



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**CAMBIOS EN LA COMPOSICION QUIMICA Y
CONTENIDO DE TOXICOS EN EL FRUTO DE
COLORIN (*Erythrina americana*) DURANTE SU
MADURACION.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GABRIELA RAMIREZ RAMIREZ



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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	Prof. Angela Sotelo Lopez
Vocal	Prof. Josefina Viades Trejo
Secretario	Prof. Miguel Hernandez Infante
1er. Suplente	Prof. Leticia Gil Vieyra
2do. Suplente	Prof. Hugo Sousa Rojano


SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, División de
Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

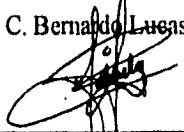
Asesor del tema


M. en C. Angela Sotelo López

Supervisor técnico


M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Sustentante


Gabriela Ramirez Ramirez

Agradecimientos

A la profesora Angélica Botelo con sincero agradecimiento por haberme brindado su apoyo en la realización de este trabajo, y por su amistad. Deseo un ejemplo de superación personal y profesional.

Al profesor Bernardo Lucas con especial gratitud por brindarme su apoyo incondicional en la realización del presente trabajo y por su amistad y confianza.

Al profesor Mucos Boto por su amistad y apoyo brindado, para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

A mi honorable jurado por sus acertadas observaciones y ayuda.

A todas aquellas amigas de la generación 89 y del inolvidable Lab. 111 - 112, con quienes compartí momentos de tristezas y felicidad. Gracias por su gran apoyo y valiosa amistad. Las quiero!

A la Facultad de Química

A la UNOACH

A ti, mi gran amigo

A todos ustedes

Dedicatorias

A ti Dios, porque lo eres todo para mí

*A mis padres José y Rebeca, por ser gran parte de mi vida, de mi formación humana y profesional. Por su paciencia y porque han estado a mi lado en cada momento, entregándome su amor, cariño y apoyo, por ser un ejemplo y un motivo de perseverancia y de lucha constante.
Papá y Mamá ¡gracias!*

A mis abuelas Antonio †, Ana, Arturo † y Juana Inocencia, porque gracias a su amor, compañía, paciencia y experiencias compartidas pude enriquecerme como persona y lograr esta meta, ya que fueron fuentes de inspiración.

A mis hermanas Rawana, José Antonio y Patricia por compartir conmigo etapas inolvidables en el camino de la vida, y a quienes debo parte de esta meta conseguida.

A todas mis tías y primas, especialmente Fam. Ramiras Montañez y Hernández Ramiras.

A ti M.R.A mi inolvidable y gran amigo.

A ti Didier Laurent B. por tu continuo apoyo, valiosísima amistad, cariño y respeto que siento por ti.

*Nuestra existencia es tan transitoria
como las nubes de otoño, observar el nacimiento
y muerte de las seras, es como observar las
movimientos de una danza. Una vida es
como el destello de un rayo en el cielo,
precipitándose como un torrente hacia abajo
como una montaña inclinada.*

©Rupak Chakrabarty

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS:	4
GENERALIDADES.....	5
LEGUMINOSAS.....	5
<i>Descripción del género Erythrina, en especial la especie americana.....</i>	<i>9</i>
FACTORES QUÍMICOS A CONSIDERAR PARA LA EVALUACION DE UNA LEGUMINOSA COMO ALIMENTO.....	11
ANALISIS PROXIMAL.....	11
HUMEDAD.....	11
CENIZAS.....	12
PROTEINA CRUDA.....	12
GRASA CRUDA.....	13
FIBRA CRUDA.....	13
CARBOHIDRATOS ASIMILABLES.....	14
FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES NATURALMENTE EN LEGUMINOSAS.....	15
HEMAGLUTININAS (LECTINAS).....	17
INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	20
ALCALOIDES.....	22
PARTE EXPERIMENTAL.....	27
1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS.....	27
2. DETERMINACIONES QUÍMICAS.....	27
3. DETERMINACIÓN DE FACTORES TÓXICOS.....	27
ANALISIS PROXIMAL.....	29
HUMEDAD.....	29
CENIZAS.....	30
PROTEINA CRUDA.....	32
GRASA CRUDA.....	35
FIBRA CRUDA.....	37
CARBOHIDRATOS ASIMILABLES.....	40
COMPONENTES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS.....	41
DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	41
HEMAGLUTININAS.....	48
ALCALOIDES.....	53
DETERMINACION CUANTITATIVA.....	53
ALCALOIDES EN GRASA.....	59
DETERMINACION CUANTITATIVA.....	59
RESULTADOS Y DISCUSION.....	63
CONCLUSIONES.....	85
SUGERENCIAS.....	86
BIBLIOGRAFIA.....	87

INTRODUCCION

Vivimos tiempos difíciles, años de crisis; hoy nuestra mayor preocupación es la subsistencia.

Tristemente, tenemos que reconocer que el hambre cotidiana, o sea la búsqueda día a día de la alimentación suficiente, sigue siendo una realidad actual que tiene su origen en la era prehistórica. (1,2)

La historia humana ha recorrido paralela al desarrollo de la obtención de sus alimentos. De ésta forma las primeras sociedades humanas tuvieron obligadamente que cubrir sus necesidades primarias, tuvieron que solventar satisfactoriamente sus requerimientos alimenticios para poder dedicarse a otras actividades. No fue sino hasta la revolución neolítica, cuando el hombre da el gran paso. La conquista que le significa pasar del ser nómada al ser sedentario, la conquista que implica para el hombre asegurar su alimentación a través de la agricultura y la domesticación animal. (2)

Actualmente, al aumento desmesurado de la población mundial ha correspondido una notoria escasez de alimentos tradicionales, siendo los grupos de población de escasos recursos económicos los más afectados; ya que no tienen acceso a los alimentos de alto valor nutritivo.

Como una solución para aminorar el problema de la escasez de alimentos con alto contenido de proteína se ha recurrido al estudio y utilización de fuentes no convencionales de alimentos, tal es el caso de las proteínas de origen vegetal, las cuales son de amplia distribución en algunos países en vías de desarrollo. Su costo es relativamente bajo y además se pueden obtener materiales alimenticios con características nutricionales tales que sean utilizables como sustituyentes de la proteína animal. (3)

Otra de las razones por las que se aprecia la necesidad de buscar nuevas alternativas viables para aumentar y diversificar la producción de alimentos y/o fuentes de materias nutritivas naturales es el uso de granos y otros alimentos de alta calidad para la alimentación del ganado (producción de proteína animal. (4)

México forma parte del tercer mundo; es un país definido por su economía rezagada .La cantidad de granos que importa para alimentar a sus habitantes crece con el correr de los años y hace del recurso alimentario una prioridad nacional que precisa resolver en sus múltiples aspectos. Sin embargo dispone de un enorme potencial no aprovechado de recursos naturales que no sólo le ayudarían a recuperar en breve plazo la autosuficiencia alimentaria sino también a estimular la producción de cosechas exportables y diversificar sus fuentes de alimentos. (1,5)

El fenómeno de comprar o cultivar granos tradicionales para consumo animal llamado "Ganaderización de la Agricultura", en México podría ser orientado positivamente si se aprovechan los alimentos llamados no convencionales (plantas forrajeras) ya conocidos y que son altamente nutritivos para el ganado y de un costo de producción bajo. (5,6)

Los países en vías de desarrollo afrontan graves problemas nutricionales y las leguminosas comestibles representan un potencial inmediato para resolver estos problemas. Actualmente y desde hace muchos años estas ocupan un lugar muy importante en la alimentación mundial, principalmente en América Latina, parte de África y en la India.(7)

Nutricionalmente las leguminosas de grano aportan cantidades significativas de energía a la dieta de poblaciones de bajos recursos económicos y lo que es más importante aporta la proteína suplementaria a la dieta principalmente de cereales y casi toda la proteína a una dieta a base de tubérculos. (8)

Las semillas de leguminosas contienen generalmente de 20-44 % de proteína (en base seca), lo que las sitúa entre las fuentes más concentradas de estos compuestos, ya que los cereales apenas aportan de 5 a 12%.

El Colorín (*Erythrina americana*) es una leguminosa que se propaga fácilmente mediante semillas o estacas, se encuentra ampliamente distribuida en México y en fase de domesticación, además requiere de escasos recursos agrícolas para su desarrollo.

De estudios preliminares se sabe que la semilla de esta leguminosa presenta alto contenido de proteína y grasa (macronutrientes de suma importancia en la alimentación animal), que este género contiene a su vez alcaloides y algunos otros tóxicos que impiden su utilización, y que es factible su destoxificación mediante procesos químicos y físicos lo cual resulta ser bastante laborioso y costoso. (9)

Basándose en todo lo anterior resultó interesante plantear el siguiente trabajo, cuya finalidad fue conocer, si durante el proceso de maduración del fruto de colorín existen cambios significativos en el contenido de tóxicos que nos permita saber en que fase se podría aprovechar de forma natural y potencial , encontrándose ya sea disminuidos o completamente ausentes, en especial, los alcaloides, en primera instancia para la alimentación animal.

Para ello se llevó a cabo un análisis bromatológico de las semillas, vainas y flor así como también un análisis cuantitativo de los principales tóxicos y factores antinutricionales en los diferentes estadios de inmaduración de las mismas.

OBJETIVOS:

- Comparar la composición de macronutrientes y tóxicos en la flor y en el fruto de la *Erythrina americana* (tanto en vainas como en semillas), en las diferentes fases de maduración.

- Conocer los cambios biosintéticos que ocurren durante el proceso de maduración del fruto del Colorín tanto en concentración de alcaloides como en la composición de macronutrientes.

GENERALIDADES

Leguminosas.

Con el nombre de leguminosas se designa una de las familias más numerosas e interesantes de entre las fanerógamas (plantas con flores), dentro del reino vegetal.

Comprende cerca de 650 géneros y más de 18 mil especies de las cuales en México se han registrado casi 1,500 y de éstas sólo 20 se aprovechan en la alimentación humana.

Las leguminosas especialmente sus semillas son en el reino vegetal las de mayor contenido de proteínas y por esto son las más atractivas en el estudio de nuevas fuentes de este macronutriente.

Son fácilmente adaptables de crecer bajo una amplia variedad de condiciones climáticas. Sin embargo las especies silvestres con las mismas características requieren de medios agronómicos como la domesticación de estas plantas.

Las hay que son árboles de tamaño colosal en tanto que otras forman arbustos ó enredaderas.

Hay tres características principales que distinguen a las leguminosas:

1) Lo más visible de tipo morfológico, es que forman vainas de las mas variadas formas y tamaños, dentro de las cuales se hallan una o más semillas.

El nombre de la familia de las leguminosas "*Leguminosae*" se deriva de la palabra "legumbre" que es el nombre que se le da al fruto (vaina) característico de las plantas de ésta familia.

2) Tienen la capacidad de asociarse con bacterias del género *Rhizobium*, las cuáles "fijan" el nitrógeno atmosférico, mediante la formación de nódulos en las raíces de la planta, convirtiéndolo en amoníaco para así ser absorbido.

Se considera que este es el mecanismo más importante de fijación de nitrógeno que existe en la naturaleza, al grado que en un año ciertos cultivos de leguminosas agregan al suelo más de 500 Kg de nitrógeno por hectárea, cantidad muy superior a la que habitualmente se logra adicionar con abonos químicos que son además escasos y costosos.

Lo anterior explica porque algunas leguminosas pueden crecer en los terrenos más difíciles y hostiles.

Ciertas leguminosas permiten rehabilitar suelos ya perdidos en apariencia para la agricultura.

Es evidente la conveniencia de alternar, mejor aún de combinar el cultivo de ciertas leguminosas con el de otras plantas como los cereales para obtener cosechas mayores de estos últimos.

3) Gracias a la característica anterior, las leguminosas pueden sintetizar aminoácidos y acumular cantidades muy elevadas de proteínas sin necesidad de fertilizantes de nitrógeno.

La gran familia de las leguminosas se divide en tres subfamilias:

a) *Caesalpinioideae*, con unas 2,800 especies de árboles grandes generalmente tropicales;

b) *Mimosoideae* formada por más de 3,000 especies de árboles pequeños y arbustos del trópico semiárido y de zonas subtropicales;

c) *Papilionoideae* ó *fabáceas* integrada por más de 12,000 especies herbáceas y trepadoras de distribución mundial.

Casi todas las leguminosas utilizadas como alimento tanto para el hombre como para animales domésticos pertenecen a la subfamilia de las papilionáceas.

En la alimentación humana, se aprovechan muy pocas especies alrededor de 20 en forma importante y menos de una docena de manera más generalizada.

Entre las semillas maduras (secas) que se utilizan con frecuencia en amplias regiones del planeta, se cuentan el frijol común (en Latinoamérica), el garbanzo (en

la India), la soya (en China, Japón, Filipinas), el cacahuete (en Africa), el haba, la lenteja, el arvejón ó alverjón (chícharo seco), en Europa.

Menos difundidos pero de amplio consumo en regiones limitadas son el ayocote, (en México y Centroamérica), y en ciertas zonas el guaje y a veces el mezquite y el guamuchil además el caupí o frijol ojo negro (en la India, Centro y Norteamérica), el frijol adzuki, el frijol de arrozal, el frijol alado (en el sureste de Asia), el frijolillo o ibes, el guandú o gandul (en India y región del Caribe), el haba blanca, el lupino ó tarhui (en la zona andina), y el frijol mungo (en Asia Oriental).

Si bien el guaje (*Leucaena leucocephala*), se ingiere en ocasiones en ciertas localidades de nuestro país, actualmente en algunos países como Cuba su principal uso es como forraje de alto rendimiento mayor aún que el de la alfalfa que es también leguminosa.

Es de subrayar que el hombre aprovecha diversas partes de las leguminosas para su alimentación

Aunque la modalidad que representa los mayores volúmenes, y por tanto la más notoria es el consumo de las semillas maduras (secas), de acuerdo con las características de cada especie también se utilizan otras partes de la planta.

Así, por ejemplo, las vainas inmaduras (ejotes) de varias leguminosas se ingieren con frecuencia en numerosas regiones del planeta; en otros sitios se aprovechan más las hojas, como la alfalfa, los tallos, las semillas germinadas, las semillas inmaduras (verdes), los frutos, las flores, y hasta las raíces (como lo es el caso de la jícama).

Como es conocido, las semillas maduras de las leguminosas contienen entre 18 y 44 por ciento de proteína lo que las sitúa entre las fuentes más concentradas de estos compuestos ya que los cereales apenas aportan de 5 a 12 por ciento; las carnes alrededor de 16 a 20 %; el huevo 10%, y las frutas, las verduras, los tubérculos y la leche entre 0.5 y 3.0%.

Además de ello, son fuentes importantes de hierro, fósforo, calcio, tiamina, riboflavina y aportan cantidades apreciables de niacina y energía.

La mayoría de las semillas de leguminosas aportan alrededor de 340 a 360 kilocalorías por cada 100 gramos, por lo que en este sentido se parecen a los cereales, que son fuente de energía abundante y barata.

Con excepción de la metionina, la mayor parte de las semillas contienen cantidades muy cercanas ó superiores de aminoácidos a las que sugiere el patrón FAO / OMS.

Es preciso subrayar el aporte satisfactorio de triptofano y más que suficiente de lisina, aminoácidos escasos en otras proteínas de consumo frecuente.

A pesar de que pueden presentar deficiencia en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, una suplementación con alimentos ricos en éstos, aminoácidos (cereales), elevan su valor.

La utilidad de las leguminosas no sólo se restringe al terreno de la alimentación humana. Muchas de ellas son excelentes forrajes, fuentes de colorantes naturales, gomas de amplio uso en la industria. Otras brindan maderas preciosas, maderas duras para la construcción y la fabricación de muebles; en ocasiones constituyen atractivos árboles y plantas de ornato.

Algunas más sirven como cercas o estacas vivientes y varias otras aportan materias primas para la industria química y farmacéutica (laxantes, esteroides reactivos, insecticidas, resinas, materiales aislantes, lacas, lubricantes, etc.) (10)

Descripción del género *Erythrina*, en especial la especie americana.

La *Erythrina* es un género constituido por 108 especies de amplia distribución en las regiones tropicales del mundo. Como resultado de los estudios realizados por diversos autores, este género de elegantes árboles, arbustos y unas cuantas hierbas, es probablemente mejor conocido en muchos otros aspectos que en cuanto a distribución y abundancia.

Los estudios más relevantes sobre la *Erythrina* han sido la completa o parcial caracterización de los alcaloides constituyentes de las semillas y en algunos casos de algunas otras partes de la planta. (11)

Erythrina americana.

Su nombre botánico es: *Erythrina americana* Mill, perteneciente a la familia de las leguminosas.

Se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En México se cultiva en terrenos tropicales y medianamente fértiles, por lo que se les ve crecer con lozanía en tierras relativamente pobres. Se propaga con facilidad por medio de semillas o estacas.

