

28
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES

EAC DE QUIMICA

**"DETERMINACION DE FACTORES TOXICOS Y
ANTINUTRICIONALES EN ALGUNAS SEMILLAS
CRUDAS Y PROCESADAS CONSUMIDAS EN LA
ETNIA TENEK DEL MUNICIPIO DE AQUISMON,
S. L. P.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MONICA OSTOA MONTES



MEXICO, D. F.

1997.

**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 López
Vocal	Prof. Pedro Valle Vega
Secretario	Prof. Bernardo Lucas Florentino
1er. Suplente	Prof. Leticia Gil Vieyra
2do. Suplente	Prof. Hugo Sousa Rojano

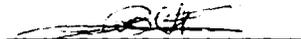
Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,
UNAM**

Asesor

Firma

M. en C. Bernardo Lucas Florentino



Sustentante

Firma

Mónica Ostoa Montes



A G R A D E C I M I E N T O S

**AL M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO POR LA ASESORÍA Y DEDICACIÓN QUE ME BRINDÓ PARA LLEVAR A CABO ESTE TRABAJO, PERO SOBRE TODO POR EL APOYO, COMPRENSIÓN Y CONSEJOS Y POR SABER ESCUCHAR.
GRACIAS.**

A LA M. EN C. ANGELA SOTELO POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS PARA LA MEJOR REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

AL GRUPO DE INVESTIGADORES DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS POR EL APOYO RECIBIDO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, POR ESA GRAN OPORTUNIDAD Y ORGULLO DE PERTENECER A ELLA.

A ESE SEGUNDO HOGAR DURANTE CINCO AÑOS, LA FACULTAD DE QUÍMICA, POR TODA LA FORMACIÓN ACADÉMICA RECIBIDA.

A LA VIDA MISMA, POR PERMITIRME UNA VEZ MÁS OTRA OPORTUNIDAD.

A MIS PADRES GUADALUPE Y ROLANDO:
PORQUE GRAN PARTE DE MIS METAS Y REALIZACIONES SON ALGO QUE FORMA PARTE DE USTEDÉS, PORQUE ME HAN APOYADO A LO LARGO DE MI VIDA Y PORQUE NUNCA ME CANSARÉ DE AGRADECER Y DE SENTIR TODO ESE CARÍÑO Y AMOR QUE ES ENORME. GRACIAS.

A MIS ABUELOS, CHELA Y RODOLFO:
GRACIAS POR TODO EL APOYO PERO SOBRE TODO POR ESE GRAN CARÍÑO Y CONFIANZA QUE ME HAN BRINDADO DESDE SIEMPRE, Y PORQUE USTEDES SON UN GRAN EJEMPLO A SEGUIR. LOS QUIERO MUCHO.

A ANGY:
ERES UN GRAN EJEMPLO PARA MÍ, PERO SOBRE TODO ERES UNA GRAN HERMANA Y MI AMIGA. GRACIAS POR TU APOYO Y CONSEJOS EN TODO Y PARA TODO. TE QUIERO MUCHO.

A JOSÉ:
PORQUE AL IGUAL QUE ANGE, ERES UNA PERSONA ADMIRABLE, MÁS QUE POR SU LOGROS PROFESIONALES POR SU CALIDAD HUMANA Y POR ESA SENCILLEZ QUE TE CARACTERIZA. GRACIAS POR TODO.

A RAMÓN:
POR TODO EL APOYO QUE ME HAS BRINDADO EN TODO MOMENTO, POR ESA MOTIVACIÓN Y PACIENCIA, PERO SOBRE TODO POR SEGUIR COMPARTIENDO ESA CONFIANZA, Y ESTE AMOR QUE TÚ SABES ES ENORME. TE AMO.

A MIS FAMILIARES MÁS CERCANOS, POR LOS GRATOS MOMENTOS COMPARTIDOS.

A AQUELLAS PERSONAS QUE CONTINUAN CONMIGO A TRAVÉS DE LOS RECUERDOS Y DE LOS MOMENTOS QUE COMPARTIMOS, PORQUE DE ESTA MANERA PERMANECEN VIVOS EN MÍ.

A MIS PROFESORES:
POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS Y EXPERIENCIAS.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA FACULTAD DE QUÍMICA CON LOS CUALES COMPARTÍ CINCO AÑOS ÚNICOS E INOLVIDABLES.

ESPECIALMENTE A FERNANDA, FLOR, ROSARIO, ULISES Y MARTHA, POR ESOS MOMENTOS MARAVILLOSOS.

A MIS SIEMPRE AMIGAS ALE Y NORMA, CON CARÍÑO, Y PORQUE ESTA AMISTAD CONTINÚE COMO HASTA AHORA.

A LETY Y HUGO POR SU AMISTAD Y APOYO Y POR ESAS INOLVIDABLES CONVERSACIONES.

A LA SEÑORA VICKY POR SU INTERÉS EN NUESTROS AVANCES Y POR ESAS PALABRAS DE ALIENTO.

A BUBU POR SER SIMPLEMENTE MI MEJOR AMIGO.

A ALFONSO: PORQUE LO MÁS VALIOSO QUE APRENDI DE TÍ FUE "VIVIR" Y ES UNA DE LAS MEJORES ENSEÑANZAS QUE HE RECIBIDO.

