que este trabajo se efectuó con verdolaga colectada en la época otoño-invierno, particularmente durante los meses Enero-Febrero, y se encontró que la concentración de los oxalatos se mantuvo muy baja (menos del 2%). De esta manera se estudiaría el comportamiento o movimiento de los oxalatos en cada época pues se piensa que este es un factor importante a considerar para la cuantificación de los mismos.

El ácido oxálico y por ende los oxalatos presentes de forma natural en Portulaca oleracea L. (verdolaga) no representan un peligro para el que lo consume desde el punto de vista toxicológico y genotóxico.

Con la realización de este estudio se aportan datos novedosos con respecto a la mutagenicidad de los oxalatos, que si bien no están presentes en verdolaga en elevadas concentraciones por lo menos lo están en otras plantas comestibles.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Trease, G. , Evans, W. C.. "Tratado de Farmacognosia", 12a ed. México, Interamericana, 1988.
- 2.- Richardson, M. "Flavonols and c-glycosyflavonoids of the Caryophyllales". Biochemical Systematics and Ecology. vol. 6, 1978.
- 3.- González, Stuart, Armando. "Plantas tóxicas para el ganado". 1a ed. México, Limusa, 1989.
- 4.- Bourges, R, Héctor. "Panorama de la alimentación y la nutrición en México" Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1984.
- 5.- Verhagen, H. " Genetic toxicology and nutrition " TNO, Toxicology and Nutrition Institute Zeist, The Netherlands. Eurotox, European Societies of Toxicology. vol 16 (3), October 1993.
- 6.- Fuentes, L. "Subnutrición, Ideología y Deterioro". Instituto de Geografía, UNAM, 1984.
- 7.- "Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos: tablas de uso práctico". Instituto Nacional de la Nutrición México, 1977.
- 8.- Ames, B. N., Magaw, R., Gold, L. S. "Ranking possible carcinogenic hazards". Science, 236, 1987.
- 9.- Ames, B. N. " Dietary carcinogens and anticarcinogens". Sciens, 221, 1983.
- 10.-Hatch, F. and Felton, S. " Toxicology Strategy for Mutagens and Carcinogens formed in foods during cooking: Status and needs. Genetic toxicology of the diet, progress in clinical and biological research, Alan R Liss Inc., New York. vol 26, 1986.

- 11.- Ames, B. N., Mccan, J.
 "Methods for detection carcinogens and mutagens with the
 Salmonella mammalian microsome mutagenicity test".
 Mutation Research, 31, 1975.
- 12.- Derache, R.
 "Toxicología y Seguridad de los Alimentos".
 España, Omega, 1990.
- 13.- Cheeke, P. R. and Shull, L. R.
 "Natural Toxicans of Feeds and Poisonous Plants".
 Avi, USA, 1985.
- 14.- Fisher, J.W., ed..
 "Kidney Hormones".
 Academic Press, Inc., New York, 1970.
- 15.- Trosko, J. E., Chang, Ch.
 "Relationship between mutagenesis and carcinogenesis".
 Photochem. Photobiol. 28: 157, 1978.
- 16.- Kalter, H.
 "Correlations between teratogenic and mutagenic effects of
 chemicals in mammals. En: Chemical Mutagens, Principles and
 Methods for their Detection".
 Ed. A. Hollaender, vol. I, 1971.
- 17.- Claxton, D. L., Barry, P. Z.
 "Chemical Mutagenesis: An emerging issue for public health".
 Am. J. Public Health. 67: 1037, 1977.
- 18.- Newcombe, H. B.
 "Problems for assesing the genetic impact of mutagens on
 man".
 Can. J. Genet. Cytol. 20: 459, 1978.
- 19.- en: Chemical Mutagens.
 "Principles and Methods for their Detection".
 Ed. Ad. Hollander, Vol I al VII, 1971, 1978.
- 20.- Cortinas de Nava, Ostrosky, P., Galván, S.
 "Principios de Mutagénesis y su relación con Carcinogénesis
 y Teratogénesis".
 Manual de métodos para la identificación de mutágenos y
 carcinógenos químicos ambientales.
 Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, vol 1, 1980.