Se le conoce con los nombres comunes de colorín, chocolín en el estado de Hidalgo; chilicote en Baja California; Sonora y otros lugares del Sur.

Tiene algunas aplicaciones medicinales como: su uso contra granos, ponzofía, hinchazones etc., a los alcaloides se les atribuye las propiedades paralizantes de los nervios motores similares al curare.

Las semillas se informa que son muy tóxicas crudas. Se han usado como veneno para animales pequeños en algunas áreas. (12)

Sus flores son comestibles después de hervirlas y tirarles el agua, se guisan con huevo o se comen como verduras en ensaladas y se dice que tienen sabor a carne. (13)

Descripción:

Esta especie alcanza de 4 a 5 metros de altura, su tallo es amarillento e irregular y sus ramas espinosas; las hojas son trifoliadas, con hojuelas de 10 cm. de largo, casi cordiformes o deltoides y en la mayoría de los casos tallos lampiños (glabras), provistos de apéndices foliáceos (estípulas).

Su follaje es frondoso y caduco, verde claro; en ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores, las cuales son de color rojo vivo, y se producen en conjuntos terminales cónicos, y constan de un estambre largo, de unos 6 cm; las alas y la quilla son pequeñas (1 cm), de color blanquecino.

El androceo consta de 10 estambres repartidos en dos grupos, uno de nueve y otro aislado. El gineceo está rodeado en su base por un nectario y consta de un ovario alargado, comprimido, con un estilo simple que termina en un estigma pequeño.

El fruto es una legumbre como de 20 cm de largo y 2 cm de ancho, con estrangulamiento que limitan los lóculos donde se alojan las semillas, las cuales crecen en un número de 2 a 6, su color es rojo vivo, escarlata o naranja como las flores, su testa es lisa y brillante.

La madera es boba y muy blanda, es azafranada de corteza como de corcho y de igual ligereza por ello que los indios la usaban como tal. (14)

FACTORES QUIMICOS A CONSIDERAR PARA LA EVALUACION DE UNA LEGUMINOSA COMO ALIMENTO

ANALISIS PROXIMAL

El análisis proximal es la estimación porcentual de un cierto componente del alimento, en una forma general.

Este análisis también conocido como sistema analítico Weende, se desarrolló en Alemania hace más de 100 años y es de gran importancia en nutrición .

Al realizar este análisis se puede saber hacia donde dirigir el estudio de este alimento, qué utilidad podría tener, predecir el posible aprovechamiento de alguno de los componentes del mismo, etc.

El análisis proximal incluye las determinaciones de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

HUMEDAD

Todos los alimentos contienen una cierta cantidad de humedad, ésta se puede definir como el material perdido por un alimento durante el calentamiento de éste a temperaturas no superiores a la de ebullición del agua, o al ponerlo en contacto con un agente deshidratante o por calentamiento al vacío.

De acuerdo a esto se puede concluir que la humedad comprende tanto el agua libre del alimento como los componentes volátiles del mismo.

La humedad se determina generalmente mediante métodos que se basan en la pérdida de peso del alimento por la aplicación de calor.

Algunas ventajas que resultan de la información obtenida al determinar humedad son:

- 1) Permite expresar los resultados en una cierta base (base húmeda o base seca).
- 2) Permite saber la cantidad real de otros nutrientes en el alimento.
- 3) Tiene gran importancia económica.
- 4) La cantidad de humedad se relaciona estrechamente con la estabilidad del producto. (15, 16)

CENIZAS

Las cenizas son el residuo inorgánico que queda al incinerar la materia orgánica de una muestra.

La información que éstas proporcionan es la siguiente:

- 1) Grado de refinación de algunos alimentos, como es el caso de las harinas.
- 2) Adulteraciones en el alimento.
- 3) De ellas se parte para realizar la determinación de minerales. Esto es de gran importancia pues los minerales son indispensables para el organismo, además de poder determinar la presencia de algunos que son tóxicos como el plomo, selenio y mercurio. (15,16)

PROTEINA CRUDA

La determinación de proteína cruda incluye no sólo el nitrógeno proveniente de las proteínas de la muestra, sino también el nitrógeno de compuestos nitrogenados no proteicos como son aminoácidos libres, bases nitrogenadas, amidas, aminas, etc.

Esta determinación se realiza generalmente mediante el método de Kjeldahl, el cual supone que las proteínas tienen un contenido invariable de 16 % de nitrógeno. De esto resulta un factor (6.25) que se utiliza para calcular la cantidad de

proteína en la muestra a partir de la cantidad de nitrógeno encontrado. Este factor varía en algunos alimentos como es el caso del arroz (5.95), trigo (5.7), etc.

La importancia de las proteínas es la siguiente:

- 1) Nutricional: Son nutrimentos indispensables para el organismo, pueden ser estructurales y funcionales.
- 2) Contribuyen en las propiedades organolépticas del alimento.
- 3) Influyen en la textura y propiedades reológicas de los alimentos.
- 4) Es un índice de calidad en diferentes alimentos como las harinas. (15,16)

GRASA CRUDA

La determinación de grasa también llamada extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, entre ellos están los triglicéridos, ácidos grasos, vitaminas liposolubles, provitaminas, etc.

La importancia de la función de éste nutriente en los alimentos es la siguiente:

- 1) Son fuentes importantes de calorías.
- 2) Permiten almacenar vitaminas liposolubles.
- 3) Forman parte de la membrana celular.
- 4) Influyen en las propiedades organolépticas de los alimentos.
- 5) Permiten saber si ha habido adulteraciones en algunos alimentos como la leche. (15,16)

FIBRA CRUDA

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico y sosa hirvientes, al 1.25%.

El compuesto más abundante de este residuo es el carbohidrato celulosa y en menor cantidad hemicelulosas, lignina y pentosanas.

La celulosa es un homopolisacárido de D-glucosa con uniones $\beta(1-4)$, helicoidal.

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos. Están compuestos por polímeros que contienen D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ a ácido D-galacturónico.

La lignina es un polímero tridimensional formado por la unión de compuestos fenólicos, unidos por una cadena alifática de tres carbonos insoluble en agua.

La fibra beneficia las funciones intestinales, ya que forma una especie de masa en el intestino que absorbe agua y ayuda a los movimientos peristálticos mejorando la eliminación de las heces. (17)

Sin la ingestión de fibra, se pueden tener problemas graves como constipación o estreñimiento, etc.

CARBOHIDRATOS ASIMILABLES

Los carbohidratos asimilables están formados por azúcares reductores, azúcares no reductores, almidón y derivados.

Se obtienen después de realizar la determinación porcentual de los otros componentes de la muestra, es decir se obtienen por diferencia.

Los carbohidratos asimilables, son la fuente energética más importante para el organismo. (15)

FACTORES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS QUE SE ENCUENTRAN PRESENTES NATURALMENTE EN LEGUMINOSAS.

La toxicidad de las leguminosas crudas se debe probablemente a la acción combinada de varios factores.

Sus semillas contienen un amplio rango de constituyentes los cuales tienen efectos adversos en actividad enzimática, digestibilidad, nutrición y salud. Además ha sido reconocido desde hace mucho tiempo, que éstas poseen mecanismos contra los depredadores como son microorganismos, insectos, pájaros, y otros animales.

Tales mecanismos de protección se encuentran presentes en forma de factores antinutricionales o tóxicos.

Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los inhibidores de tripsina, las lectinas o fitohemaglutininas, los glucósidos cianogénicos, las saponinas, los factores bociogénicos, los factores productores de latirismo, alcaloides, aminoácidos raros, factores anticoagulantes y otros inhibidores de enzimas. (18, 19)

Los inhibidores de enzimas digestivas son componentes comunes de leguminosas que pueden reducir la digestibilidad proteica, causar inhibición del crecimiento e hipertrofia pancreática.

Las hemaglutininas de la especie *Phaseolus* inhiben el crecimiento y causan la muerte de animales de experimentación cuando se les inyectan bajas concentraciones de éste tóxico. (20)

Muchos de los factores antinutricionales en leguminosas pueden ser eliminados ó inactivados en alto grado por un calentamiento apropiado durante el proceso de preparación de alimentos.

Otros tratamientos que se pueden incluir son la esterilización, vaporización, fermentación, remojo y cocción.

Durante el aislamiento y concentración de proteína se emplean técnicas, como la molienda húmeda por ser efectiva en la destoxificación de materiales de las semillas. (21)

Si se quiere asegurar en los productos obtenidos todo su potencial nutritivo, conviene que el grado de temperatura y la duración del calentamiento adoptado durante las preparaciones industriales ó culinarias alcancen, pero sin rebasarlo, el nivel necesario para eliminar el efecto ejercido por los inhibidores o las lectinas, sin disminuir la disponibilidad de los aminoácidos indispensables.(22)

HEMAGLUTININAS (Lectinas)

El término Lectinas es también conocido invariablemente por fitohemaglutininas, fitoaglutininas, aglutininas, hemaglutininas, protectinas y más recientemente afininitinas. (23)

Fue originalmente propuesto por Boyd y Shapleigh en 1954, para componentes de varios extractos de semillas que pueden selectivamente aglutinar eritrocitos de diferentes animales o diferentes grupos de sangre humana. Como resultado de esta y otras observaciones propusieron entonces el término "Lectinas" (del latín *legere* que significa "elegir"). (24)

Las hemaglutininas son proteínas o glucoproteínas que presentan la interesante habilidad de aglutinar los glóbulos rojos. Su detección y caracterización se ha basado en este hecho. Algunas se encuentran unidas a azúcares por ello se les ha clasificado como glucoproteínas.

Son también definidas como proteínas ligantes de carbohidratos capaces de aglutinar células ("celulo-aglutinantes"). (25)

Eritrocitos de varias especies animales pueden ser distinguidos por sus reacciones de aglutinación con ciertas hemaglutininas las cuáles pueden ser clasificadas como específicas, y como no-específicas cuando aglutinan los glóbulos rojos de todos los tipos de sangre, dando el mismo título. (26)

La mayoría de las lectinas son específicas de galactosa, N-acetilgalactosamina, seguidas por aquellas que lo son de la manosa y glucosa.

Aproximadamente todas las hemaglutininas son glucoproteínas y metaloproteínas que contienen Ca^{2+} y Mn^{2+} . (27)

Son termolábiles, solubles en agua, soluciones salinas y diluidas de ácidos minerales. (28)

Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, particularmente en leguminosas y también, en vertebrados, invertebrados y microorganismos.

En las plantas las lectinas se encuentran principalmente en las semillas donde constituyen un 10% del total de la proteína de la semilla. Están localizadas en elevada concentración en los cuerpos proteicos de los cotiledones, sin embargo también se les encuentra en hojas, corteza, raíces y retoños.

Es sorprendente que el 95% de las lectinas reportadas desde 1948 son derivadas de las semillas de las leguminosas.

Recientemente más de una docena de éstas proteínas han sido aisladas de varias especies de *Erythrina* y aprovechadas comercialmente.

Bhattacharyya y colaboradores, han hecho estudios comparativos que reportan la existencia de estrecha similitud entre ellas , con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, y especificidad en cuanto al ligamento de carbohidratos.

El papel fisiológico de las lectinas en las plantas aun permanece oscuro. Hay varias hipótesis acerca de las funciones que desempeñan éstas sustancias en las plantas, y son las siguientes:

1. Debido a las similitudes que tienen con los anticuerpos, se sugiere que sirven como tales, por la interacción que presentan con virus, hongos y bacterias para proteger a la planta.

2. Se dice que juegan un papel fisiológico en la fijación, transportación y almacenamiento de carbohidratos. (27,29,30,31)

La habilidad de extractos de semillas para aglutinar células rojas de la sangre fue conocida desde los trabajos de Stillmark (1889), con la obtención de una proteína de la semilla de tártago (*Ricinus communis*). (32)

Posteriormente, Summer aisló de una variedad de frijol (*Concavalina ensiformis*), la primera aglutinina (globulina) vegetal en forma pura a la que llamó Concanavalina A la cual posee la propiedad de aglutinar eritrocitos.

Landsteiner y Raubitschek (1908), reconocieron que la intensidad de aglutinación por el extracto de la planta a menudo variaba con el origen de las

células probadas. También encontraron actividad hemaglutinante presente en los extractos de lentejas, arvejas y frijoles.

En 1945, Boyd reportó que las aglutininas de frijol de lima (*Phaseolus lunatus*), aglutinaban células rojas de humano sangre tipo A, pero no aquellas de tipo B u O. (33)

Jaffé y colaboradores (1955) y Jaffé (1960), propusieron que la toxicidad de las lectinas de los frijoles podría ser atribuida a su habilidad de unirse a sitios receptores específicos de la superficie de las células que recubren el intestino. (34)

En 1965 Tedeschi y colaboradores fueron los primeros en reportar cambios morfológicos de órganos asociados al consumo de frijoles crudos. (35)

Más tarde Jaffé y Vege Lette (1968), compararon cinco variedades de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) y encontraron que aquellas que tuvieron alta actividad hemaglutinante fueron más tóxicas para las ratas jóvenes, causando pérdida de peso y la muerte en dos semanas, que otras variedades que estuvieron exentas de ésta actividad.

De hecho, la inhibición del crecimiento y toxicidad resultantes del consumo de leguminosas crudas, ha sido más asociado a la actividad aglutinante que a la actividad de los inhibidores de tripsina en las semillas. (36)

En 1979 Puztai y colaboradores, observaron por microscopía de luz y electrónica, fragmentadas las microvellosidades del duodeno y yeyuno de las ratas alimentadas con dietas que contenían frijoles crudos. (37), en 1980 fueron también reportados cambios morfológicos en la mucosa intestinal, debidos a la ingestión de lectinas presentes en *Phaseolus acutifolius*.

Debido a que poseen diferencias en la especificidad de azúcares, son capaces de unirse a las células epiteliales que recubren el intestino, deteriorando de esta forma la absorción de nutrientes a través de la pared intestinal.

Además de su efecto celulo-aglutinante, otros efectos notables, incluyen la redistribución de los componentes de la superficie celular y la modificación de la actividad de enzimas membranales.

Dada su estricta especificidad por la estructura de los carbohidratos, las lectinas han sido usadas para el aislamiento de glicoproteínas, para el análisis de carbohidratos complejos, para el estudio de la arquitectura y dinámica de la membrana celular, además, son también de gran interés para la determinación de grupos sanguíneos y la distinción serológica de varias especies de animales. (29, 33, 38,

39)

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Los inhibidores de proteasas son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas.

Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, particularmente en las leguminosas, sobre todo del género *Phaseolus*, en la soja y en *Vicia faba*. También en los cereales como el trigo, maíz, centeno, avena arroz y alforjón; e igualmente en chícharos y patatas.

Los inhibidores se presentan en gran cantidad principalmente en las partes comestibles de las plantas, como lo son las semillas.

El principal inhibidor enzimático y más estudiado es el que actúa sobre la tripsina sin embargo puede coexistir con el inhibidor de la quimotripsina y algunos otros inhibidores de proteasas.

Estos factores tóxicos son de naturaleza proteínica, las estructuras y propiedades de estas sustancias varían enormemente, algunas de sus características es que resisten la actividad proteolítica de enzimas como la papaína y la pepsina, presentan resistencia relativa hacia factores ambientales como el pH y el calor. (40,

41, 42)

Se cree que en las plantas desaparecen en el momento de la germinación.

También, que controlan las proteinasas endógenas en el metabolismo de almacenamiento de proteínas durante la maduración de las semillas, actúan además, de defensa contra enzimas proteolíticas de parásitos.

En algunas plantas, después de un daño mecánico desprendimiento o ataques de insectos, se lleva a cabo una acumulación de inhibidores de proteasas no solo en el sitio del daño sino también en los tejidos adyacentes.⁽⁴²⁾ Los inhibidores más estudiados son el de Kunitz y el de Bowman- Birk. Este último difiere del primero en varios aspectos: su peso molecular es de 8000-10,000, especialmente rico en el contenido de cisteína, tiene siete enlaces disulfuro, desprovisto de glicina y triptofano. Presenta dos sitios de enlace, por lo que inhibe tanto a la tripsina como a la quimotripsina, además de que posee una marcada estabilidad hacia el calor, el ácido y el álcali se dice que la termoestabilidad es debida al elevado contenido de aminoácidos azufrados y al alto número de enlaces disulfuro.

En cambio, el inhibidor de Kunitz tiene un peso molecular de 20,000 un punto isoeléctrico de ($pH=3.5-4.4$), bajo contenido de cisteína y posee dos enlaces disulfuro. ^(43,44)

Los inhibidores de tripsina actúan inhibiendo la tripsina que es una enzima proteolítica que se libera del páncreas al intestino del hombre y de los animales.