A SOL YA QUE TUVE LA FORTUNA DE CONOCERLA Y APRENDER DE ESA LABOR TAN VALIOSA QUE REALIZA, Y QUE ME HA ENSEÑADO A TRATAR DE SER MEJOR SER HUMANO Y ENCONTRAR LA MANERA DE VIVIR MEJOR. GRACIAS.

INDICE

	PAG.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	5
3. GENERALIDADES	6
3.1 FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES PRESENTES EN ALIMENTOS	6
3.2 GENERALIDADES DE LA ETNIA TENEK Y DEL MUNICIPIO DE AQUISMÓN, S.L.P	6
3.3 GENERALIDADES DE LAS MUESTRAS VEGETALES EN ESTUDIO	7
3.3.1 <i>Brasimum alicastrum</i>	7
3.3.2 <i>Cucurbita pepo</i>	8
3.3.3 <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	9
3.3.4 <i>Jatropha curcas</i>	11
3.3.5 <i>Phaseolus sp</i>	14
3.4 ASPECTOS GENERALES SOBRE FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES DE ORIGEN VEGETAL MÁS FRECUENTE	15
3.4.1 INHIBIDORES ENZIMÁTICOS	15
3.4.1.1 INHIBIDORES DE PROTEASAS	16
3.4.1.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA	16
3.4.2 LECTINAS O HEMAGLUTININAS	20
3.4.3 SAPONINAS	25
3.4.4 GLUCOSINOLATOS	31
3.4.5 GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS	36
3.4.6 ALCALOIDES	41
4. PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	44
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO	45
4.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES	45
4.2.2 CONDICIONES DE PROCESAMIENTO PARA LAS MUESTRAS VEGETALES	46
4.2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	47
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.	49
4.3.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	49
4.3.2 DETERMINACIÓN DE GRASA CRUDA	50
4.3.3 DETERMINACIÓN DE COMPONENTES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES	51

4.3.3.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA	51
4.3.3.2 LECTINAS O HEMAGLUTININAS	57
4.3.3.3 SAPONINAS	60
4.3.3.4 GLUCOSINOLATOS	63
4.3.3.5 GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS	66
4.3.3.6 ALCALOIDES	71
5. RESULTADOS	76
5.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	76
5.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA	78
5.3 LECTINAS O HEMAGLUTININAS	80
5.4 SAPONINAS	82
5.5 GLUCOSINOLATOS	86
5.6 GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS	90
5.7 ALCALOIDES	92
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	94
6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	94
6.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA	94
6.3 LECTINAS O HEMAGLUTININAS	95
6.4 SAPONINAS	97
6.5 GLUCOSINOLATOS	98
6.6 GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS	98
6.7 ALCALOIDES	99
7. CONCLUSIONES	100
8. BIBLIOGRAFÍA	103

INTRODUCCIÓN

La humanidad desde sus inicios ha sustentado una lucha continua por el abastecimiento de sus necesidades, siendo la principal, la alimentación: aunque bien sabemos que el crecimiento poblacional y el incremento en la disponibilidad de viveres no ha ido a la par. Con respecto a lo anterior, se menciona que somos cerca de 6 mil millones de habitantes en el mundo y los recursos alimenticios para esta población son escasos. Este problema se acentúa en países en vías de desarrollo como el nuestro y en especial en las zonas rurales marginales: sin embargo, en la mayoría de estas regiones tropicales y subtropicales se dispone de recursos de origen animal y vegetal que son pobremente aprovechados. (1-3)

Sabemos muy bien que la selección de los alimentos de los cuales disponemos hoy en día se realizó en base al sistema empírico de "Ensayo-Error", ya que en realidad las plantas y animales que han servido históricamente como fuente de alimentos para el hombre, no fueron diseñados por la naturaleza para tal propósito, con excepción de la leche materna. (4-6). El método de "Ensayo-Error" definitivamente fue muy drástico, y desde el punto de vista toxicológico sólo pudo evidenciar el problema de toxicidad aguda o a corto plazo: sin embargo, hasta la actualidad y en base al uso ancestral de los alimentos que fueron seleccionados en forma empírica, más que por un estudio sistemático, se acepta como válido que sean seguros y algunos autores los denominan "Alimentos Tradicionales o Convencionales". (4,7,8). No obstante, un aspecto toxicológico que no pudo ser visualizado por nuestros ancestros y que incluso en la actualidad no es totalmente apreciado, es el factor de la toxicidad crónica o a largo plazo, la cual se puede presentar por la ingesta frecuente y continua de algunos alimentos cuya caracterización no se ha realizado por completo. Este aspecto que presentan los alimentos, en especial los de origen vegetal, es uno de los principales retos en la investigación toxicológica de los alimentos; consecuentemente, los alimentos y la dieta son lo que en la vida cotidiana dan lugar a

INTRODUCCIÓN

un mayor número de suposiciones, mitos y tabúes, que en muchos de los casos no tienen en ningún momento las bases científicas que lo sustenten (4,6,8)

Con respecto a lo anterior vale la pena reconsiderar lo expresado por el Dr. Eduard Saama, quien establece que: "No cabe duda de que el uso, la domesticación y el cultivo de las especies vegetales más extendidas han sido determinados en gran medida por el azar, y están condicionados por los valores sociales, económicos y políticos de las culturas dominantes. Es muy probable que si el proceso hubiera sido cuidadosamente programado y las especies hubieran sido seleccionadas en base a los datos científicos de que hoy disponemos, el resultado hubiera sido distinto" (1)