- 21.- Sugimura, T. Sato, S., Takagama, S., et al.
 "Overview: Mutagens and Carcinogens in Cooked Food".
 Genetic, Toxicology of the diet, progress in clinical and
 biological research.
 Alan R Liss, Inc., vol. 26, 1986.
- 22.- Kato, T., Kikugawa, K., and Hayatsu, H.
 "Occurrence of the mutagens 2-Amino-3, 8-dimethylimidazol
 [4, 5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-Amino-3, 4, 8-trimethyl-
 imidazol[4, 5-f]quinoxaline (4, 8-Me2IQx) in some Japanese
 Smoked, Dried Fish Products".
 J. Agric. Food Chem., 34, 1986.
- 23.- Miller, J.
 "Naturally occurring substances that can induce tumors".
 Toxicants Occurring naturally in foods.
 National Academy of Sciences Washington D.C., 1973.
- 24.- Kada, T., Inoue, T., Morita, K., and Namiki, M.
 "Dietary desmutagens".
 Genetic Toxicology of the diet, progress in clinical
 research.
 Alan R Liss, N. Y., vol 26, 1986.
- 25.- Kuroda, Y., and Inoue, T.
 "Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria"
 Mut. Res. 202, 1988.
- 26.- Hartman, P., and Shankel, M.
 "Antimutagens and Anticarcinogens: a survey of putative
 interceptor molecules".
 Environmental and Molecular Mutagenesis, 15, 1990.
- 27.- Trosko, J.E., Cheng, Ch.
 "Environmental carcinogenesis and integrative model".
 Quarterly Rev.Biol. 53: 115, 1978.
- 28.- Ramel, C.
 "The detection and control of mutagenic and carcinogenic
 compounds in the environment".
 AMBIO.7: 244, 1978.
- 29.- Espinosa, J.
 "Método para la evaluación de mutaciones génicas con
Salmonella typhimurium".
 Manual de métodos para la identificación de mutágenos y
 carcinógenos químicos y ambientales.
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, 1980.

- 30.- Avilés, A.
 "Manual práctico de técnicas optimizadas para análisis toxicológico".
 Tesis de Licenciatura, Fac. de Química, UNAM, 1987.
- 31.- Avila, F. I., Suárez, R. G. y Calderón, M.
 "Estudio comparativo de oxalatos y Nitratos en seis genotipos de amaranto (A. hypochondriacus L.) en Pedro Escobedo, Gro".
 Departamento de Zootecnia. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.
- 32.- Charley, Helen.
 " Tecnología de alimentos "
 2a ed. México, Limusa, 1991.
- 33.- Sidney, W. B.
 "Cálculos Químicos"
 15a reimp. México, Limusa, 1992.
- 34.- Committe of food protection
 "Toxicants occurring naturally in foods"
 National Academy of Sciences
 2a ed. Washington, USA, 1973.
- 35.- Linder, E.
 " Toxicología de los alimentos "
 Acribia, Zaragoza, España, 1978.
- 36.- Pearson, D.
 "The Chemical Analysis of Foods and Foods Products"
 7a ed. Great Britain, 1976.
- 37.- Snell, F. R., Snell, C. A.
 "Colorimetric methods of analysis, including Photometric methods" Vols II and II-A
 D.Van Nostrand Co. New Jersey, USA 1959.
- 38.- Trejo, Benitez, F. J.
 "Método Científico Experimental"
 Ed. Secretaría de Divulgación, UNAM, 1990.
- 39.- Tecla, J. A.
 "Teoría, métodos y técnicas en la investigación social"
 13a ed. Taller Abierto, México, 1983.

- 40.- Tabekhia, M.M.; Toma, R. B; El-Mahdy, A. R.
 "Effect of Egyptian cooking methods on total free oxalates
 and mineral contents of two leafy , green vegetables
 (Jew's mellow and Purslane) "
 Nutrition Reports International: 18(5) 611-616 1978.
- 41.- Fatoki, D. S.
 "Ambient temperature acid extraction method for the
 determination of oxalic acid contents of vegetables"
 Journal of Agricultural and food Chemistry.
 39 (2) 293-295 1991.
- 42.- Richter, E.; Handke, S.
 "Influence of Blanching and preservation by air drying at
 different temperatures, deep-freezing and freeze-drying on
 the oxalic content of spinach"
 Zeitschrift-fuer-lebensmittel-Untersuchung-und-Forschung
 153(1) 31-36 1973.
- 43.- Adriaanse, A.
 "A modified method for total oxalate determination in
 vegetables"
 Zeitschrift-fuer-Lebensmitteluntersuchung-und-Forschung
 141 (3) 158-60, 1969.
- 44.- Singh, P. P.
 "Effect of maturity on the oxalate and cation contents
 of wix Leafy vegetables"
 Indian-Journal of Nutrition and Dietetics
 9 (5) 269-276, 1972.
- 45.- Toma, R. B.
 "Trials to reduce soluble oxalates in home prepared
 spinach"
 Deutsche-Lebensmittel-Rundschau;75(7) 212-214, 1979.
- 46.- Tabekhia, M. M.
 " Total and free oxalates, calcium, magnesium and iron
 contents of home fresh vegetables"
 Deutsche-Lebensmittel-Rundschau;75(8) 280-282, 1980.
- 47.- Yamanaka, H. "Determination of oxalate in foods by enzymatic
 analysis" Journal of the Food Hygienic Society of Japan
 24 (5) 454-458, 1983.
- 48.- Parry, O; Okwvasaba, F; Ejike, C.
 " Effect of an aqueous extract of Portulaca oleracea
 leaves on smooth muscle and rat blood pressure
 Journal of Ethnop Pharmacology, (22) 33-44, 1988.