Recientemente hubo evidencias para indicar que esta proteína en el intestino suprime la secreción de enzimas pancreáticas por inhibición de retroalimentación y que los inhibidores de tripsina provocan un incremento en la secreción de enzimas impidiendo la supresión producida por la tripsina. Por lo que se les atribuye la hipertrofia del páncreas que regularmente se observa en animales alimentados con dietas que contienen leguminosas (soja, frijol etc.) en forma cruda. ^(45)

Es un hecho reconocido desde principios de este siglo que las semillas de ciertas leguminosas, al ser incorporadas de esta forma en dietas experimentales para animales, no permite un crecimiento normal. Lupman y Lepkovsky sugirieron que la inhibición del crecimiento podía ser el resultado de una pérdida endógena de

aminoácidos esenciales de un páncreas hiperactivo, que responde, en forma compensatoria a los efectos del inhibidor de tripsina. La pérdida de metionina en esta fase sería particularmente aguda, ya que las proteínas de estas leguminosas son notoriamente deficientes en estos aminoácidos. (46,47)

El efecto sobre el páncreas desaparece al usar semillas en forma cocida.

La mayoría de los inhibidores de proteasas son destruidos por calentamiento con lo cual se logra mejorar el valor nutritivo de las leguminosas.

Kakade y Evans en 1965, informaron que calentando en autoclave por 5 minutos a 121°C se destruye cerca del 80% de la actividad de los inhibidores de tripsina y el crecimiento en función de ratas alimentadas con soja sometida a este tratamiento con calor fue considerablemente mejorado. Sin embargo, largos periodos de calentamiento disminuyen su valor nutritivo. (48)

ALCALOIDES

La palabra "alcaloide" es derivada del término "álcali vegetal" usado originalmente para describir un grupo de bases de origen botánico.

En los últimos 150 años más de 2,000 alcaloides han sido aislados.

Los alcaloides usualmente constituyen un grupo de compuestos aromáticos de compleja estructura molecular, que poseen un átomo de nitrógeno involucrado en un sistema heterocíclico, este nitrógeno frecuentemente actúa como una base (acepta iones hidrógeno), por lo cual son de carácter básico como su nombre lo indica.

Resultan de gran interés debido a que presentan una significativa actividad farmacológica, fisiológica y psicológica en humanos y animales. Son generalmente derivados directos de aminoácidos. Se encuentran distribuidos en diversas familias de plantas en forma de sales de ácidos orgánicos, algunos otros se encuentran combinados con azúcares (ramnosa, galactosa y glucosa) y otros, están en forma de ésteres de ácidos.

Los alcaloides son encontrados en varias partes de la planta como lo son las semillas, raíces, hojas, frutos y corteza.

Generalmente, se ha atribuido que las causas más importantes del contenido de alcaloides y de los cambios en el desarrollo de las plantas son debidas a los factores ambientales. (49,50,51)

Acercas de la explicación que se ha dado a la función que desempeñan estos compuestos dentro de la planta, se han hecho muchas sugerencias, algunas con bases experimentales pero ninguna parece haber sido probada. Además del efecto biológico de protección contra depredadores, lo cual es a menudo descartado, han sido propuestas las siguientes funciones:

1) Los alcaloides son productos nitrogenados de excreción en plantas, como lo son en forma análoga el ácido úrico y la urea en los animales.

2) Son una reserva de nitrógeno, bajo la evidencia de que son utilizados en condiciones de deficiencia de éste.

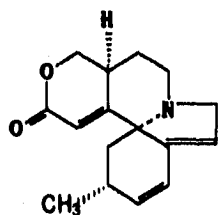
3) Actúan como reguladores del crecimiento, posiblemente como inhibidores de la germinación, en virtud de su poder quelante.

4) Ayudan a mantener el balance iónico. (52)

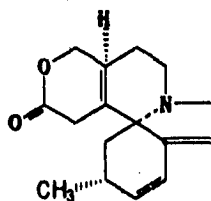
Las especies de *Erythrina* son importantes por su rico contenido alcaloidal y por sus propiedades médicas.

Es sabido desde hace tiempo por Domínguez y Altamirano (Gaceta médica 1888), que el extracto de un triturado de las semillas de *Erythrina americana*, produce una fuerte acción parecida al curare, por ejemplo una parálisis selectiva de las terminales de los nervios motores del músculo estriado. Aunque el uso de este extracto fue sugerido en lugar del curare, el cual ha sido utilizado terapéuticamente en contra del tétanos y otros padecimientos convulsivos, hasta donde se sabe ninguna especie de *Erythrina* ha sido usada en la sustitución del curare. (52) Dicha acción fue confirmada en trabajos posteriores realizados por Ramírez, Rivero y Lehman.

En 1937, Folkers y Major describieron el aislamiento del principal componente biológicamente activo, de los extractos de la semilla de *Erythrina americana*, que fue la β -eritroidina. (53) El nombre de eritroidina fue dado a este compuesto desde que Altamirano lo usó, refiriéndose al constituyente activo de la planta. Además análisis realizados de este compuesto mostraron que se encuentra constituido por una mezcla de dos isómeros, los cuales fueron nombrados α y β -eritroidina, y encontrados en mayor abundancia (más del 90%), acompañados de pequeñas cantidades de erisodina, erisovina y erisopina en *Erythrina americana*, sin embargo la erisodina y erisovina son los alcaloides más abundantes y se encuentran en todas las especies examinadas de *Erythrina*. (53, 54, 55)



α - Eritroidina



β - Eritroidina (58)

Folkers y colaboradores determinaron igualmente, la DL_{50} del Clorhidrato de eritroidina en ratones blancos, que fue de 120 mg/Kg al ser suministrado oralmente y 15 mg / Kg por vía subcutánea. La acción parecida al curare fue probada en ranas, se encontró que 0.1 a 0.5 mg por rana causó completa parálisis motora cuando se inyectó en el saco linfático.

La eritroidina en contraste con el curare también es efectiva cuando se administra oralmente. (52)

Un estudio farmacológico más detallado de la β -eritroidina y sus derivados fue hecho por Unna, Kniazuk y Gresling en 1944, donde la dihidro- β -eritroidina

resultó ser la droga más potente, con una DL_{50} en gatos de 2-3 mg/Kg ,suministrado subcutánea y oralmente. Los animales murieron de asfixia, la administración de estos alcaloides abaten la presión sanguínea y ciertas dosis causan parálisis.

El uso más frecuente de la β -eritroidina fue en el tratamiento de la esquizofrenia, controlando ataques y convulsiones, y de otras enfermedades mentales. En los años 1940 y 1950 fue también usada en el tratamiento de electrochoques.

Sin embargo, la investigación de su modo de acción y su uso, fue interrumpida en ese tiempo por desconocer su estructura y por la inducción de hipotensión y bradicardia (disminución de la frecuencia cardíaca), en algunos pacientes.

La estructura de la β -eritroidina fue elucidada hasta 1953 por Boeckelheide; e inmediatamente después fue reemplazada por drogas sintéticas más efectivas.

La principal acción biológica de los alcaloides de *Erythrina* es la parálisis muscular, ya que su modo de acción consiste en un bloqueamiento mio-neural de los impulsos nerviosos al músculo. La letalidad de cada uno depende de su estructura, vía de administración y especie animal.(55, 56)

En algunas regiones de México las flores de colorín (*Erythrina americana*) son usadas para cocinar, se piensa que poseen propiedades hipnóticas, por lo que se trató de aislar el principio activo. Los dos alcaloides que se identificaron fueron la α -eritroidina y β -eritroidina en cantidades bajas (0.034 y 0.11 % respectivamente) comparadas con un 2 % de ambas eritroidinas presentes en las semillas. Se sugiere que dicha actividad hipnótica es atribuida a estos compuestos que probablemente ejercen un efecto de relajación muscular.(57)

En 1976 (Ito y colaboradores), aislaron dos alcaloides la, cistanidamida de *E. crista-galli* y la erisoforina e hipaforina de *E. arborescens*.(58)

En la última década los alcaloides de *Erythrina* han sido ampliamente estudiados principalmente por la actividad paralizante de sus semillas, sin embargo,

una gran cantidad de ellos han sido aislados de las flores de diferentes especies, para propósitos médicos.

Diversas partes de la planta de *E. variegata* han sido usadas en la medicina tradicional, como sedativo, antiasmático y antiépiléptico. Recientemente se reportó el aislamiento y caracterización de dos alcaloides biológicamente activos, uno tentativamente llamado Eritritol, y el otro con propiedades antiépilépticas llamado Isococcoline. (59, 60)

La *E. senegalensis* es igualmente una especie que posee propiedades medicinales cuyos extractos del tronco y la corteza son usados por muchas tribus en Africa, estudios recientes reportaron el aislamiento y elucidación estructural de dos nuevos isoflavonoides que poseen propiedades antiaritmicas. (61)

También se ha reportado que los alcaloides extraídos de las hojas de *Erythrina orientalis* poseen un poder anti-inflamatorio. (62)

En trabajos posteriores, se detectaron trazas de erisovina, erisodina y de α y β -eritroidinas en hojas de *Erythrina berteroana* y *Erythrina poeppigiana* e igualmente en muestras de leche de cabra, alimentadas por estas mismas. Dichas especies se encuentran ampliamente distribuidas en Centro y Sudamérica. (63)

PARTE EXPERIMENTAL

En la realización del presente estudio se emplearon las harinas de la flor, las semillas y vainas de Colorín (*Erythrina americana*) en sus diferentes fases de maduración. (Ver figura 1)

El material se recolectó en la zona norte metropolitana de la ciudad de México.

1. Determinación de parámetros Físicos.

- 1.1 Peso Hectolítrico.
- 1.2 Peso promedio vaina.
- 1.3 Peso promedio semilla.
- 1.4 Número promedio de semillas por vaina.
- 1.5 Longitud promedio de las vainas.

Obtención de Harinas.

En cada caso el material se secó a 50°C, en una estufa con corriente de aire modelo Imperial III Lab-Line; se molió en un molino Thomas-Wiley de aspas giratorias, y se tamizó en una malla de 1mm de diámetro.

Posteriormente a las harinas obtenidas, preparadas convenientemente se les efectuaron los análisis químicos y toxicológicos.

2. Determinaciones químicas.

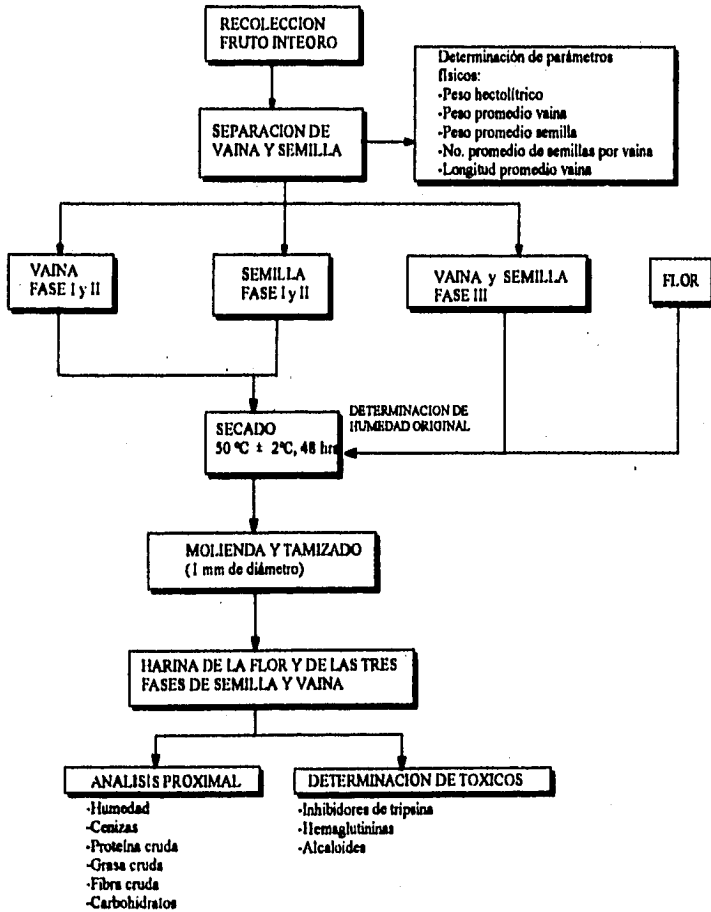
- 3.1 Análisis bromatológico. (64)

3. Determinación de Factores Tóxicos.

- 4.1 Determinación de Inhibidores de tripsina. (65)
- 4.2 Determinación de Hemaglutininas. (66, 67)
- 4.3 Determinación cuantitativa de alcaloides. (68)
- 4.4 Determinación cuantitativa de alcaloides en grasa. (69)

En la figura 1 se muestra el acondicionamiento practicado a las materias primas.

FIGURA 1.
ACONDICIONAMIENTO DE LAS MATERIAS PRIMAS.



ANALISIS PROXIMAL

A las materias primas crudas, se les realizó el análisis proximal en base a los métodos del AOAC el cual consta de las siguientes determinaciones:

- 1) Humedad
- 2) Cenizas
- 3) Proteína cruda
- 4) Grasa cruda
- 5) Fibra cruda
- 6) Carbohidratos (por diferencia).

HUMEDAD

Fundamento:

Esta determinación se basa en la pérdida de humedad de una muestra cuando a ésta se aplica calor.

Si esta determinación se realiza a presión reducida, el punto de ebullición del agua se abate y es menor el daño que sufre la muestra por efecto de la temperatura .

Material:

- * Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620
- * Charolas de aluminio.
- * Desecador
- * Balanza analítica

Procedimiento:

Se pone a peso constante la charola de aluminio introduciéndola en la estufa de vacío aproximadamente de 1 a 2 horas a 60-65°C. Una vez que está la charola a peso constante se pesan en la misma de 2 a 5 g. de muestra molida y homogénea. Se mete la charola a la estufa de vacío a una temperatura entre 60-65° durante 4 horas aproximadamente. Se saca la charola, se coloca en el desecador y se deja enfriar hasta llegar a la temperatura ambiente, posteriormente se pesa. Se repite el mismo procedimiento hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de más de 0.001g.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

P_i = Peso de la charola más muestra húmeda (g)

P_f = Peso de la charola más muestra seca (g)

m = Peso de la muestra (g)

CENIZAS**Fundamento:**

Las cenizas forman el residuo inorgánico que queda después de una incineración de la materia orgánica del alimento, por lo cual se puede cuantificar mediante una diferencia de pesos después de haber realizado la incineración.

Material:

- * Mufla THERMOLYNE, MOD:1500
- * Balanza analítica
- * Desecador
- * Crisoles de porcelana
- * Mechero Bunsen
- * Tripié
- * Triángulos de porcelana

Procedimiento:

Pesar aproximadamente de 2 a 3 g de muestra en los crisoles puestos previamente a peso constante. Estos se colocan en un tripié con un triángulo de porcelana dentro de una campana y se calientan poco a poco con el mechero hasta lograr la carbonización completa de la muestra; posteriormente se llevan a la mufla la cual debe encontrarse a una temperatura de entre 500-550°C durante el tiempo necesario para obtener cenizas blancas o grises homogéneas. Se dejan enfriar un poco los crisoles, se meten a un desecador, se dejan enfriar hasta llegar a la temperatura ambiente y se pesan.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del crisol con las cenizas en gramos

Pi= peso del crisol vacío (peso constante) en gramos

m= peso de la muestra en gramos

PROTEINA CRUDA

Fundamento:

El método Kjeldahl el cual es el más usado en la determinación de proteína, se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva, formándose una sal fija de sulfato ácido de amonio. (NH_4HSO_4)

Posteriormente se realiza una destilación en donde se libera amoniaco de esta sal, mediante la adición de hidróxido de sodio al 60%, el cual se fija en ácido bórico formándose borato de amonio, el cual es titulado con una solución valorada de ácido clorhídrico. (HCl)

De esta forma se obtiene la cantidad de nitrógeno en la muestra, el cual se multiplica por un factor que nos da el porciento de proteína en la misma.

Material y reactivos:

- * Digestor TECATOR; mod. ab-20/40.
- * Dispositivo de microdestilación LABCONCO.
- * Tubos de digestión TECATOR de 75 ml.
- * Balanza analítica.
- * Mezcla digestiva (a)
- * Peróxido de hidrógeno al 30%.
- * Sulfato de potasio. R.A.
- * Solución de Hidróxido de sodio al 60%.
- * Solución de ácido bórico con indicadores. (b)
- * Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada.

Forma de preparar:

- a) Mezcla digestiva: Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que esté bien disuelta la sal, adicionar con cuidado y resbalando por las paredes 430 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se deja agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente.
- b) Solución de ácido bórico con indicadores : Se pesan 5 g de ácido bórico y se colocan en un matraz aforado de 1 litro, se adiciona agua destilada hasta disolverlo y se agregan 35 ml del indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100 ml con alcohol etílico) y 10 ml del indicador B (33mg de verde de bromocresol más 66mg de rojo de metilo aforados a 100 ml con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 litro con agua destilada.