Considerando lo anterior, podemos decir que por el descubrimiento de América, se presentó un cambio significativo en todos los aspectos, en especial en los hábitos alimentarios, principalmente para el nuevo Continente, por lo cual en el curso del intercambio desaparecieron o quedaron marginados, productos que en el pasado habían ocupado un lugar destacado en la alimentación y en la economía de vastas regiones, cediendo su lugar a cultivos "extraños", que con el tiempo desencadenaron cambios en los hábitos alimentarios (1,9,10)

En Mesoamérica el cambio y marginación de las plantas alimenticias ha sido un proceso relativamente largo y difícil, y estas alteraciones sumamente drásticas afectaron con mayor fuerza a las comunidades que tuvieron mayor contacto con la población dominante, así, las comunidades indígenas marginadas han mantenido sus cultivos tradicionales y conservan las técnicas para su manejo y utilización. Esta información empírica se ha acumulado a través de los siglos, buscando satisfacer sus necesidades básicas, con las variedades de especies animales y, sobre todo, vegetales que les rodean, las cuales se han ido presentando por selección natural, mutaciones o incluso introducidas por otras culturas indígenas, además, en estas comunidades rurales, la forma de aprovechar los recursos naturales tiende a ser integral, lo cual es congruente con la denominada agricultura sustentable que tanto se busca. (11-13).

Paradójicamente, nuestro país, que tiene una posición ventajosa en lo referente a la riqueza, abundancia y variedad de especies vegetales, carece de un inventario florístico que abarque todas las regiones; por lo tanto, no existe una completa caracterización química de esta riqueza, y por lo tanto no existe la posibilidad de un aprovechamiento integral (3,14-17)

En lo que respecta a las condiciones reales de la alimentación y nutrición de la población rural marginal, existe un profundo desconocimiento que incluye hasta lo más básico, como son los recursos naturales con que cuentan (11,13,14) En estas zonas se maneja el mito de que se consume una dieta monótona y poco variada, sin embargo, hay claros ejemplos que demuestran lo contrario

Precisamente el grupo de investigadores de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, encabezado por la Dra. Margarita Ávila, ha realizado el estudio etnobotánico en la comunidad Tenek, del municipio de Aquismán, S.L.P., encontrándose que por lo menos 32 especies vegetales de su entorno son utilizadas para complementar su dieta de tortillas, frijol, chile y café. también se observó que muchas de estas especies vegetales más que cultivadas, son favorecidas o protegidas por los Tenek, quienes poseen el conocimiento del manejo y preparación de éstas con fines alimenticios. (18,19) Además este mismo grupo de investigadores realizó, de la mayoría de estas especies vegetales, el análisis proximal, con la finalidad de seleccionar las especies más prometedoras en el aporte de proteínas y calorías; ya que es bien conocido que en estas zonas la desnutrición infantil se presenta por la escasez tanto de proteína como de grasa dietética. (18,20)

No obstante, para proponer estas especies vegetales como significativas aportadoras complementarias de macro y micronutrientes en la dieta básica de esta comunidad, es importante efectuar un estudio sistemático integral donde se contemple el estudio toxicológico, el cual en primera instancia consiste en determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de sustancias tóxicas y antinutricionales que con mayor frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal, ya que

éstas pueden causar un problema de toxicidad aguda o crónica por la ingestión frecuente y/o continua de estos alimentos "No convencionales". (4.6.7.14)

En base a todo lo anterior, la finalidad del presente trabajo, precisamente, es determinar el contenido de factores tóxicos y antinutricionales de cinco especies vegetales, que pueden ser aportadores complementarios tanto de proteína como de grasa dietética a esta comunidad Tenek, y en especial a la población infantil que es la más sensible y en donde se presenta un elevado porcentaje de desnutrición. (18-20)

2. OBJETIVO

- **OBJETIVO GENERAL:**

Efectuar la caracterización químico-toxicológica, cualitativa y cuantitativamente de los factores tóxicos y/o antinutricionales que con mayor frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal, en cinco especies vegetales.

- **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar inhibidores de tripsina, lectinas o hemaglutininas, saponinas, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos y alcaloides en las siguientes semillas:

Nombre científico:

Brosimum alicastrum

Cucurbita pepo

Enterolobium cyclocarpum

Jatropha curcas

Phaseolus sp

2. Efectuar la determinación en el material vegetal crudo y en caso de estar presentes factores tóxicos y/o antinutricionales termolábiles, realizar la determinación en el material vegetal sometido a diferentes tratamientos térmicos, para así determinar si existe una disminución de estos factores en el material biológico.

3. GENERALIDADES

3.1 Factores tóxicos y antinutricionales presentes en alimentos.

Las sustancias nocivas en los alimentos por su modo de acción se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Las sustancias antinutritivas - El efecto tóxico de éstas se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida de los nutrientes esenciales. Dichas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicadas. A largo plazo determinan la aparición de una patología particular. Pertenecen, por ejemplo a este grupo las sustancias que provocan el bocio, que actúan aumentando las necesidades de yodo del organismo, y los inhibidores de las enzimas digestivas, tales como el factor antitripsina de las leguminosas
- Los tóxicos de los alimentos, de efectos nefastos, que no pueden compensarse por aporte suplementario de nutrientes. Son compuestos que tienen un efecto tóxico sobre un tejido u órgano. Su modo de acción puede explicarse, sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o, en ciertos casos, por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología. (21)

3.2 Generalidades de la etnia Tenek y del municipio de Aquismón, S.L.P.

Los huastecos de San Luis Potosí se llaman a sí mismos *Tenek*, que quiere decir "los que viven en el campo con su idioma, sangre y comparten la idea".