- 49.- El-Sherbiny-GA; Rizh-SS; El-Shiaty-MA
 " The effect of different methods of blanching
 on the quality attributes of frozen spinach
 (Spinacia oleracea)"
 Egyptian Journal of Food Science 14 (1) 75-81, 9 ref, 1986.
- 50.- Lehninger, L. Albert
 " Bioquímica"
 2a ed. Barcelona, Omega, 1980.
- 51.- Ganong, F., William.
 " Manual de fisiología médica "
 México, Manual Moderno, 1978.
- 52.- Klingman, Glenn, C.
 " Estudio de las plantas nocivas: principios y prácticas "
 México, Limusa, 1980.
- 53.- Enciclopedia Universal Ilustrada vol. 40
 Madrid, Espasa Calpe, 1989.
- 54.- Argueta, Villamar, Victor
 " Metabolismo de oxalatos". Comunicación Personal.
 Unidad de urología y nefrología, Hospital general, 1994.

Anexo I Producción agrícola nacional de verdolago.

CICLO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)			SUPERFICIE COSECHADA (Ha)			RENDIMIENTO (Ha)			PRODUCCION (Ton)		
	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL
AÑO AGRICOLA 1992	109	0	109	105	0	105	8	0	8	840	0	840
OTONO INVIERNO (1991-1992)	48	0	48	48	0	48	8	0	8	384	0	384
PRIMavera VERANO 1992	61	0	61	57	0	57	8	0	8	456	0	456

CICLO	VALOR DE LA PRODUCCION (M\$)			PRECIO MEDIO RURAL (M\$/Ton)		
	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL
AÑO AGRICOLA 1992	652800	0	652800	777,14	0	777,14
OTONO INVIERNO (1991-1992)	307200	0	307200	800	0	800
PRIMavera VERANO 1992	345600	0	345600	757,07	0	757,07

Fuente: Dirección General de Estadística, S.A.R.H., 1992

Anexo 2 Producción agrícola de verdolaga por entidades federativas.

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)		SUPERFICIE COSECHADA (Ha)		RENDIMIENTO (Kg / Ha)		PRODUCCION (Ton)			
	RIEGO	TEMPORAL TOTAL	RIEGO	TEMPORAL TOTAL	RIEGO	TEMPORAL TOTAL	RIEGO	TEMPORAL TOTAL		
BAJA CALIFORNIA NORTE	6	0	6	0	8	0	8	48	0	48
HIDALGO	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
MORELOS	99	0	99	0	99	0	8	792	0	792
TOTAL NACIONAL	109	0	109	0	105	0	8	840	0	840

ESTADO	VALOR DE LA PRODUCCION (M\$)		PRECIO MEDIO RURAL (M\$/Ton)			
	RIEGO	TEMPORAL TOTAL	RIEGO	TEMPORAL TOTAL		
BAJA CALIFORNIA NORTE	60,000	0	60,000	1250	0	1250
HIDALGO	0	0	0	0	0	0
MORELOS	572,800	0	572,480	748,480	0	748,480
TOTAL NACIONAL	632,800	0	632,800	777,14	0	777,14

Ciclo Aío agrícola 1992

Fuente: Dirección General de Estadística, S.A.R.N., 1992.

Anexo 3 Producción agrícola de verdolaja por entidades federativas.

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)			SUPERFICIE COSECHADA (Ha)			RENDIMIENTO (Kg)			PRODUCCION (Ton)		
	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL
BAJA CALIFORNIA NORTE	0	0	0	0	0	0	8	0	8	0	0	0
HIDALGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MORELOS	48	0	48	48	0	48	8	0	8	394	0	394
TOTAL NACIONAL	48	0	48	48	0	48	8	0	8	394	0	394

ESTADO	VALOR DE LA PRODUCCION (M\$)			PRECIO MEDIO ALPOR (M\$/ton)		
	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL	RIEGO	TEMPORAL	TOTAL
BAJA CALIFORNIA NORTE	0	0	0	0	0	0
HIDALGO	0	0	0	0	0	0
MORELOS	307,200	0	307,200	800	0	800
TOTAL NACIONAL	307,200	0	307,200	800	0	800

Ciclo: Otoño Invierno 1991-1992

Fuente: Dirección General de Estadística, S.A.R.H., 1992.