Procedimiento:

Pesar de 20 a 80 mg de la muestra (esto dependerá de la cantidad de proteína de la misma) y colocarlos en el tubo de digestión, agregar 0.5 g aproximadamente de sulfato de potasio y 3ml de mezcla digestiva, poner en el digestor durante 15 minutos a 370°C máximo; después de este tiempo se saca del digestor, se enfria y se agregan 1.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Posteriormente se vuelve a colocar en el digestor que se encuentra a 370°C y se deja ahí hasta que en el tubo no se vean puntos negros y además la mezcla de digestión sea transparente.

Una vez realizada la digestión se deja enfriar el tubo y se procede a efectuar la destilación en el microdestilador, el cual se debe calentar previamente para que inicie el proceso de destilación.

La muestra se vacía en la copa de adición del microdestilador, se enjuaga el tubo de digestión 2 veces con la mínima cantidad posible de agua destilada y este

contenido se agrega también a la unidad de destilación. Posteriormente se añaden lentamente y con cuidado 15 ml de hidróxido de sodio al 60% a la copa enjuagando la misma con agua destilada.

El destilado se recibe en un vaso de precipitado que contenga 50 ml de ácido bórico y la destilación se continúa hasta completar un volúmen de 100-125 ml. Una vez terminada la destilación se titula el destilado con ácido clorhídrico 0.01 N, desde un vire de color esmeralda hasta un rosa claro.

NOTA: Conviene realizar un blanco sustituyendo la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa y tratándola de la misma forma.

Cálculos:

$$\% N = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= ml de HCl 0.01 N usados para titular la muestra

B= ml de HCl 0.01 N usados para titular el blanco

N= Normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

F= Factor de conversión (6.25)

GRASA CRUDA.

Fundamento:

Esta determinación se basa en la solubilidad de las grasas en éter etílico; éste se calienta y se volatiliza, pero al hacer contacto con una superficie fría se condensa pasando por la muestra y arrastrando las sustancias solubles. Esta operación se repite en forma continúa hasta que no queden residuos de lípidos extraíbles. Finalmente el éter se evapora, quedando en el vaso el residuo conocido como grasa cruda. (citatina).

Material y Reactivos:

- * Aparato de extracción Goldfish. LABCONCO:
- * Vasos con borde esmerilado de 100 ml.
- * Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm.
- * Balanza analítica.
- * Desecador
- * Estufa de vacío LAB-LINE mod.3620.
- * Portadedal
- * Eter de petróleo.

Procedimiento:

Se colocan dentro del cartucho de celulosa de 2 a 5 g de muestra molida (es conveniente que la muestra haya sido previamente secada), y se tapa con un pedazo de algodón. Se coloca el cartucho en el portadedal y este a su vez en el seguro metálico del aparato. Posteriormente se colocan aproximadamente 50 ml del éter de petróleo sobre el vaso con borde esmerilado puesto previamente a peso constante, y éste con la ayuda de un anillo metálico con rosca se coloca en el aparato de extracción, cuidando que quede bien colocado para evitar fugas del disolvente.

Se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso, se abre la llave del agua para su circulación en el refrigerante y se procede a un calentamiento moderado que permita la extracción (el tiempo puede ir de 4 a 8 horas dependiendo de la cantidad, de grasa en la muestra).

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se bajan las parrillas de calentamiento, se quita el portadetal con el cartucho y se sustituye por el recipiente de recuperación, se calienta el vaso nuevamente para eliminar el éter del mismo. Una vez que el vaso esté libre de disolvente, se coloca en la estufa de vacío a 60-65°C durante 2 horas, se coloca en el desecador, se enfría a temperatura ambiente, se pesa y se repite la operación hasta que el vaso esté a peso constante, es decir hasta que en dos pesadas sucesivas del vaso no haya una diferencia mayor a 0.001g

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del vaso con el extracto etéreo en gramos

Pi= peso del vaso a peso constante en gramos

m= peso de la muestra en gramos

NOTA 1: Se utilizó éter de petróleo como disolvente de la fracción lipídica porque es más barato que el éter etílico, no absorbe humedad durante la extracción y con él se evitan problemas de explosiones pues no forma peróxidos como el éter etílico.

NOTA 2: Debido a que el punto de ebullición del éter de petróleo es bajo (40-45 °C), se recomienda enfriar los refrigerantes con agua-hielo.

FIBRA CRUDA.

Fundamento:

La fibra cruda es el residuo insoluble y combustible que resiste un tratamiento sucesivo con ácidos y álcalis en caliente, y el cual se somete a una incineración del material insoluble para que por diferencia de pesos se obtenga el contenido de carbohidratos no degradables es decir la fibra cruda, la cual esta compuesta principalmente por el polisacárido celulosa y en menores cantidades por hemicelulosa y lignina.

Por definición de acuerdo al Método Weende, la fibra es la pérdida por ignición del residuo seco permanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25 % y NaOH al 1.25 % bajo condiciones bien específicas, de una muestra previamente desengrasada.

Material y Reactivos:

- * Vasos de Berzelius de 600 ml.
- * Aparato de digestión LABCONCO.
- * Mufla THERMOLYNE, mod.1500.
- * Estufa de vacío LAB-LINE, mod.3620.
- * Crisoles de porcelana.
- * Filtro de lino.
- * Desecador.
- * Balanza analítica
- * Solución de H₂SO₄ al 1.25 % (m/v).
- * Solución de NaOH al 1.25 % (m/v).
- * Antiespumante.
- * Alcohol etílico.
- * Asbesto calcinado.

Procedimiento:

1. Pesar de 2 a 5 g de muestra desengrasada y colocarla en el vaso Berzelius, agregar 0.5 g de asbesto calcinado y unas perlas de vidrio.
2. Adicionar 200 ml de H_2SO_4 al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante; inmediatamente colocar el vaso en el digestor, el cual debe estar previamente caliente, subir la parrilla y digerir durante 30 min exactos.
3. Retirar el vaso del digestor y filtrar sobre el filtro de lino con ayuda de vacío, lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente con 500 ml).
4. Transferir el residuo lavado y las perlas de vidrio al vaso Berzelius, agregar 200 ml de NaOH al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante; colocar el vaso en el digestor, subir la parrilla y digerir durante 30 min exactos.
5. Retirar el vaso del digestor y filtrar sobre el mismo filtro de lino con ayuda de vacío, lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el álcali (aproximadamente 500 ml).
6. Agregar al residuo 25 ml de alcohol etílico para facilitar su secado.
7. El residuo se pasa a un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante y se coloca en la estufa de vacío (60-65 °C) para secarlo, dejar enfriar en el desecador y pesar. (Secar hasta peso constante)
8. Carbonizar el residuo con ayuda de un mechero y luego pasarlo a la mufla para incinerarlo, dejar enfriar en el desecador y pesar. Realizar ésta última operación hasta que el crisol esté a peso constante, es decir hasta que entre dos pesadas del mismo no haya una diferencia mayor a 0.001 gramos.

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_s = peso del crisol con el residuo seco en gramos

P_c = peso del crisol con el residuo calcinado en gramos

m = peso de la muestra en gramos (referido al peso original de muestra)

CARBOHIDRATOS ASIMILABLES

Calculados por diferencia.

Se refiere a los carbohidratos digeribles y asimilables por el hombre como son los azúcares y los almidones; también se conocen como extracto libre de nitrógeno.

Es un dato obtenido de manera teórica restando al 100% el resultado de la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra cruda})$$

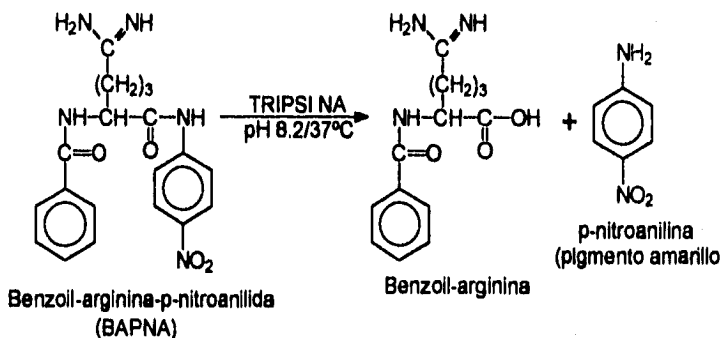
COMPONENTES ANTINUTRICIONALES Y TOXICOS

DETERMINACION DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Fundamento:

La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estandar de Tripsina (40 mg/10 ml) posteriormente se determina la actividad proteolítica remanente usando un sustrato sintético (Benzoil-arginina-p-nitroanilida [BAPNA]), el cual producirá coloración que es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de Tripsina y que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Material y Reactivos:

- * Potenciómetro CORNING Mod. 10
- * Parrilla con agitación magnética THERMOLYNE Mod. sp-13025
- * Baño maría GRANT Mod. SE10
- * Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER Mod.340
- * Mezclador de tubos LAB-LINE Mod. Super-mixer

-
- * NaOH 0.01N
 - * Solución amortiguadora de TRIS pH 8.2 y 0.05M (a)
 - * Solución BAPNA (b)
 - * Acido acético al 30%
 - * Solución estandar de tripsina (c)
 - * HCl 0.001N

Preparación:

- a. Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano): pesar 6.05 g de tris y 2.94 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 litro.
- b. Solución de benzoil-arginina-p-nitroanilida (BAPNA): disolver 100 mg de BAPNA en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido, la disolución es más rápida si se calienta en baño de agua a 37 °C, se afora a 250 ml con amortiguador Tris previamente calentado a 37 °C. Esta solución se prepara el mismo día de su uso y se mantiene a 37 °C.
- c. Solución estandar de Tripsina: pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina (SIGMA T-8253) y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001N. Esta solución contiene 20 μg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:

PREPARACION DEL EXTRACTO:

1. Pesar 1 gramo de muestra (finamente molida y desengrasada cuando el contenido de grasa sea superior al 5%) en un vaso de precipitado; adicionar

45 ml de NaOH 0.01N, ajustar el pH de la suspensión a 9.6 ± 0.2 y aforar a 50 ml con NaOH 0.01N.

2. Transferir a un vaso de precipitados y agitar mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 horas y media a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo retirar el magneto y dejar reposar el extracto durante media hora.
3. Decantar el sobrenadante y eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal manera que 1 ml del extracto produzca una inhibición entre 40 y 60%, esto ayuda a reducir la desviación estándar.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD:

1. Preparar 10 tubos de ensayo como se muestra en el cuadro 1. Agregar la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y ajustar el volumen final de cada tubo a 2.0 ml con agua destilada.
2. Adicionar a todos los tubos 2 ml de tripsina a 37 °C agitando cada tubo con el vortex. A los blancos se les adiciona además 1 ml de ácido acético para detener la reacción.
3. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37 °C y dejar incubar durante 10 min para que entren en contacto inhibitor y enzima.
4. Adicionar a cada tubo 5 ml de solución de BAPNA a 37 °C y volver a colocar los tubos en el baño de agua para incubarlos durante 10 min. Debe controlarse estrictamente el tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA para lo cual puede emplearse un cronómetro.
5. Detener la reacción enzimática añadiendo 1 ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.
6. Es frecuente la formación de precipitado o el enturbiamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min y después se filtra primero el sobrenadante y posteriormente la porción residual a través de papel Whatman # 1. El filtrado deberá estar translúcido.

A continuación se muestra el cuadro 1 que permite observar en forma esquemática la serie de tubos para la determinación de actividad inhibitoria.

CUADRO 1

Tubo	ml Ext.	ml H ₂ O	ml Std. Tripsina	Tiempo (min)	ml BAPNA 37°C	Tiempo (min)	ácido acético 30% (Aac)
B1	1.8	0.2	2.0+1.0 ml Aac*	5	5.0	10	0.0
1	1.8	0.2	2.0		5.0		1.0
B2	1.4	0.6	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
2	1.4	0.6	2.0		5.0		1.0
B3	1.0	1.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
3	1.0	1.0	2.0		5.0		1.0
B4	0.6	1.4	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
4	0.6	1.4	2.0		5.0		1.0
BR	0.0	2.0	2.0+1.0 ml Aac*		5.0		0.0
R	0.0	2.0	2.0		5.0		1.0

* A los blancos les adiciona enseguida 1 ml de ácido acético 30%.

7. La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotómetro a 410 nm en el espectro visible. Previamente se debe ir ajustando a 100% de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución. Es importante remarcar que el tubo que contiene 0.0 ml de extracto (40 mg tripsina/10 ml) es nuestra referencia y sobre este tubo se basarán los cálculos.

NOTA: Es importante trabajar cada tubo con su blanco porque en ocasiones se arrastran coloraciones del extracto directo provocando interferencias en el momento de leer en el espectrofotómetro, de este modo mediante el blanco se hace una corrección.

Cálculos:

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de los inhibidores de Tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina Inhibida (U.T.I.). La lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina:

$$U.T. = A \times 100$$

Ya que se tiene una serie de alícuotas, se tendrán a su vez una serie de valores de U.T., es conveniente determinar el % de inhibición para lo cual se toma como referencia el tubo 3 que es el que contiene 1 ml de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 al 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito.

$$\% \text{ Inhibición} = R - A3 \times 100$$

Donde:

R = U.T. de la referencia

A3 = U.T. del tubo 3

Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

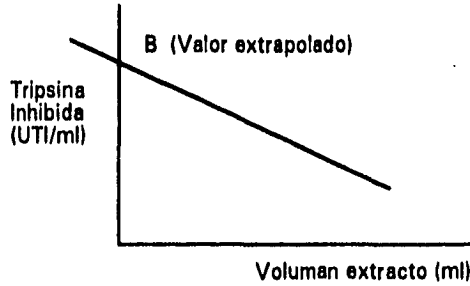
$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R = Valor de unidades de tripsina de la referencia

Cuando se grafica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) vs. ml de extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.

Gráfica U.T.I. / ml vs. ml de extracto



Este valor extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria real o verdadera (si se refiere uno al inhibidor de soya del tipo Kunitz).

Si la correlación lineal no es satisfactoria ($r < 0.9$), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar también en U.T.I./ml.

$$\text{U.T.I./ml} = \text{UTI} / \text{ml de extracto}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibida con respecto a 1 mg de muestra:

$$\text{U.T.I./mg muestra} = B \times F \times \frac{50}{1000}$$

Donde:

B = valor extrapolado o promedio en U.T.I./ ml

F = Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilucion(es) realizada(s). Cuando se tiene el extracto directo $F=1$.

HEMAGLUTININAS

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Fundamento:

La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza protéica hacia los eritrocitos. Se emplea la técnica de microtitulación basada en una serie de diluciones donde el punto final de aglutinación se determina mediante una estimación visual, para ello se requiere que los eritrocitos sean sensibilizados mediante una proteasa. En el presente estudio se llevó a cabo la determinación semicuantitativa de hemaglutininas con eritrocitos de hamster y con eritrocitos de conejo.

Material y Reactivos:

- * Agitador magnético con tacómetro THERMOLYNE
- * Centrifuga DYNAC
- * Tubos de centrifuga de 15 ml graduados PYREX
- * Incubadora BLUE-M
- * Espectrofotómetro COLEMAN Mod Junior IIA
- * Adaptador para celdas de 10 x 75 mm con abertura de 1 cm²
- * Filtro de vidrio de poro grueso
- * Microdilutor de 50 ml MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- * Pipeteador de gota de 50 ml DYNATECH
- * Placas para aglutinación tipo V
- * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
- * Sangre de hamster sensibilizada
- * Sangre de vaca sensibilizada
- * Solución salina al 1%

-
- * Solución salina al 0.9%
 - * Solución anticoagulante (a)
 - * Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b)
 - * Tripsina de pancreas porcino SIGMA T-8128
 - * Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005

Preparación:

- a. Cuando la sangre se use de inmediato, se pueden utilizar como anticoagulantes la heparina o citrato en las siguientes concentraciones:

15-20 UI de heparina por mililitro de sangre

0.1 ml de solución de citrato por ml de sangre

Si la sangre no se va a usar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es emplear la solución ELSEVER como anticoagulante en proporción 1:1. Esta solución es muy recomendable para mantener la sangre de vaca.

- b. En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se emplea sangre de cualquier roedor (hamster, ratón, rata, etc.) se recomienda sensibilizar con pronasa al 0.2% en solución salina.

Procedimiento:

PREPARACION DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA:

1. Suspender 1 g de muestra finamente molida y desengrasada (cuando sea necesario) en 10 ml de solución salina al 1%.
2. Extraer por agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

-
3. Centrifugar el extracto a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble.
 4. Filtrar el sobrenadante a través del filtro de vidrio de poro grueso, si es necesario se lava el residuo con solución salina al 1%.
 5. Aforar el filtrado a 10 ml con solución salina al 1%.