La mayoría de los tenek de San Luis Potosí viven en la región de la Huasteca, al oriente del estado, localizada dentro de la cuenca del río Pánuco. Esta región cubre una superficie de 10238 km² distribuidos en 18 municipios. Once municipios concentran al 90% de los tenek, de los cuales sobresalen por orden de importancia

Aguismón, Tanlaajás, Ciudad Valles, Huehuetlán, Tancanhuitz, San Antonio, Tampamolón y San Vicente Tancuayalab

El municipio de Aguismón está situado entre las faldas de la Sierra Madre Oriental, entre los 21° 32' y 21° 50', latitud norte, y 98° 52' y 99° 05', longitud oeste, con una extensión de 602.8 km². El clima de la región es cálido húmedo, con lluvias en verano y otoño, más una estación seca en invierno y primavera. La precipitación promedio al año es de 1500 mm y la temperatura media, superior a los 18 °C.

Las principales actividades productivas de la región son la agricultura y la ganadería, siendo los principales cultivos el de caña de azúcar y la naranja. Además de los cultivos comerciales, los huastecos cuentan con el solar del que obtienen plantas medicinales, comestibles y de otros usos (18,22,23)

3.3 Generalidades de las especies vegetales en estudio

3.3.1 *Brosimum alicastrum*

Junto con el maíz, los frijoles y las calabazas, *Brosimum alicastrum* fue una de las plantas que utilizaron y probablemente sembraron los antiguos mayas (1)

Esta planta es conocida también con los siguientes nombres comunes:

Ojosh (San Luis Potosí), ojite (Norte de Veracruz), capomo (Colima, Jalisco, Michoacán) y ramón (Yucatán, Chiapas y Quintana Roo)

Sus características botánicas son: Árbol grande, de jugo lechoso, hojas ovales u oblongas de 4.5-8.5 cm., agudas, fruto globoso, amarillo o anaranjado de 15-20 mm., comestible. Planta forrajera. Pertenece a la familia de las Moráceas (24)

En lo que se refiere al valor nutricional de esta semilla se ha reportado en base a un análisis químico, que su contenido proteínico es de 7.8% (en base seca). Esta semilla, entre otras más, fue empleada en un estudio para la alimentación del ratón espinoso *Heteromys desmarestianus*, siendo el consumo de esta semilla moderado,

durante el tiempo que duró el experimento y el valor dietético obtenido fue uno de los mejores, de entre todas las muestras estudiadas (25)

3.3.2 *Cucurbita pepo*

La familia de las Cucurbitáceas, es uno de los grupos de plantas con mayor número de especies utilizadas como alimento humano. Dentro de esta familia, el género *Cucurbita* se destaca como uno de los más importantes. *Cucurbita pepo*, junto con otras especies ha sido domesticada en el Nuevo Mundo y durante largo tiempo han sido cultivadas o al menos manejadas en cierto grado por el hombre americano.

De igual manera, esta y otras especies han aportado desde tiempos remotos productos alimenticios imprescindibles en la dieta de las comunidades rurales y de algunas urbanas del continente americano.

Sus características botánicas son: plantas rastreras, compactas o subarborescentes, anuales, monoicas; pubescente-escabrosas. Hojas anchamente ovado cordadas a triangular-cordadas, de 20-30 x 20-35 cm., con o sin manchas blancas, a menudo profundamente 3-5 lobuladas; márgenes denticulados a serrado-denticulados. Zarcillos con 2-6 ramillas o simples y poco desarrollados en los tipos subarborescentes. Flores pentámeras, solitarias, axilares, las masculinas con pedicelos de 7-20 cm de largo, cáliz campanulado de 9-12 mm, sépalos lineares, de 12-25 x 1-2 mm, corola tubular campanulada, de 5-10 cm. de largo. Flores femeninas con pedicelos robustos, sulcados, de 2-5 cm., ovario globoso, oblato ovaide, cilíndrico, raramente piriforme, liso, costado o verrucoso, multilocular, cáliz muy reducido. Frutos de tamaño muy variable y formas diversas, suave a fuertemente costillados, con frecuencia verrucosos, raramente lisos, cáscara rígida, de coloración diversa, verde claro a oscuro, liso a diminutamente moteada en crema o verde, contrastando con amarillo, anaranjado o bicolor; pulpa crema o amarillenta o anaranjada pálida, de suave y no amarga a fibrosa y amarga, semillas numerosas, angostamente o anchamente elípticas a raramente orbiculares, levemente comprimidas, de 3-20 x 4-12 mm.