Anexo 4 Producción agrícola de verdolapa por entidades federativas.

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)		SUPERFICIE COSECHADA (Ha)		RENDIMIENTO (Ha)		PRODUCCION (Ton)	
	RIEGO	TEMPORAL	RIEGO	TEMPORAL	RIEGO	TEMPORAL	RIEGO	TEMPORAL
BAJA CALIFORNIA NORTE	6	0	6	0	6	0	8	48
HIDALGO	4	0	4	0	0	0	0	0
MORELOS	51	0	51	0	51	0	8	408
TOTAL NACIONAL	61	0	61	0	57	0	8	456

ESTADO	VALOR DE LA PRODUCCION (\$)		PRECIO MEDIO RURAL (\$/Ton)	
	RIEGO	TEMPORAL	RIEGO	TEMPORAL
BAJA CALIFORNIA NORTE	60,000	0	60,000	1250
HIDALGO	0	0	0	0
MORELOS	285,600	0	285,600	700
TOTAL NACIONAL	345,600	0	345,600	757,89

Ciclo: Primavera-Verano 1992

Fuente: Dirección General de Estadística, S.A.R.H., 1992.

ANEXO 5. ANALISIS ESTADISTICO

Con el fin de obtener resultados confiables en las determinaciones desarrolladas en esta investigación, éstas se realizaron por triplicado.

Para el manejo de datos, se utilizaron métodos estadísticos: media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (S) y coeficiente de variabilidad (CV).

Si recordamos, la media aritmética (\bar{X}) es la suma de todos los datos entre el número de ellos, es decir, es un valor promedio.

Su fórmula es:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

donde: Z= Sumatoria

X= Valores de la característica variable

N= Número de casos

La desviación estándar (S) es una medida de dispersión mediante la cual se determina que tanto se desvía cada dato, en promedio, respecto a la media aritmética. Al aumentar la desviación estándar el grado de dispersión de los datos será mayor y viceversa. En una serie simple la fórmula es:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}}$$

Para establecer el grado de variabilidad interindividual, se calcula el coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} (100)$$

Cuando éste es superior al 20 % se sospecha una causa muy fuerte de heterogeneidad.

Apéndice 6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos
en el análisis proximal de la verdolaga
(Portulaca oleracea L.)

ANÁLISIS CUADRO (3, 1)	DATO (mg/100g) muestra	\bar{X}	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$	$\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{n}$	$\frac{\sum(X-\bar{X})^3}{n}$	(S)	COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (%)
HUMEDAD	94.66	92.06	2.60	6.76	3.39	1.04	2	
	90.54		-1.52	2.31				
	91.00		-1.06	1.12				
CENTZAS	0.65	1.79	-0.94	0.88	0.89	0.94	52.5	
	2.74		0.95	0.9				
	—		—	—				
PROTEÍNA CRUDA	1.56	2.19	-0.63	0.39	0.23	0.40	22	
	2.73		0.54	0.29				
	2.3		0.11	0.01				
GRASA CRUDA	0.13	0.21	-0.08	0.0064	0.0043	0.06	29.5	
	0.22		0.01	0.0001				
	0.3		0.09	0.0081				
FIBRA CRUDA	0.8	0.86	-0.06	0.0036	0.0069	0.09	10.5	
	1		0.14	0.0196				
	0.9		-0.06	0.0036				
CARBOHIDRATOS	1.98	2.21	-1.23	1.51	1.51	1.23	36.3	
	2.77		-0.49	0.19				
	4.9		1.69	2.85				

ANEXO 7 Análisis estadístico de los niveles de exalatos encontrados en
verdolaga (*Portulaca oleracea* L.)

MUESTRA	CUBRO (3.3)	DATO (X) Exalatos	T	(x- \bar{x})	(x- \bar{x}) ²	$\frac{2(x-\bar{x})^2}{n}$	$\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}$ = (S)	COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (%)
VERDOLAGA SUZIA		0.037	0.29	0.008	0.000064	0.000056	0.0075	25.8
VERDOLAGA LIMPIA		0.022		0.007	0.000049			
VERDOLAGA COCIDA (10 min)		0.044	0.047	-0.003	0.000009			
VERDOLAGA COCIDA (15 min)		0.044		-0.003	0.000009	0.000022	0.0047	10