PREPARACION DE LA SANGRE:

1. Una vez sangrado el animal, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga la solución anticoagulante, homogeneizar suavemente.
2. Trasvasar la sangre con anticoagulante a tubos de centrifuga; lavar y centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos, 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es 1:5 aproximadamente. Si la sangre no está muy hemolizada es suficiente realizar dos lavados (el sobrenadante debe ser incoloro).
3. Después del último lavado, medir en el tubo de centrifuga la cantidad de paquete de eritrocitos y diluirlos al 4%, para lo cual se deben agregar 24 ml de solución salina al 0.9% por cada 1.0 ml de globulos rojos.

SENSIBILIZACION DE LOS GLOBULOS ROJOS:

1. Por cada 10 ml de suspensión de globulos rojos al 4% agregar 1 ml de solución de proteasa (para sangre de hamster se emplea pronasa al 0.2% y para sangre de vaca se emplea tripsina al 0.1%) y colocarlos en la incubadora a 37 °C durante 1 hora.
2. Centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante y dar 3 lavados con solución salina al 0.9% centrifugando a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos. Es importante realizar los tres lavados para eliminar completamente la enzima.
3. Después del último lavado resuspender el paquete de eritrocitos; por cada 1.0 ml de paquete de eritrocitos sensibilizados se agregan 19 ml de

solución salina al 0.9% (la suspensión queda al 5%). Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

AJUSTE DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS:

1. Tomar 1 ml de la suspensión de *globulos rojos sensibilizados* y agregar 4 ml de solución salina al 0.9%, mezclar. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm; se ajusta a 100% de transmitancia usando solución salina al 0.9% como blanco.
2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de 25% de transmitancia. Al final la suspensión debe quedar al 4% y dar dicha lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50 ml de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter, evitando tocar las paredes de los pozos.
2. Con un microdiluidor tomar 50 µl del extracto de la muestra, se introduce en el pozo sin tocar las paredes y se gira la base del pozo y se mezcla en el pozo siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto. Se recomienda chequear que el volumen que toma el microdiluidor sea el adecuado para lo cual se succiona una placa de prueba.
3. Con el pipeteador de gasa se adicionan 50 µl (una gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, se toca la pipeta en forma vertical y se mezcla a 37°C durante 1 hora.

solución salina al 0.9% (la suspensión queda al 5%). Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

AJUSTE DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS:

1. Tomar 1 ml de la suspensión de globulos rojos sensibilizados y agregar 4 ml de solución salina al 0.9%, mezclar. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm; se ajusta a 100% de transmitancia usando solución salina al 0.9% como blanco.
2. Diluir la suspensión hasta que la lectura sea de $25\% \pm 1$ de transmitancia. Al final la suspensión debe quedar al 4% y dar dicha lectura de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50 ml de solución salina al 0.9% en cada pozo de las placas tipo V del microtiter, evitando tocar las paredes de los pozos.
2. Con un microdilutor tomar 50 μ l del extracto de la muestra, se introduce en el pozo sin tocar las paredes y se gira, se saca del pozo y se introduce en el pozo siguiente de tal forma que se van llevando a cabo las diluciones del extracto. Se recomienda checar que el volumen que toma el microdilutor sea el adecuado para lo cual se emplea una placa de prueba.
3. Con el pipeteador de gota se adicionan 50 μ l (una gota) de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, se rota la placa en forma circular y se incuba a 37°C durante 1 hora.

LECTURA

Transcurrido el tiempo, colocar la placa en el dispositivo de lectura teniendo cuidado de no agitar la placa. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se considera positivo aquel pozo que presente una turbidez de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación) y negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritrocitos en el centro. Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

ALCALOIDES.

DETERMINACION CUANTITATIVA.

Fundamento.

Esta determinación se basa principalmente en el carácter básico que poseen los alcaloides.

Se realiza la extracción de alcaloides con metanol y posteriormente se acidifica el extracto, esta fase acuosa ácida, se alcaliniza con amoníaco para liberar las bases (alcaloides) y de esta forma son extraídos con un disolvente orgánico en el cual sean solubles (cloroformo).

El residuo de la extracción se hace reaccionar con ácido, y la cuantificación se lleva a cabo mediante una titulación ácido-base, en la cual se valora la acidez excedente que no reaccionó.

Material y Reactivos.

- * Balanza analítica.
- * Vaso de precipitados de 1 lt.
- * Vaso de precipitados de 50 ml.
- * Matraz de Yodo con tapón.
- * Parrilla de agitación CORNING Mod. PC-320.
- * Termómetro.
- * Matraz Kitasato.
- * Embudo Büchner
- * Papel filtro (Whatman No. 2).
- * Matraces de bola de 125 ml. (boca esmerilada 24/40).
- * Rotavapor BÜCHI Mod. R
- * Rotavapor BÜCHI Mod. RE 111
- * Parrilla con agitación magnética, LAB-LINE Mod. 1250.
- * Agitadores magnéticos.

-
- * Potenciómetro CORNING Mod. 10
 - * Embudos de Separación de 250 ml con llave de teflón.
 - * Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
 - * Microbureta de 5ml.
 - * Metanol (R.A.).
 - * Cloroformo (R.A.).
 - * Etanol (R.A.).
 - * Amoníaco Concentrado (apróx. 25%).
 - * Acido Clorhídrico (1%).
 - * Sulfato de Sodio Anhidro (R.A.).
 - * Solución de NaOH (0.01 N).
 - * Solución de H₂SO₄ (0.01 N).
 - * Rojo de Metilo (0.1%).

Procedimiento.

Se colocan 4 ó 5 gr. de muestra seca (secar por debajo de 50°C), finamente molida y previamente desengrasada (si el contenido de grasa es mayor al 5 %), en un matraz de Yodo, con 40 ml. de metanol y se mantiene toda la noche con agitación a una temperatura de 3°C.

Al día siguiente se coloca el matraz en Baño María a 46°C (± 2°C) en la campana, con agitación constante durante 4 hrs. Al cabo de este tiempo la mezcla es entonces filtrada , usando de preferencia papel de poro cerrado (Whatman No. 52), y el residuo es lavado con 20 ml. de metanol.

El extracto obtenido se pasa a un matraz de bola de 125 ml. y se evapora el metanol a sequedad en rotavapor.

A continuación, el residuo es resuspendido con 2 ml de metanol y 12 ml. de HCl (1%), la mezcla es agitada y filtrada, se usan 8 ml. de HCl (1%) para lavar el residuo, se combinan los extractos filtrados en un vaso de precipitados de 50 ml. con

un agitador magnético y se alcaliniza con amoníaco concentrado (aprox.25%) en un potenciómetro hasta llegar a un $\text{pH} = 9,5 (\pm 0,2)$.

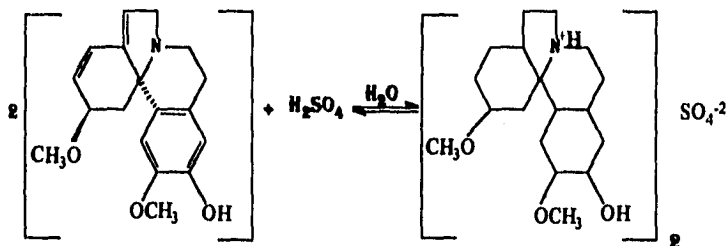
Posteriormente se vacía el extracto alcalinizado a un embudo de separación y se extrae con tres porciones de 20 ml. de cloroformo cada una dando la fracción "A";

En cuanto a la solución acuosa residual, se mide su volumen, y se le adiciona el mismo volumen medido de solución saturada de sulfato de sodio, para hacerla una solución media saturada, y se procede a extraerla con una mezcla de cloroformo-etanol (3:2 V/V) con tres porciones de 20ml cada una con lo cual se obtiene la fracción "B".

Las fases orgánicas son lavadas con 5ml de solución media saturada de sulfato de sodio y secadas con 5 gr. de sulfato de sodio anhidro.

Las dos fracciones "A" y "B", son evaporadas a sequedad en un rotavapor; y se le adicionan 6ml y 4ml de H_2SO_4 (0.010 N) respectivamente, se homogeniza y se calienta ligeramente en baño María para asegurar la completa disolución de los alcaloides, se pasa cuidadosamente a un matraz Erlenmeyer de 125 ml. lavando con pequeñas porciones de agua destilada. Adicionar 5 gotas de indicador rojo de metilo (0.1%), y valorar el exceso de ácido sulfúrico con hidróxido de sodio (0.01 N).

Cálculos: Sabemos que dos moléculas de alcaloide (Erythrina americana) reaccionan con una molécula de ácido sulfúrico en medio acuoso, formándose la sal del alcaloide.



Erisodina (70)

P.M. = 299 g / mol

Fórmula:

$$\text{mg de alcaloides / 100g de muestra} = \frac{(A-B) \cdot (N) \cdot (\text{mequiv}) \cdot 10^5}{m}$$

Donde:

A = ml de sosa gastados en el blanco.

B = ml de sosa gastados en la muestra.

N = Normalidad de la sosa.

m. equiv = 0.299 g / mmol.

(Peso molecular de la Erisodina, alcaloide mas abundante en el genero

Erythrina)

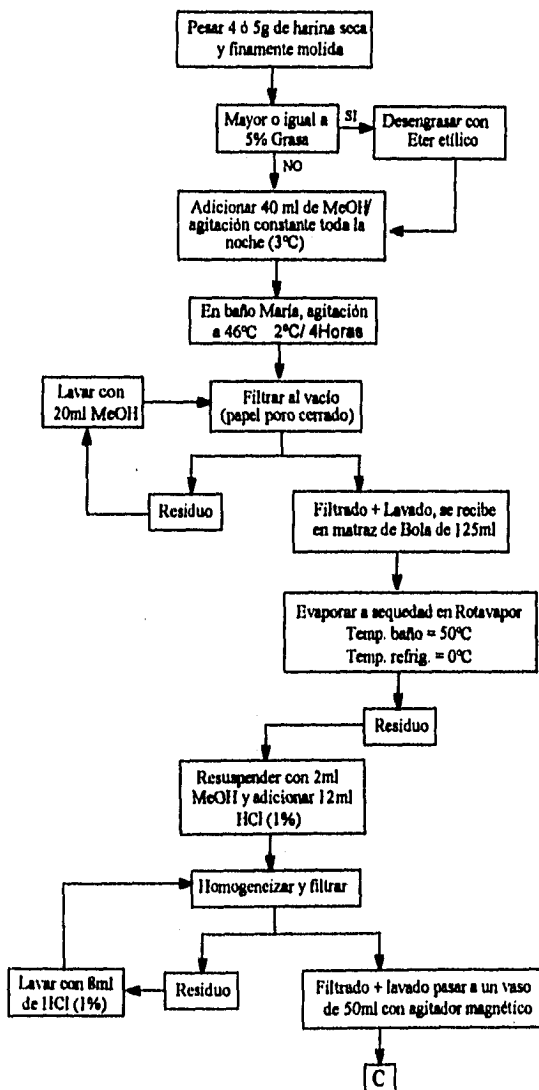
10^5 = Factor para obtener mg / 100g de muestra.

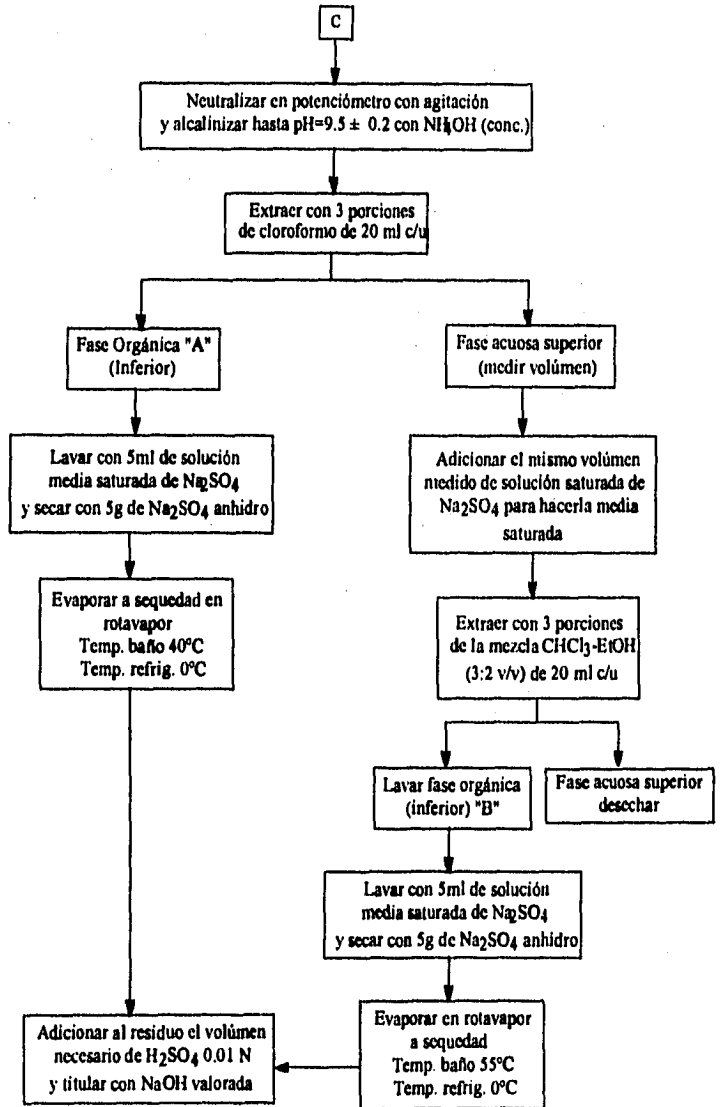
m = peso de la muestra (gramos).

Nota: Para el blanco se sigue el mismo procedimiento, empleando únicamente los reactivos.

En la figura 2 se muestra un esquema del procedimiento.

FIGURA. 2
DETERMINACION CUANTITATIVA DE ALCALOIDES





ALCALOIDES EN GRASA

DETERMINACION CUANTITATIVA

Fundamento.

Esta determinación se basa igualmente en el carácter básico que poseen los alcaloides como se mencionó anteriormente, con la diferencia de que aquí la grasa es directamente tratada con el ácido para la extracción de dichas sustancias.

Material y Reactivos

- * Balanza analítica.
- * Dispositivo de extracción Soxhlet.
- * Cartuchos de Celulosa (o papel filtro)
- * Embudos de separación de 125 ml.
- * Potenciómetro CORNING Mod. 10.
- * Matraz de bola.
- * Matraz aforado de 200 ml.
- * Pipetas volumétricas de 25 ml.
- * Rotavapor BUCHI Mod. RE 111
- * Eter de petróleo⁽¹⁾ o hexano.
- * Cloroformo (R.A)
- * Bicarbonato de sodio. (R.A)
- * Sulfato de sodio anhidro (R.A)
- * Solución de H_2SO_4 (2.0 N)
- * Solución de H_2SO_4 (0.01N)
- * Solución de NaOH (0.01N)

⁽¹⁾ En este caso se utilizó éter de petróleo, debido a que la determinación de grasa se hizo con este disolvente.

Procedimiento

Pesar de 100 a 150 g de la harina de la semilla previamente seca, y colocarlos en un cartucho de celulosa en el dispositivo Soxhlet durante 10 horas.

Realizar la extracción con hexano o éter de petróleo según se requiera.

Una vez obtenida la grasa, pesar 10 g aproximadamente y realizarle lavados con tres porciones de 20 ml cada una de ácido sulfúrico (2.0 N).

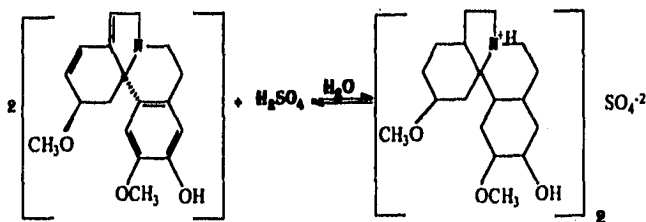
Separar la grasa del extracto ácido en un embudo de separación y realizarle varios lavados con agua destilada en caso de que se desee guardar para estudios posteriores.

A continuación, se procede a neutralizar la fase acuosa ácida con bicarbonato o carbonato de sodio y se ajusta en el potenciómetro a un pH=8.0 con solución diluida de NaOH.

Se pasa esta solución acuosa a un embudo de separación y se extrae con tres porciones de cloroformo cada una, se reúnen los extractos y se secan con sulfato de sodio anhidro. Se deja reposar durante media hora y se decanta o se filtra hecho esto se procede a aforar al volumen próximo superior y se homogeneiza.

Se procede a realizar por duplicado la titulación para lo cual se toma una alícuota de 25 ml. y se coloca en un matraz de bola, se evapora en rotavapor a sequedad y se resuspende el residuo con 10 ml de H_2SO_4 (0.01 N) y se titula con NaOH (0.01).