Las partes comestibles son los frutos maduros o tiernos y las semillas, y en menor grado las flores y las puntas tiernas de los tallos

Las semillas son el producto más importante, desde el punto de vista nutricional, principalmente por su alto contenido de aceite (39%) y proteína (44%) (1). En un estudio realizado por Henderson y colaboradores se determinaron factores antinutricionales en cinco especies del género *Cucurbita*, incluyendo *Cucurbita pepo*. Los factores antinutricionales medidos fueron inhibidores de tripsina, lectinas, fitatos y oligosacáridos, empleando como material de referencia a la soya. Los resultados fueron 69.2% de proteína, para inhibidores de tripsina 6.3 UTI/ mg de proteína en el material crudo y 1.6 UTI/ mg de proteína en el material tratado térmicamente (30 min, 121°C en autoclave). Para el caso de las lectinas, se emplearon tres fuentes de eritrocitos, bovinos, de conejo y de hamster. Los resultados se reportan en valores de dilución 2^n , donde n representa el número de diluciones efectuadas para desarrollar la aglutinación. Los valores son 4.8 y 64 respectivamente para cada fuente de eritrocitos, esto en el material crudo y 1.2 y 1 en el material tratado térmicamente. Para el caso de fitatos, se encontró un 2% y para oligosacáridos 25% de sacarosa, 0.8% de rafinosa y 1.1% de estaquiosa (26)

3.3.3 *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

Esta especie vegetal es conocida con los siguientes nombres comunes: orejón (Veracruz, sureste de San Luis Potosí), parota (Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán), piche (Tabasco), guanacaxtle (Oaxaca, Sinaloa) (24). Perteneció a la familia de las leguminosas, las cuales es bien conocido son ricas en proteínas, (aunque esta proteína no se considera de buena calidad, ya que el contenido de aminoácidos azufrados es reducido); además su contenido de carbohidratos es elevado, lo cual significa que constituyen una buena fuente energética. Sin embargo, una de las características de esta familia es que contienen algunos factores tóxicos y/o antinutricionales tales como: inhibidores de tripsina, lectinas, etc. (14)

Las características botánicas de esta especie son las siguientes: Árbol grande hasta de 45 m de altura y hasta de 3 m de diámetro. hojas bipinadas, con hojuelas muy numerosas, linear-oblongas, de 10-12 mm. flores blancas, en cabezuelas. fruto de vaina ancha, encorvada, semejando una oreja, de 8-12 cm, con semillas morenas de 12 mm. (24)

La distribución de *Enterolobium cyclocarpum* es muy extensa en el territorio mexicano, sin embargo, se trata de una especie vegetal poco estudiada y sobre la cual la información es contradictoria. Se afirma que personas y animales se intoxican al beber el agua contaminada con esta especie vegetal, pero los reportes difieren respecto de la naturaleza de las sustancias responsables de tales envenenamientos. Según algunos autores es una planta rica en taninos, mientras que otros afirman que no los posee y que el principio tóxico es un alcaloide, denominado pitecolobina. El uso popular que se hace de la corteza y frutos de este árbol es el de sustitutos del jabón para lavar la ropa, de donde se desprende el origen de la intoxicación al consumir el agua de pozas o riachuelos contaminados. En la intoxicación se ve afectado el aparato digestivo, se observan cólicos y abundante diarrea. (27)

En lo referente a la toxicidad de esta especie, se han realizado estudios donde se reporta que al alimentar a ratas con esta semilla fue altamente tóxica, mas sin embargo, mostró niveles bajos de lectinas esencialmente no tóxicas, sugiriendo estos resultados que la toxicidad puede deberse a otros factores antinutricionales. (28)

En otro estudio realizado con la goma exudada de esta leguminosa, se detectó la presencia de taninos, los cuales no están permitidos en productos alimenticios. (29)

Uno de los usos específicos que la comunidad en estudio le da a esta semilla, es como complemento de su dieta básica, como ya se mencionó anteriormente. La forma de preparación consiste en un proceso de alcalinización, utilizando para ello cenizas del fogón (pH=13) y calor. Después las lavan y las muelen, obteniendo así una masa que se agrega como relleno a unas "gorditas" llamadas bocoles que elaboran con masa de maíz nixtamalizado. También se consume esta semilla tostada. (18)

Otra forma de consumo común en los estados de Morelos, Guerrero y Michoacán es tostarlas y molerlas en salsa de chile. (14)

En estudios sobre semillas de leguminosas realizados por Sotelo y colaboradores, se analizó entre otras muestras a *Enterolobium cyclocarpum*, encontrando que esta semilla tiene aproximadamente un 22% de proteína y cerca del 60% de carbohidratos asimilables. Como todas las leguminosas, resultó deficiente en aminoácidos azufrados, pero con alto contenido en lisina. (14,16)

De igual manera en otro estudio se encontró que esta semilla contiene altas concentraciones de nitrógeno no proteico, pero excepto por pequeñas cantidades de homoserina, la contribución de aminoácidos no proteicos no fue identificada. (30)

En lo referente a factores tóxicos y antinutricionales, se determinaron inhibidores de tripsina, conteniendo 24.04 UTI/ mg de muestra seca. Asimismo se determinó la actividad hemaglutinante, empleando eritrocitos de vaca, de conejo y de humano, encontrándose actividad nula. También se efectuó la prueba para determinar alcaloides, resultando negativa. (16)

3.3.4 *Jatropha curcas*

Esta especie vegetal pertenece a la familia de las Euforbiáceas. Es un arbusto o árbol caducifoleo de jugo lechoso, de 1-6 m; el tronco alcanza un diámetro de 14 a 18 cm. Un látex blanquecino de sabor amargo y olor a hierba fresca emana del tallo al cortarse. Tiene hojas alternas, de 6-35 cm, con 3-5 lóbulos cortos y largamente pectinados; flores amarillo-verdosas; el fruto es una drupa oval, que cambia del verde al amarillo conforme madura. Mide de 4-5 cm de largo y de 3-4 cm de ancho. De sabor amargo y aceitosas; contiene tres semillas ovoides de color negro mate.