Cálculos:



Erisodina (70)

$$\text{mg de alcaloides / 100g de muestra} = \frac{(A-B) \cdot (N) \cdot (\text{mequiv})}{m} \cdot \frac{\text{aforo}}{\text{alcuota}} \cdot 10^5$$

Donde:

A = ml de sosa gastados en el blanco.

B = ml de sosa gastados en la muestra.

N = Normalidad de la sosa.

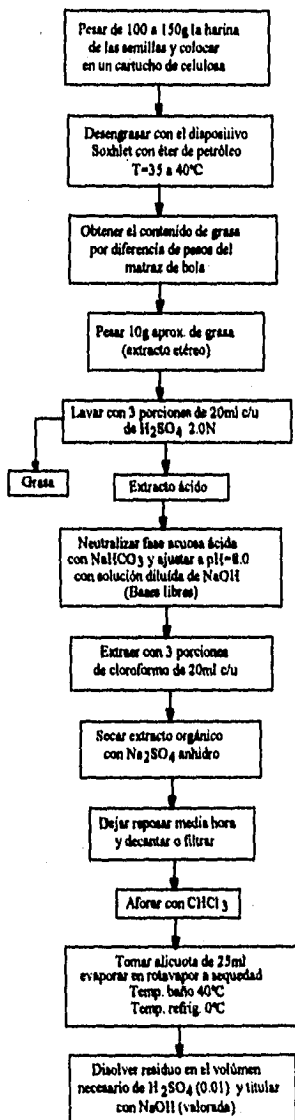
m.equiv. = 0.299 g / mmol.

10^5 = Factor para obtener mg / 100g de muestra.

m = Peso de muestra (gramos).

En la figura 3 se muestra un esquema del procedimiento.

FIGURA 3
DETERMINACION DE ALCALOIDES EN GRASA



RESULTADOS Y DISCUSION

Una vez colectada la materia prima, se le realizó una limpieza en forma manual para la determinación de parámetros físicos, con la finalidad de caracterizar el grano de colorín y de diferenciar los estadios de maduración, tanto de vainas como de semillas, los cuáles fueron establecidos en base a las características físicas de los granos como el color y el contenido de humedad. Se determinaron además el peso hectolítrico, el peso promedio de vainas y semillas, las longitudes de las vainas y el número de semillas por vaina. Ver cuadros 1 y 2.

Como podemos observar el peso hectolítrico es mayor para la semilla más seca (madura), además del número de semillas, debido al bajo contenido de humedad. Mismo comportamiento que se observa en los pesos de vainas y semillas, los cuáles disminuyen al alcanzarse la maduración.

Por otra parte vemos que el número de semillas es mayor en fases tempranas debido a que se encuentran selladas.

Las determinaciones del análisis proximal para el colorín (vainas semillas y flor) se hicieron por cuadruplicado, con el objeto de realizar un análisis estadístico, y saber con ello, si existe diferencia significativa en cuanto al contenido de nutrimentos en las diferentes fases, y en cual de ellas se encuentran en mayor o menor proporción, para ello se llevó a cabo un análisis de varianza de una variable (ANOVA), y la prueba de rango múltiple (Método de Duncan), ambas con un nivel de significancia de 95 % (71) este mismo análisis fue aplicado en los resultados de contenido de tóxicos.

Parámetros físicos

Colorín (Erythrina americana)

SEMILLAS

Cuadro 1

Fases	Peso Hectoltrico	No. de semillas	Humedad del grano (%)	Características físicas
I	47.86 ± 3.8	40.0 ± 16.53	75.68 ± 1.57	Grano color verde
II	49.72 ± 3.30	38.5 ± 7.36	65.76 ± 6.40	Grano verde con pintas naranjas
III	64.12 ± 0.67	86.5 ± 5.63	6.33 ± 6.33	Grano color rojo-naranja

Cuadro No. 2

VAINAS

Fases	Longitud vaina (cm)	Peso vaina (g)	Peso semilla (g)	No. de semillas por vaina
I	23.72 ± 6.35	24.48 ± 18.34	1.28	6.0 ± 2.17
II	18.35 ± 7.87	10.62 ± 8.29	1.37	4.0 ± 2.34
III	20.81 ± 6.87	2.84 ± 1.77	0.98	4.0 ± 2.38

Los resultados del análisis proximal en base seca de las semillas y de la flor de colorín se muestran en la tabla 1, se observa que las semillas presentan un alto contenido de proteína y grasa , (30-32 % y de 13- 21% respectivamente), y se ven incrementados conforme aumenta su estado de maduración, esto es factible ya que las semillas inmaduras presentan alto contenido de nitrógeno en forma de aminoácidos y anidas, los cuales son utilizados para la síntesis de proteínas o de sustancias de reserva almacenadas en forma de cuerpos proteicos en los cotiledones durante las etapas de maduración, hecho que tiene lugar durante la fase de expansión celular.⁽⁵⁰⁾

Estadísticamente existe diferencia significativa en el contenido de ambos nutrientes en las diferentes fases.

Con respecto a los carbohidratos, estos se ven disminuidos a lo largo de las diferentes fases, debido a los cambios que involucran el crecimiento y maduración de las semillas, durante los cuales, estos son utilizados en la formación de pared celular y síntesis de grasa que constituye el material de reserva, lo cual se refleja a su vez en el incremento del contenido lipídico.

En cuanto a cenizas y fibra cruda, se observa diferencia significativa en lo referente al contenido en las diferentes fases, y una tendencia de disminución conforme se alcanza la maduración.

Comparando a la semilla con la flor, por ser ambas, ricas fuentes de proteína y atractivas para ser sugeridas en la alimentación, en primera instancia animal, vemos que las semillas presentan un mayor contenido (> 30%), sin embargo la cantidad expuesta por las flores es significativa ya que cae dentro del rango del contenido proteico de las leguminosas (18-44%),⁽¹⁰⁾ lo cual concede a la flor importancia nutricional.

Tabla I
ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE LAS SEMILLAS Y DE LA FLOR
 g / 100g de muestra (base seca)^a

FASES	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHO'S ^a
Flor	7.96	23.26	1.51	18.96	48.30
I	4.77	30.25	13.55	21.11	30.30
II	4.21	31.82	18.69	17.04	28.22
III	3.95	32.62	21.11	15.75	26.54

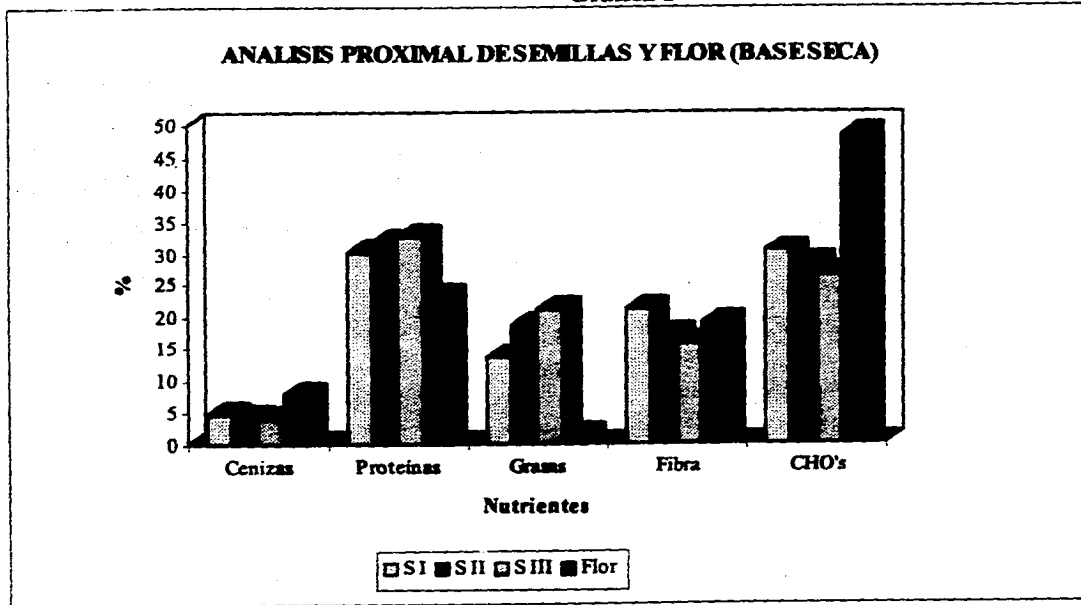
Humedades promedio: Fase I = 3.53%, Fase II = 5.66 %, Fase III = 6.33 %
 Flor = 4.07 %

^a CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

Por otra parte, se observa una marcada diferencia en su contenido de grasa, siendo más significativo en las semillas (> 13%) que en la flor (≈1.51%) ver en la gráfica I.

Sin embargo, vemos que la flor presenta mayor cantidad de carbohidratos (≈48%), que cualquiera de las diferentes fases de las semillas, esto hace que la flor sea también una fuente rica en estos nutrimentos energéticos.

Gráfica I



En cuanto al contenido de grasa y proteína en semillas y flor cuando son expresados en base húmeda (Tabla 2), se observa el mismo comportamiento, discutido anteriormente, los niveles son mas elevados en semillas que en flor, y aumentan al alcanzarse la maduración, más que nada por la pérdida de agua.

Con respecto a los carbohidratos, cenizas y fibra cruda presentan una tendencia de aumento en las semillas frescas, concentrándose en la última fase y rebasando los valores encontrados en la flor.

Tabla No. 2
ANALISIS PROXIMAL DE SEMILLAS Y FLOR
g / 100g de muestra (Base Húmeda)

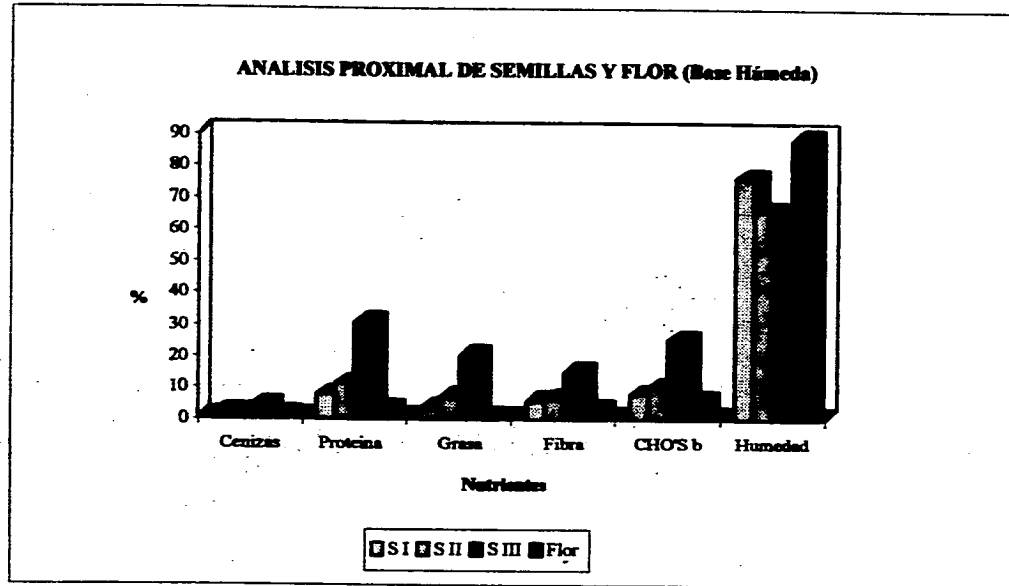
FASES	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHO'S *	HUMEDAD*
Flor	0.93	2.73	0.18	2.22	5.66	88.27
I	1.11	7.36	3.18	5.13	7.37	75.68
II	1.44	10.89	6.40	5.83	9.66	65.76
III	3.70	30.56	19.77	14.75	24.86	6.33

*CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

+Humedad = Humedad del fruto.

Estas observaciones pueden ser apreciadas con más claridad en la gráfica 2

Gráfica 2



En lo que respecta al análisis proximal de las harinas de las vainas (base seca Tabla 3), se observa mayor contenido de proteína en la fase inmadura ($\approx 12\%$), que en fases subsecuentes.

Haciendo un análisis comparativo de este mismo nutrimento con las demás partes de la planta, se tiene que la mayor concentración la presentan las semillas, después la flor y finalmente las vainas. (Tabla 4).

En cuanto al contenido de grasa, no se observa diferencia significativa en los diferentes estadios de las vainas (Tabla 3), presentándose valores muy bajos y cercanos a los encontrados en la flor, en relación a los que poseen las semillas. (Tabla 4)

El contenido de carbohidratos y cenizas se encuentra más ampliamente distribuido en las vainas y flor que en las semillas.(Tabla 4)

Por último, la fibra cruda se encuentra más ampliamente distribuida en vainas, principalmente en fases maduras (Tabla 3), quedando en segundo plano la flor y en último las semillas.(Tabla 4)

Tabla 3
ANÁLISIS PROXIMAL VAINAS.
(g / 100g de muestra (base seca)^a

FASES	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHO'S ^a
I	7.56	12.89	1.11	34.12	44.26
II	7.74	8.79	1.09	38.26	44.00
III	5.08	9.55	1.05	43.27	41.32

Humedades promedio: Fase I = 5.59 %, Fase II = 5.78 %, Fase III = 8.61
CHO'S^a = Carbohidratos asimilables por diferencia.

Gráfica 3.

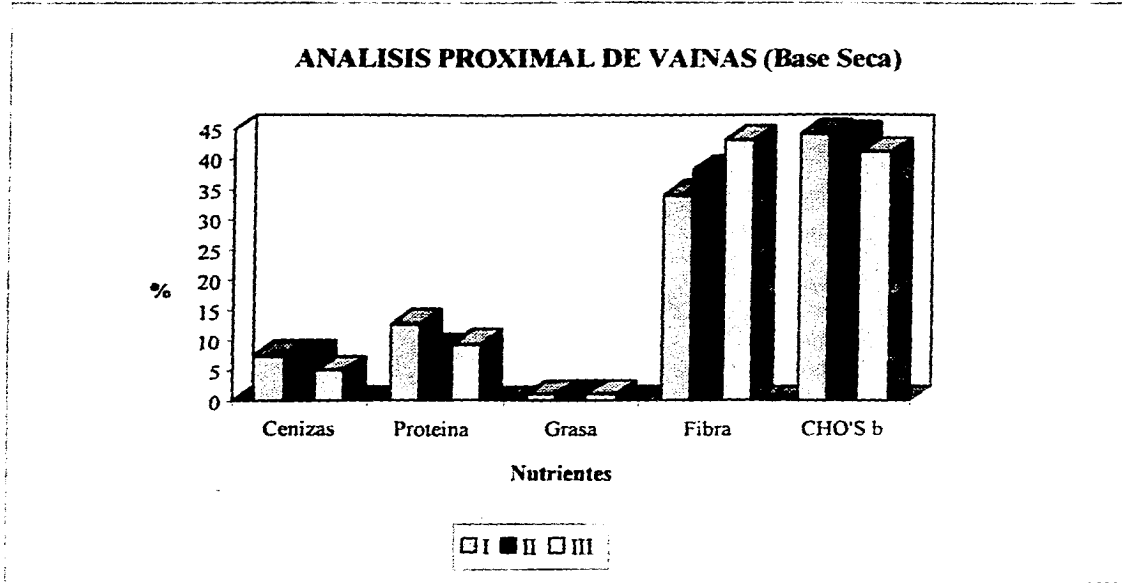


Tabla 4
COMPOSICION QUIMICA DE LAS SEMILLAS, VAINAS Y FLOR.
 g / 100g de muestra (Base seca)

FASES	CENIZAS	PROTEINA ¹	GRASA	FIBRA	*CHO'S
Flor	7.96 ^a ± 0.04	23.26 ^d ± 0.32	1.51 ^d ± 0.05	18.96 ^f ± 0.29	48.30 ^a ± 0.49
S ₁	4.77 ^e ± 0.07	30.25 ^{bc} ± 0.18	13.55 ^c ± 0.15	21.11 ^d ± 0.45	30.30 ^e ± 0.28
S ₂	4.21 ^f ± 0.07	31.82 ^b ± 0.44	18.69 ^b ± 0.20	17.04 ^e ± 0.38	28.22 ^f ± 0.49
S ₃	3.95 ^g ± 0.02	32.62 ^a ± 0.39	21.11 ^a ± 0.23	15.75 ^g ± 0.31	26.54 ^g ± 0.50
V ₁	7.56 ^{cb} ± 0.06	12.89 ^e ± 0.42	1.11 ^e ± 0.04	34.12 ^c ± 0.54	44.26 ^{bc} ± 1.13
V ₂	7.74 ^b ± 0.09	8.79 ^g ± 0.11	1.09 ^f ± 0.05	38.26 ^b ± 0.22	44.00 ^c ± 0.28
V ₃	5.08 ^d ± 0.03	9.55 ^f ± 0.14	1.05 ^g ± 0.005	43.27 ^a ± 0.52	41.32 ^d ± 0.25

a b c d e f g = Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

*CHO'S= Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

1= Factor de Conversión N₂* 6.25.

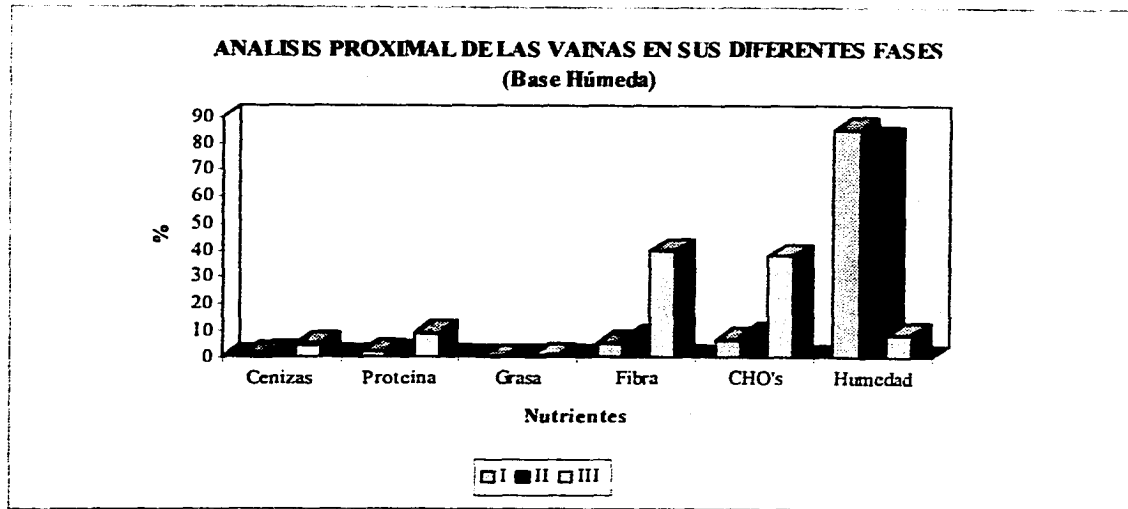
Analizando los valores de las vainas, expresados en material fresco (base húmeda Tabla 5), se observa una disminución de nutrientes en las primeras fases debidos al alto contenido de humedad, hallándose altos valores de carbohidratos y fibra en fases maduras. (Ver gráfica 5).

Tabla 5
ANALISIS PROXIMAL VAINAS
(g / 100g de muestra (base húmeda)

FASES	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	*CHO'S	HUMEDAD
I	1.15	1.95	0.17	5.17	6.70	84.92
II	1.43	1.64	0.20	7.07	8.14	81.50
III	4.64	8.73	0.96	39.55	37.51	8.61

*CHO'S = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

Gráfica 5.



La Tabla 6 nos muestra que existe diferencia significativa en cuanto al contenido de nutrimentos en las diferentes partes estudiadas de la planta (vainas, semillas y flor) en base húmeda.

Tabla 6
COMPOSICION QUIMICA DE LAS SEMILLAS, VAINAS Y FLORES.
g / 100g de muestra (Base húmeda)

FASES	% HUMEDAD	CENIZAS	PROTEINA	GRASA	FIBRA	CHOS
Flor	88.27 ± 0.26	0.93 ^a ± 0.005	2.79 ^a ± 0.04	0.18 ^a ± 0.005	2.22 ^a ± 0.03	5.66 ^a ± 0.06
S ₁	75.69 ± 1.57	1.11 ^f ± 0.02	7.36 ^d ± 0.04	3.18 ^e ± 0.03	5.13 ^f ± 0.11	7.37 ^a ± 0.07
S ₂	65.76 ± 6.40	1.44 ^e ± 0.03	10.89 ^b ± 0.15	6.40 ^b ± 0.07	5.83 ^d ± 0.13	9.66 ^c ± 0.17
S ₃	6.33 ± 0.16	3.70 ^b ± 0.02	30.36 ^a ± 0.37	19.77 ^a ± 0.21	14.75 ^b ± 0.28	24.86 ^b ± 0.50
V ₁	84.92 ± 1.57	1.15 ^e ± 0.02	1.95 ^f ± 0.06	0.17 ^a ± 0.009	5.17 ^a ± 0.08	6.70 ^f ± 0.17
V ₂	81.50 ± 2.15	1.43 ^d ± 0.02	1.64 ^g ± 0.06	0.20 ^a ± 0.008	7.07 ^a ± 0.04	8.14 ^d ± 0.05
V ₃	8.61 ± 0.02	4.64 ^a ± 0.03	8.73 ^c ± 0.13	0.96 ^d ± 0.005	39.55 ^a ± 0.47	37.51 ^a ± 0.51

a b c d e f g = Se encontró diferencia estadísticamente significativa.
CHOS = Carbohidratos asimilables calculados por diferencia.

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis de componentes antinutricionales (inhibidores de tripsina y hemaglutininas).

En cuanto a los inhibidores de tripsina los contenidos en las semillas en base seca son significativos en sus diferentes fases si se considera que a partir de 10 UTI / mg de muestra, la actividad del tóxico es de importancia; presentándose más concentrados en fases maduras (85.34 UTI / mg) valor que rebasa el contenido en soya cruda (64 UTI / mg)₍₆₅₎. Se observa una tendencia de aumento a lo largo de los diferentes estadios de maduración, esto es debido a que estas sustancias se producen durante el desarrollo de la semilla, previniendo la degradación de proteínas almacenadas cuando ésta madura. El papel de estos inhibidores es el de controlar la acción e proteasas endógenas.

Tabla 7
CONTENIDO DE TOXICOS NATURALES
(Base Seca)

Fases	Inhibidores de tripsina UTI / mg ^x		Lectinas (sangre de hámster) Título ^y		Lectinas (sangre de conejo) Título ^y	
SEMILLAS						
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
I	30.39 ^c	0.26	2 ^c	0.50	(-)	--
II	57.20 ^b	2.52	4 ^{ab}	0.53	(-)	--
III	85.34 ^a	3.04	4 ^b	0.52	(-)	--
VAINAS						
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
I	5.17 ^{ad}	0.44	7 ^d	1.22	2	0.50
II	3.95 ^f	1.11	5 ^{ef}	0.97	2	0.33
III	5.24 ^d	1.36	5 ^f	0.83	2	0.44
FLOR						
-	4.08	0.42	(-)	--	(-)	--

x. UTI / mg = Unidades de tripsina inhibida por mg de muestra seca.

y. Título = Máxima dilución donde se presenta aglutinación.

a b c d e f = Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Considerando el mismo parámetro de inhibidores, se observa que tanto las vainas como la flor, presentan valores muy bajos y poco significativos comparados con los de las semillas.

Con respecto al contenido de lectinas o hemaglutininas, el ensayo se llevó a cabo con diferentes eritrocitos. El realizado con sangre de hamster, permitió determinar la presencia del tóxico por ser células menos específicas y muy sensibles. Los títulos más altos se encontraron en las vainas de fases inmaduras, es decir que el tóxico se encuentra en mayor proporción en esta parte de la planta viéndose disminuidos al alcanzar la maduración, caso opuesto a lo que ocurre en semillas en las que se percibe un aumento en el contenido de dichos componentes al llegar a dicha etapa, lo cual nos lleva a suponer que exista, una posible transferencia de este factor antinutricional, de las vainas hacia las semillas, de hecho, en estas últimas, las lectinas suelen encontrarse concentradas en los cuerpos proteicos del endospermo, haciendo su aparición durante la maduración y desapareciendo en la etapa de germinación. (42)

Se observa diferencia estadística significativa entre la primera fase (fase inmadura) y las dos subsecuentes, en las que no hay diferencia, tanto para vainas como para semillas. Ver Tabla 7.

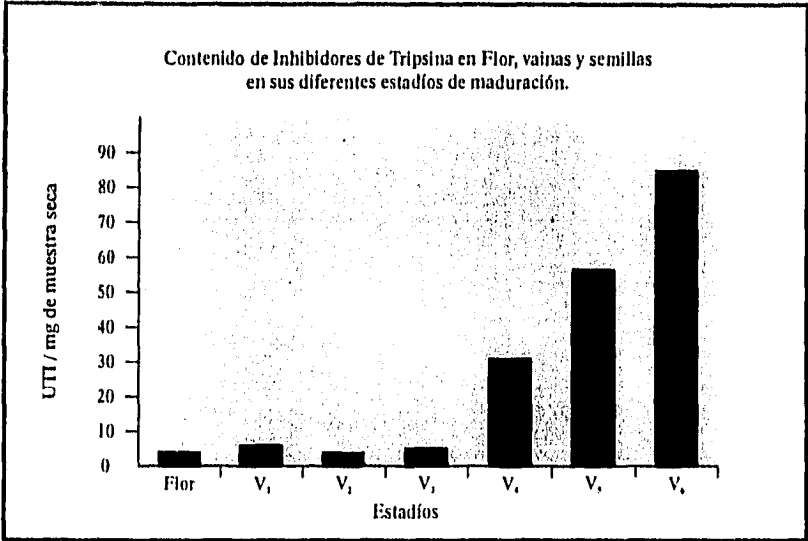
En lo que se refiere al contenido de estos dos tóxicos, cabe señalar que las semillas de leguminosas sintetizan y acumulan en forma eficiente cantidades de proteína, enzimas hidrolíticas y lectinas durante el curso de su desarrollo. (72)

Se observa que las flores se encuentran libres de la presencia de lectinas, ya que los dos tipos de sangre estudiados no presentaron aglutinación.

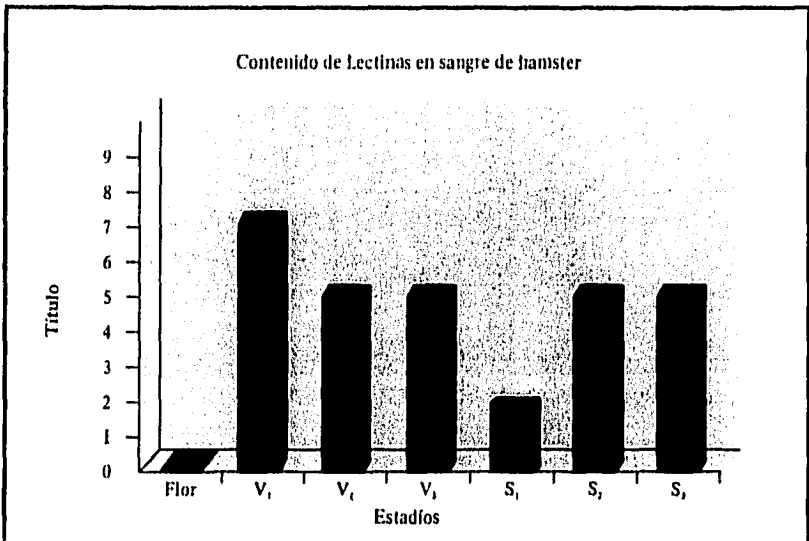
En cuanto al ensayo hecho con eritrocitos de conejo, éstos resultaron tener menor sensibilidad, observándose aglutinación y títulos bajos únicamente con los extractos de vainas, mismos que presentaron títulos altos con sangre de hamster.

En la gráfica 7 y 7a se muestran de forma más clara el comportamiento de estos tóxicos.

Gráfica No. 7



Gráfica No. 7a



En las Tablas 8 y 9 se ilustra la cantidad de alcaloides presentes en las vainas flores y semillas expresadas en base seca y húmeda respectivamente. Vemos que en el material fresco, estos tóxicos se ven disminuidos debido al alto contenido de humedad comparados con los contenidos observados en la harina, encontrándose en mayor proporción en las semillas principalmente en su forma madura siguiendo las vainas y finalmente la flor.

Con respecto a la cantidad presente de estas sustancias en las harinas se observa que se encuentran más concentradas en las fases tempranas de la semilla (0.49, 0.34, 0.31%), esto es factible debido a que los alcaloides suelen ser acumulados en tejidos activamente en crecimiento (48) mismo comportamiento que es observado en las vainas (0.28, 0.20, 0.04%). La harina de la flor por su parte presenta un 0.29 %.

Tabla 8
CONTENIDO DE ALCALOIDES
mg / 100g de muestra (Base seca)

Fases	mg de alcaloides / 100 g de muestra
Flor	297.25 ^d ± 2.27
Semilla I	493.37 ^a ± 0.42
Semilla II	343.96 ^b ± 2.94
Semilla III	316.12 ^c ± 1.29
Vaina I	283.94 ^e ± 2.51
Vaina II	205.90 ^f ± 0.49
Vaina III	43.61 ^g ± 3.07

abcdefg = Se encontró diferencia estadística significativa.

Nivel de significancia = 0.05 %

Comparando al colorin, con el género Lupinos, el cual es una leguminosa cuyas especies cultivadas representan un potencial importante en la alimentación y cuya limitante de uso extensivo es también el contenido de alcaloides, resulta difícil proponer la utilización directa del material en alguna fase, en la alimentación animal, debido a los altos valores encontrados de estas sustancias, ya que se establece que para la utilización de la semilla de dicho género en la alimentación humana y animal, es necesario reducir el contenido de dichas sustancias hasta niveles menores de 0.02 % (75, 76)

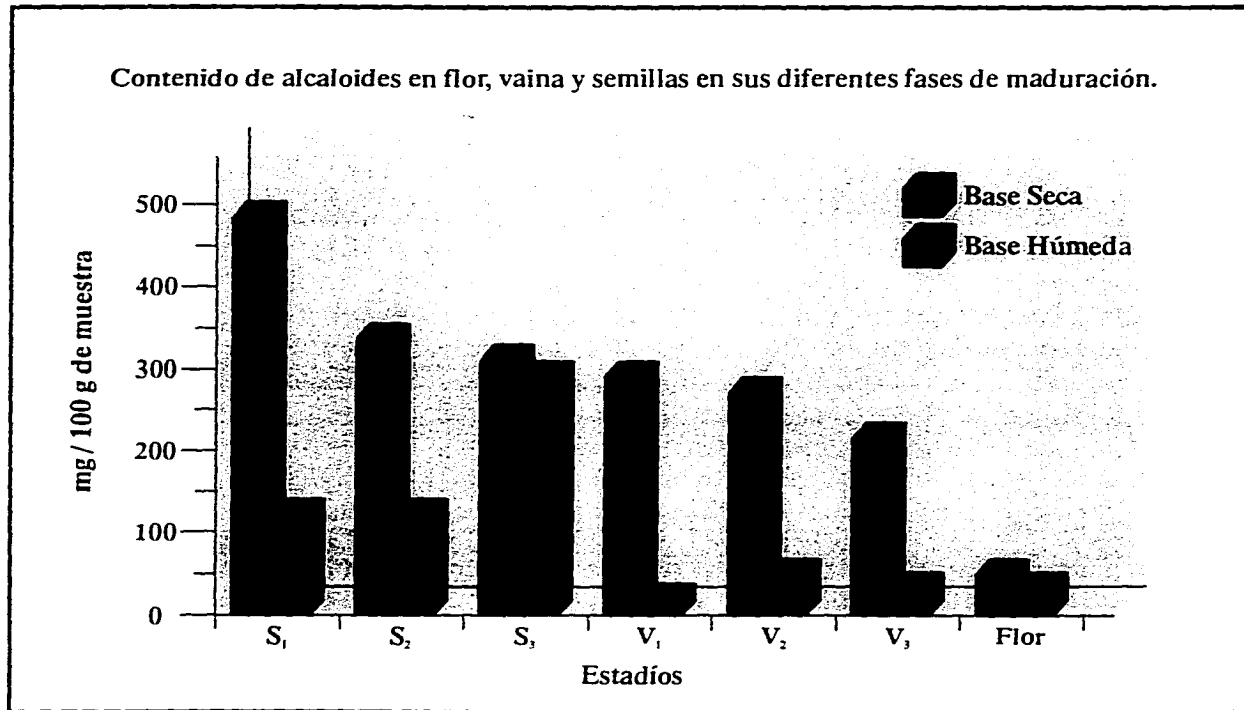
Aunque una de las ventajas que representan las semillas del género Lupinos es que los alcaloides que las contienen son solubles en agua, por lo que pueden ser removidos y reducidos mediante extracciones acuosas. propiedad misma de la que carecen los alcaloides presentes en el género Erythrina.

Tabla 9
CONTENIDO DE ALCALOIDES
mg / 100g de muestra (Base Húmeda)

Fase	mg de alcaloides / 100 g de muestra
Flor	34.85 ^b ± 0.27
Semilla I	120.29 ^b ± 0.09
Semilla II	118.48 ^c ± 1.00
Semilla III	297.05 ^d ± 1.21
Vaina I	43.22 ^d ± 0.08
Vaina II	38.08 ^e ± 0.08
Vaina III	38.27 ^e ± 0.87

abcdefg = Se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Gráfica No. 8 y 9



Por otra parte, nos atrevemos a comparar ambas leguminosas debido a ciertas similitudes que presentan en cuanto a su efecto farmacológico. Sin embargo, de previos estudios realizados se reportan parámetros de toxicidad aguda, la D.L.₅₀ de la esparteina (potente alcaloide de Lupinos), en ratón es de 220 mg / Kg, administrado por vía oral, y que el D.L.₅₀ de la β - eritroidina (alcaloide presente en género Erythrina) es de 120 mg / Kg suministrado en la misma especie y por la misma vía, y de 2-3 mg / Kg en gatos igualmente por vía oral. (17, 18)

Esto último nos confirma la elevada toxicidad que representa esta especie de Erythrina americana(Colorín).