Se le conoce como piñón (Chiapas), piñoncillo (Oaxaca y Veracruz), sangregado (Sinaloa), avellanas purgantes, piñón purgante, frijol grande del Perú, entre otros. (24)

Entre los usos principales de esta planta, los arbustos se emplean frecuentemente como cercas vivas y como fijadores de dunas móviles cercanas a las playas. De su tallo emana un látex blanquecino que es utilizado en algunas zonas para curar infecciones bucales en los niños. Sin embargo, otros autores reportan que la ingestión del látex provoca irritación intensa en la garganta, dolores abdominales, diarrea, vómito y en algunas ocasiones gastroenteritis severa (27)

Las semillas maduras y tostadas se usan como alimento, y su sabor es semejante al de la pepita de calabaza. Se comen preparándolas en jamoncillo, y como condimento de ciertos platillos regionales como mole, tamales y otros (31,32)

En lo referente a la toxicidad de esta planta, existe una gran diversidad de información al respecto, en muchos casos contradictoria. Se ha reportado que cuando la semilla es ingerida verde o madura sin el proceso de tostado, produce en muchos casos efectos laxantes, vómito, náuseas y diarrea. También se ha reportado que las hojas son tóxicas para el ganado (33)

Retomando el aspecto tóxico de esta planta, posiblemente la confusión o diversidad de resultados se debe a la clasificación botánica de la planta, ya que en un trabajo previo se menciona que en Florida, existen dos variedades de esta especie, una de ellas con semillas tóxicas y otra inocua. Sin embargo, también se menciona que en un estudio taxonómico se habla de una sola variedad y se infiere una posible confusión debido a un error repetitivo que ha aparecido desde el siglo pasado al confundir a *Jatropha curcas* con *García nutans*, la cual es tóxica (31)

En otro estudio posterior, se menciona que en Jalisco, los lugareños de la zona costera acostumbran incluir en su dieta al "piñón tropical", el cual durante mucho tiempo se clasificó como *Jatropha curcas* Linn, sin embargo, al recurrir a la bibliografía en torno al aspecto farmacológico de esta especie, se encontró que en todos los casos reportados, se presentó intoxicación grave debido a la ingestión de esta semilla. Por lo anterior se realizó una clasificación botánica del "piñón tropical", llegándose a la conclusión de que esta especie es en realidad *Jatropha mcvaughii*.

Dentro de este mismo estudio, se analizó a la par, semillas de *Jatropha curcas* Linn y de *Jatropha mcvaughii*, encontrándose que ambas semillas poseen un contenido elevado de aceite y de proteína, por lo cual se sugiere puedan ser utilizadas como alimento o complemento alimenticio para humanos y animales, ya que debido a los estudios efectuados de toxicidad aguda se concluyó que ninguna de las dos semillas es tóxica. (32)

En otros trabajos realizados en Sudán, con la semilla de *Jatropha curcas*, se probó el efecto tóxico hacia carneros y chivos, al incluir ésta en la dieta, los síntomas presentados por los animales fueron diarrea, consumo reducido de agua, deshidratación, ojos hundidos e inapetencia. Los principales cambios patológicos fueron hemorragias en el rumen, retículo, pulmones, riñones y corazón, congestión pulmonar y un incremento en las concentraciones de amonio, potasio y sodio y decremento en la proteína total y calcio fueron detectados en el suero. Los cambios hematológicos fueron hemocentración y leucocitosis (34)

Otro trabajo similar, fue realizado empleando pollos, como conclusión se menciona que el consumo de *Jatropha curcas* en estos animales causa diversas lesiones, tales como hemorragias, depresión en el crecimiento, cambios histopatológicos, y daños a órganos vitales. Las principales lesiones fueron necrosis de hepatocitos, erosión de la membrana de la mucosa intestinal y congestión de los vasos sanguíneos del corazón. (35-37)

En Nigeria se desarrolló un estudio de toxicidad aguda con las semillas de *Jatropha curcas* Linn, debido a la ingestión accidental de éstas por dos menores, los cuales presentaron vómito severo y deshidratación. Los estudios de toxicidad aguda se efectuaron con ratones, resultando tóxicas estas semillas y ocasionando infartación de varias partes del tracto gastrointestinal, congestión de vasos sanguíneos, hemorragias extensas y daños a los pulmones y al hígado. (38)

Sin embargo, otros investigadores efectuaron un estudio de toxicidad de las semillas de *Jatropha curcas* provenientes de México, en específico, de Papantla,

Veracruz, y se estudió la toxicidad con ratas y ratones. No se produjo toxicidad severa, como en los casos anteriores, sin embargo hay evidencia de algún factor que ocasiona que el alimento sea ingustable o de mal sabor, lo cual se ve reflejado en la ingesta restringida del alimento. También se encontró que el aceite de esta semilla es comestible y no tóxico y el valor nutritivo es comparable al del aceite de maíz. Es posible que esté presente un factor tóxico en estas semillas, el cual sea soluble en agua, ya que se administró un extracto metanólico-acuoso de las semillas crudas por vía intraperitoneal, ocasionando la muerte de algunos ratones. (39)

Ha sido reportado que la presencia de una toxoalbúmina de acción fuertemente purgante es la causa de la toxicidad de *Jatropha curcas*. Esta proteína se denomina "curcina" y es muy similar a la "ricina", proteína presente en las semillas de Ricino (*Ricinus communis*). El efecto de éstas es inhibir la síntesis de proteínas (40)

Se menciona que las semillas de *Jatropha curcas*, (que es donde se concentra la proteína tóxica), pierden su toxicidad cuando se les tuesta, y de esta forma pueden llegar a ser comestibles.