Finalmente en la tabla 10 podemos observar la cantidad de alcaloides presentes en la grasa de las semillas en cada una de sus diferentes fases, estas cantidades son mínimas en relación al elevado contenido lipídico y al elevado contenido de dichos tóxicos en la semilla, observándose una tendencia de disminución conforme esta madura.

Estos datos fueron corroborados con previos trabajos relacionados con la caracterización y determinación de alcaloides en extractos lipídicos crudos, realizados por el Dr. Marcos Soto de la Universidad de Chapingo, en los cuáles se reporta una concentración de 96 mg de alcaloides / 100g. de extracto,

Otros estudios califican al extracto etéreo del colorín de moderado a ligeramente tóxico. (19)

En un estudio de toxicidad subaguda, realizada en animales se les administró extracto de colorín destoxificado y se observó que a partir de la segunda semana éstos se mostraron altamente nerviosos, hipersensibles, con hiperventilación y taquicardia e incluso con una conducta agresiva. Lo anterior permite decir que pese a que el extracto de colorín no provocó decremento ó ganancia de peso en los animales ni produjo alteraciones macroscópicas en diferentes órganos (hígado, riñón y bazo) puede deberse a la concentración de alcaloides relativamente baja y a su posible efecto farmacológico.

Tabla 10
Contenido de alcaloides en grasa
mg / 100 g de grasa

Muestra	mg / 100 g de grasa
Grasa semilla fase I	70.0
Grasa semilla fase II	62.0
Grasa semilla fase III	24.0

CONCLUSIONES

Existe diferencia significativa en cuanto a la composición proximal de vainas y semillas, observándose que el contenido de proteína y grasa es mayor en estas últimas, y las vainas muestran contenidos mayores de cenizas, carbohidratos y fibra cruda.

Pese al alto contenido de proteína y grasa encontrados en la semilla en sus diferentes fases, ninguna de ellas puede ser utilizada directamente en la alimentación animal, debido a que todas presentan factores tóxicos, de los cuales los alcaloides resultan determinantes en la limitación de su consumo.

La flor por su parte, posee alto contenido proteico, de carbohidratos, fibra cruda y cenizas, por ello puede ser potencialmente utilizada, además de que no posee hemaglutininas, y su contenido de inhibidores de tripsina es significativamente bajo. En su forma fresca el contenido de alcaloides es menor y estos se ven disminuidos durante el cocinado, se recomienda que cuando estas sean consumidas, se complementen con otros alimentos.

A pesar del bajo contenido de alcaloides en la fracción lipídica, estos resultan ser tóxicos aún en mínima concentración.

Previo a una minuciosa investigación para determinar su inocuidad, tal vez, sea posible la utilización de las vainas y flores en la alimentación animal por el hecho de presentar menores contenidos de alcaloides que las semillas.

Finalmente no se debe descartar el uso de estas semillas en la alimentación animal especialmente en ruminantes hasta agotar posibilidades de detoxificación encontrando así inocuidad de este material.

SUGERENCIAS

Se sugiere que si se continua este trabajo se enfoque a la eliminación de los alcaloides.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguirre Beltrán Gonzalo. "Producción de alimentos y cultura" en Cuadernos de Nutrición, 7 (2):18-32 (1984)
 2. Roldán Amaro José A. "Nutrición desarrollo social e historia" Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. División de Nutrición de Comunidad México, D.F. (1992)
 3. Tenorio Jimenez Ma. Esther. "Evaluación protelco-calórica de dos semillas de Erythrina destoxificadas". Tesis de licenciatura UNAM México (1993)
 4. Sinha, S.K.; "Las leguminosas alimenticias" FAO, Estudios de producción y protección vegetal No. 3 p. 1-8, Roma (1978)
 5. Barba, A.A.; Luna, R.S.; "Los recursos vegetales de México" Tópicos de investigación y posgrado. Vol.1 No.1; ENEP-Zaragosa, UNAM p. 22-32, México (1989)
 6. Urquiza, G.; ¿ Y ahora, qué comemos ? ICYT: Vol.10 No.144, p.41-43, México (1988)
 7. Badui, D.S.; Química de los alimentos. Ed. Alhambra, p.41-44, 108-114, México (1981)
 8. Flores, M.; Bressani, R. and Elias L.G. Factors and tactics in suenting consumer food habits and patterns. In: Potencial of field beans and other legumes in Latin America. Cali. Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical p.88-114 (CIAT Series Seminar 1973)
 9. Sotelo, A.; Soto, M. and Giral, F. "Comparative Studies of the Alkaloidal Composition of two Mexican Erythrina Species and Nutritive Value of the Detoxified Seeds. J. Agric. Food Chem. 41, 2340-2343 (1993)
 10. Bourges, R.H., " Las leguminosas en la alimentación humana" en Cuadernos de Nutrición,, 10 (1): 17-32 (1987)
 11. Raven, P. Erythrina (Fabaceae); Archievements and oportunites. Lloydia, 37 (3): 321-331 (1974)
 12. Corona, Ma. M. "Estudio Químico y algunos factores tóxicos de la leguminosa silvestre Erythrina americana. Tesis Fac. de Química UAP Puebla (1982)
 13. Gil, V. Leticia Valor nutritivo de algunas flores comestibles Tesis Fac. de Química UNAM México (1992)
 14. Krukoff, B.A. and Barneby, R.C. Conspectus of species of the genus Erythrina Lloydia, 37 (3): 365-391 (1974)
 15. Hart, F., Análisis moderno de los alimentos. Edit. acribia España p.247-250 (1971)
-

-
16. Pearson D., *The Chemical Analysis of foods* Churchill Livingstone. New York p.13-40 (1976)
 17. Wilson, H., *Intestinal absorption* W.B. Saunders Filadelfia p.69-72 (1962)
 18. Savelkoul, F.H.M.G., Van der Poel, A.F.B. and Tamminga, S. The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42: 71-85, (1992)
 19. Contreras L. E. Valor nutritivo de leguminosas silvestres de la península de Yucatán, Tesis Fac. de Química UNAM (1992)
 20. Liener, I.E. Legume toxin in relation to protein digestibility A Review. *J. Food Sci.*, 4: 1076 (1976)
 21. Elkowicz, K., y Sosulski F.W., Antinutritive factors in Eleven Legumes and their Air-classified. Protein and starch fractions. *Journal of Food Science*, 47: 1301-1304 (1982)
 22. Ferrando, R., Alimentos tradicionales y no tradicionales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO Roma (1980)
 23. Franz, H., Ziska, P., y Morh, J., Lectins- definition and classification. *Acta histochem.*, 71: 19-21 (1982)
 24. Boyd, W.C. y Shadleigh, E., Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins), *Science* 119: 419 (1954)
 25. Goldstein I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. What Should be-called a Lectin?, *Nature* 285: 66, (1980)
 26. Harborne, J.B., Bouffer, D. y Turner, B.L. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press, p.p. 367- 462, N.Y. (1971)
 27. Salahuddin, A. Legume Lectins: Homologous proteins with similar structure but distinct Carbohydrate binding specificity. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 29:388-393 (1992)
 28. Saint-Paul, M., *Transfusion* 4: 3 (1961)
 29. Yamasaki, Nobuyuki, Kimura, Makoto Isolation and characterization of isolectins from *Erythrina variegata* seeds. *Journal of Chromatography*, 597: 207-211 (1992)
 30. Fukuda, Nobuhiro, Hidaka, Toshiro y Harugoro Y. Isolation and characterization of A lectin from *Erythrina variegata* (Linn) var. *orientalis* seed. *Agric. Biol. Chem.*, 54 (2): 413-418 (1990)
 31. Van Driessche, E., Structure and function of leguminosae lectins. *Advances in Lectin Research*, 1: 73-134 (1988)
 32. Stillmark, H. Uber ricin *Arch. Pharmacol. Inst. Darpat* 3: 59, (1889)
 33. Lis, H. y Sharon, N. *The Biochemistry of plants A comprehensive treatise* (Stumpf, P.K y Conn E.E.) Vol. 6 Academic Press p.p 371-433 N.Y. (1981)
-

-
34. Jaffé, W.G. *Acta Cient. Venez* 1: 62-64 (1950)
 35. Tedeshi, G.G., Petrelli, F and Amic D. Toxic properties of a protein fraction extracted from *Phaseolus vulgaris*. *Italian J. Biochem.*, 14: 237-251, (1965)
 36. Jaffé, W.G. and Vega Lette, C.L. Heat labile growth-inhibitory factors in beans *J. Nutr.* 94: 203-210, (1968)
 37. Puszai, A., Clarke, E. and King T.P. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.*, 38: 115-120 (1979)
 38. Sotelo, A., Arteaga M.E., Frías, I., and Gonzalez Garza, M.T. *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.*, 30: 79-85 (1980)
 39. Jaffé, W.G., and Camejo, G. *Acta Cien. Venez* 12: 59-61 (1961)
 40. Lindner, E. *Toxicología de alimentos*, Edit. acribia Zaragoza, España, p. 1-21 (1978)
 41. Whitaker, J.R. and Feeny, R.E., Enzyme inhibitors in food in: *Toxicants occurring naturally in foods*. National Academy of Sciences Washington D.C., USA p.276-298 (1973)
 42. Lener, I.E. *Toxic constituents of plants foodstuffs*, 2nd. edition Academic Press, Inc. New York , USA p. 7-37, 73-99, 143-157, 161-181. (1989)
 43. Joubert, F.J; Carlsson F.H.H and Haylett T. Purification and some properties of two proteinase inhibitors (DE-1 and DE-3) from *Erythrina latissima* (Broad Leaved Erythrina) seed. *Hopp-Seyler's Physiol. Chem.*, Bd. 362: 531-538 (1981)
 44. Bressani, R. ; Flores, M., and Elias L.G. Acceptability and value of foods legumes in Latin America. *Coli Colombia Series Seminars No. 2E* p. 161-187 (1973)
 45. Nava, R., Ma. S. y Rodriguez R. *Composición Química y contenido de compuestos tóxicos termolábiles en dos variedades de frijol en diferentes fases de desarrollo* Tesis Fac. de Química, UNAM p.13-14 México (1988)
 46. Liener, I.E. "Toxic factors in edibles legumes and their elimination" *Amer. J. Clin. Nutr.*, II: 281-298 (1962)
 47. Gómez, J.C. Koch and Brunnes J.R. Isolation of a trypsin inhibitor from navy beans by affinity chromatography, *Cereal chem.* 56 (6): 525-529 (1979)
 48. Miller, L.P. *Phytochemistry*, Van Nostrand Reynold Co. Vol.II p. 118-170 N.Y. (1973)
 49. Pelletier, S.W. *Alkaloids: Chemical and Biological perspectives*. John Wiley & Sons p. 2-27 N.Y. (1982)
 50. Salisbury, F.B. Ross, C.W., *Plant Physiology*, (4th.) edition Wadsworth Publishing company p.326-332. (1992)
 51. Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. *Introduction to Plant Biochemistry*. Pergamon Press, p.308 N.Y. (1974)
-

-
52. Folkers, K. and Major R.T. Isolation of Erythroidine an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* J. Amer. Soc. 59: 1580-1581 (1937)
 53. Folkers and Koniuszy Erythrina alkaloids IX Isolation and characterization of erysodine, crysopine and crisovine. J. Amer. Chem. Soc. 62 : 1673 (1940)
 54. Folkers, K. and Koniuszy F. Erythrina alkaloids VII. Isolation and characterization of the new alkaloids. Erythraline and Erythratine. J. Amer. Chem. Soc., 62:436-441 (1940)
 55. Payne, L.D. The alkaloid of Erythrina; Clonal evaluation and metabolic fate. Avail. Univ. Microfilms Int. Order 10-32 (1991)
 56. Payne, L. D. and Foley Joe P. Gas Chromatography and Mass Spectrometry of Erythrina alkaloids from the foliage of genetical clones of Erythrina Species Chromatography Pharmaceuticals, 312 : 85-99 (1992)
 57. Aguilar, M.I.; Giral, F.; Espejo, O. Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana* Phytochemistry 20 (8): 2061- 2062, (1981)
 58. Kinghorn, A.D. and Smolenski " Alkaloids of papilionoidea" Advances in Legume Systematics e.d. R.M., Pohill & P.H. Raven p. 585-595 (1981)
 59. Chawla, H.M.; Sharma S.K.; Erythritol, a new isoquinoline alkaloid from *Erythrina variegata* flowers. Fitoterapia, 64 (1): 15-17 (1993)
 60. Sharma S.K. and Chawla, M. Isococcoline: A new isoquinoline alkaloid from *Erythrina variegata* flowers Indian Journal of heterocyclic chemistry, 2 : 71-74 (1992)
 61. Wandji, J.; Fomum, Z.T.; Tillequin, A.L. ; Skaltsounis and Koch M. *Erythrina senegalensis* H and I: Two New Isoflavones from *Erythrina senegalensis*. Planta Med. 60 : 178-180 (1994)
 62. Nguyen Van Tuu; Pham Thanh Ky; Hoang Thi Bach Yen; Pho Duc Thuan " The anti-inflammatory effect of the total alkaloids extracted from the leaves of *Erythrina orientalis* ap Chi Duoc Hoc 1: 25-27 (1992)
 63. Soto, H.M. and Jackson, A.H. Studies of alkaloids in Foliage of *Erythrina berteroaana* and *E. poeppigiana*: Detection of β -Erythroidine in goats Milk. Phytochemical Analysis, 4 : 97-99 (1993)
 64. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists published by AOAC, Inc. Hietrich, K. (Editor) 15 th edition Vol. 1 and 2 Arlington p. 17-18, 40-62, 69-83, 1012 (1990)
 65. Kakade, M.I. Rackis, J.J. Mog hee, J.E. and Puski, J. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem., 51: 376-382. (1974)
 66. Jaffé, G.W. y Brucher, O. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles. Arch. Latinoamer. Nutr., 22 : 267-281. (1972)
 67. Jaffé G.W., Levy, A. and Gonzalez, D.I. Isolation and partial characterization of beans phytohemagglutinins. Phytochemistry, 13: 2685- 2893
 68. Hultin, Eskil and Torssell Kurt Alkaloid- Screening of swedish plants. Phytochemistry, 4 : 425-433 (1965)
-

-
69. Hargreaves, R.T., Johnson R.D., Millington, D.S., Alkaloids of American Species of Erythrina. *Lloydia*, 37 (4) : 569-579 (1974)
70. Abdullah, M.I. Barakat, I.E., Games, P., Ludgate. V.G. Studies of Erythrina Alkaloids, part III G.C / M.S Investigations of Alkaloids in the seeds of a further species *Annals. of the Missouri Botanical Garden* 66 : 533-540 (1979)
71. Paquete estadístico "STATGRAPHICS" versión 5.0 Statistical Graphics System. 2115 East Jefferson Street, Rockville, M.D. 20852. (1991)
72. Chrispeels, M. Biosynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. *Phil. Trans R.Soc. Lond B.* 304: 309-322 (1984)
73. Groos, R., Morales, E., Gross, U. und Von Bar, E., Die Lupine sein Beitrag zur Nahrungsversorgung in den Anden 3. Ernährungsphysiologische Untersuchung mit dem Mehl der Süßlupine (*Lupinus albus*) *Z. Ernährungswiss.* 15: 391-395 (1976)
74. Juárez, C.H. Destoxificación comparativa de 3 especies de lupinos silvestres y de *Lupinus mutabilis* cultivada en México Tesis ENCB del IPN p. 31-44, (1991)
75. Manzur, M., Polankowski, p. and Szadowaka, A. Pharmacological studies on lupanine and 13-hidroxilupanine. *Act. Physiol. Pol.*, 17 : 299- 309 (196)
76. Conca Torres A. "Evaluación química y biológica de la grasa cruda y destoxificada de dos semillas de Erythrina mexicanas." Tesis de licenciatura UNAM México (1993)
77. Luxon, S.G. (ed.); Hazards in the Chemical Laboratory; Sth. ed., Royal Society of Chemistry; Cambridge, U.K.; p.77 (1992)

No me preocuparé por el futuro, mi éxito y mi felicidad no dependen de que me esfuerce en adivinar lo que me awaits debidamente en el horizonte, sino en hacer el día de hoy lo que tengo claramente al alcance de la mano.