También se reporta que las semillas de achiote (*Bixa orellana L.*) se usan popularmente como antidoto contra el envenenamiento por ingestión de *Jatropha curcas*. (27,39)

3.3.5 *Phaseolus sp.*

Esta especie vegetal pertenece a las familia de las leguminosas y se distingue fácilmente por sus semillas en forma de media luna. Es una especie pluriannual con germinación epigea y raíz fibrosa. Este género comprende al ampliamente conocido "frijol", el cual es una de las leguminosas de mayor consumo en nuestro país. (1)

3.4 ASPECTOS GENERALES SOBRE FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES DE ORIGEN VEGETAL MÁS FRECUENTE.

3.4.1 Inhibidores enzimáticos.

Un inhibidor puede ser definido ampliamente como cualquier sustancia que disminuye la actividad enzimática. El tipo de inhibidor que ha sido con mayor frecuencia reportado en alimentos, es aquel que afecta las uniones y transformación de el sustrato a productos, encontrándose en este grupo las siguientes sustancias:

(a) sustratos análogos, tales como inhibidores de colinesterasa; (b) cofactores análogos de riboflavina, piridoxina, niacina, y vitamina K; (c) factores alostéricos; (d) compuestos como cianuro y tiocianatos, los cuales forman uniones covalentes o de coordinación con grupos esenciales de la enzima, (e) proteínas específicas, las cuales forman complejos fuertemente inactivos con enzimas, tales como inhibidores de enzimas proteolíticas, inhibidores de amilasas, y anticuerpos; y (f) macro iones no específicos como ácidos nucleicos, y taninos (41)

Los inhibidores enzimáticos son muy frecuentes dentro de la alimentación humana; se trata de sustancias que interfieren con la actividad de las proteasas o de las carbohidratasas de los vegetales, con una función protectora, inhibiendo los sistemas enzimáticos de sus depredadores (microorganismos o insectos), o con una función reguladora, interviniendo en procesos de almacenamiento del organismo.

La primera sustancia de este tipo que fue identificada era un polipéptido, aislado del páncreas de ternero, que inhibe la tripsina y protege el órgano contra la acción proteolítica de sus propias enzimas. Posteriormente se descubrieron otras antiproteasas en alimentos de origen animal, pero el aporte principal de éstas en la alimentación humana proviene de los granos de leguminosas y cereales.

Los inhibidores enzimáticos, por su naturaleza química, pertenecen a los taninos, sustancias de naturaleza polifenólica muy termoestables, o a sustancias de naturaleza proteica. (21)

3.4.1.1 Inhibidores de proteasas

Gran parte de los alimentos de origen vegetal, presentan inhibidores de proteasas, siendo la más frecuente fuente de éstos la semilla de la planta, aunque su localización no necesariamente se restringe a esta parte de la planta, por ejemplo en algunas legumbres la mayor concentración de inhibidores de proteasas, fué encontrada en las hojas; en algunos tubérculos como la papa, se reporta la presencia de estos compuestos en las hojas y en el tubérculo mismo y en el caso de los cereales, tales como maíz, cebada, trigo, los inhibidores de proteasas son localizados principalmente en el endospermo y en menor grado en el germen.

3.4.1.2 Inhibidores de tripsina.

Los inhibidores de proteasas más estudiados son los que actúan sobre la tripsina, la cual es una enzima digestiva de gran relevancia en la digestión de los monogástricos como el hombre. (6)

Los inhibidores de tripsina son probablemente los más ampliamente distribuidos entre los inhibidores de enzimas proteolíticas (42)

Los inhibidores de tripsina han sido encontrados en diversos cereales como avena, cebada y maíz; en algunas *Brassicas* como la col de Bruselas, el brócoli, la colza; en la cebolla, ajo y en la remolacha, así como en cacahuates y en la soya, entre muchos otros alimentos.

Los inhibidores más ampliamente estudiados son los que se encuentran en la soya (*Glycine max*). Estos inhibidores se pueden agrupar en dos clases: aquellos que tienen un peso molecular de 20,000-25,000 con relativamente pocas uniones disulfuro y una especificidad dirigida principalmente hacia la tripsina, los cuales se denominan inhibidores de Kunitz, y aquellos que tienen un peso molecular de 6000-10,000 con una alta proporción de uniones disulfuro y son capaces de inhibir tanto a la tripsina, como a la quimotripsina, denominados inhibidores de Bowman-Birk.

La secuencia completa de aminoácidos de los inhibidores de Kunitz consta de 181 residuos de aminoácidos y dos uniones disulfuro, con el sitio reactivo localizado en los residuos Arg 63 e Ile 64. El inhibidor tipo Kunitz es capaz de inhibir tripsinas derivadas de una amplia variedad de fuentes, incluyendo la tripsina de vaca, la de cerdo, de salmón, de barracuda, de pavo y la de pastinaca (especie marina). Entre las enzimas no inhibidas están la pepsina, trombina, colagenasa y las carboxipeptidasas. En el caso de la tripsina humana, tenemos que ésta existe en dos formas: una especie catiónica, la cual constituye el principal componente, y la especie aniónica, la cual comprende sólo del 10-20% de la tripsina total. Esta última es completamente inactivada por el inhibidor de Kunitz, mientras que la forma catiónica es débilmente inhibida.

El inhibidor Bowman-Birk difiere del inhibidor tipo Kunitz en los siguientes aspectos:

1. Es relativamente una molécula pequeña, con un peso molecular de 8000
2. Es especialmente rico en residuos de cistina, en los cuales tiene siete uniones disulfuro, pero es carente de glicina y triptofano
3. Es un inhibidor de "doble-cabeza", ya que posee sitios independientes de unión para la quimotripsina y para la tripsina
4. Presenta marcada estabilidad hacia diversos factores como el calor, ácidos y bases, esta propiedad es probablemente atribuible al efecto estabilizante de las uniones disulfuro en la estructura de la proteína.

Es un polipéptido simple, con 71 aminoácidos incluyendo siete enlaces disulfuro

En lo referente a la función fisiológica que desempeñan los inhibidores de proteasas en la planta, parece ser que básicamente desempeñan dos funciones:

(a) Como inhibidores de proteasas endógenas.- En el caso de algunas plantas, tales como la cebada, lechuga y algunas especies de garbanzos, se mostró que los inhibidores que son activos contra las proteasas endógenas desaparecen durante la germinación. De este modo el papel de estos inhibidores de proteasas es posiblemente

el favorecer el catabolismo de proteínas durante la germinación o prevenir la degradación de las proteínas almacenadas en la semilla durante la maduración de ésta.

La hipótesis anterior puede parecer atractiva, sin embargo hay numerosas observaciones que no sostienen la generalidad de este concepto.

1) En algunos casos, los inhibidores de proteasas aislados de plantas, de hecho son incapaces de inhibir proteasas endógenas de la misma planta

2) En algunas semillas, muchos de los inhibidores de proteasas están localizados fuera de los cuerpos proteicos, esto parece imposibilitar que dichos inhibidores jueguen un papel en la regulación de la proteólisis de la proteína almacenada en estos organelos durante la germinación.

3) Un estudio cinético de el incremento en la actividad endopeptidasa y la disminución en la actividad inhibitoria, reveló que no existe una relación causal entre estos dos fenómenos.

(b) Como un mecanismo de defensa. Los inhibidores de proteasas pueden desarrollarse como parte de un mecanismo de defensa de las plantas hacia microbios invasores o insectos. En las hojas de muchas plantas, después de un daño mecánico o desprendimiento, seguido por un ataque por insectos, se pasa por una acumulación de inhibidores de proteasas no sólo en el sitio dañado, también en los tejidos adyacentes. (6.42)

Ahora bien, en lo referente a la importancia nutricional de los inhibidores de proteasas, se conoce que se presentan diversos efectos al alimentar a animales con leguminosas, en particular la soya, algunos de estos efectos son:

La inhibición de la tripsina estimula al páncreas a una excesiva secreción, la cual resulta en el agrandamiento de éste y en un incremento en la demanda de aminoácidos por este órgano. Al mismo tiempo el inhibidor es relativamente rico en aminoácidos azufrados los cuales no son biológicamente disponibles (hasta que el inhibidor ha sido inactivado por calor), entonces la calidad de la proteína es inferior a la esperada en su composición de aminoácidos. Después de la inactivación por el

tratamiento térmico, los aminoácidos azufrados son liberados, es entonces cuando hay un incremento en la calidad de la proteína y a la vez la disponibilidad es mayor y el páncreas retorna a su funcionamiento normal. El mecanismo de agrandamiento pancreático no está claro. Las posibilidades incluyen: (1) Estimulación por agentes humorales liberados por la acción de los inhibidores en el tracto gastrointestinal, (2) un mecanismo de regeneración negativo por medio del cual la presencia de tripsina y quimotripsina suprimida, promueve la secreción de enzimas pancreáticas y (3) el incremento en la conversión de metionina a cistina en el páncreas.

Existen evidencias de que los inhibidores de tripsina retardan el crecimiento en roedores cuando la proteína de la dieta ha sido predigerida o suministrada como libre de aminoácidos. Ha sido demostrado que estas preparaciones no inhiben la actividad proteolítica en el tracto intestinal de roedores, aunque si sucede con las gallinas.

Al alimentar a gallinas con frijol de soya crudo, éstas desarrollaron hipertrofia del páncreas. Esta observación ha sido confirmada también para ratas, sin embargo no se ha presentado en otras especies de animales, tales como becerros, cerdos y perros. No hay una relación directa entre la actividad de los inhibidores de tripsina y su capacidad para producir hipertrofia pancreática. Existen discrepancias uniformes entre los reportes de hipertrofia; algunos autores reportan incremento en el número de células, otros sólo incremento en el tamaño de las células y otros ambos. La explicación más factible de el retardo en el crecimiento es la pérdida endógena de aminoácidos esenciales de el páncreas hiperactivo, debido a los inhibidores. Para contrarrestar esta deficiencia en el crecimiento se ha recurrido a la suplementación de aminoácidos.

El tratamiento del frijol de soya (temperatura, tiempo, tamaño de partícula y humedad) ha sido examinado en detalle, ya que un sobrecalentamiento daña la proteína y reduce su calidad. (6.42)

3.4.2 Lectinas o Hemaglutininas.

Las lectinas han sido definidas como proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen e interactúan con carbohidratos en solución o en la superficie celular; estas sustancias a diferencia de las enzimas glicosídicas, no ejercen ninguna actividad catalítica sobre las estructuras reconocidas. Estas proteínas fueron identificadas por H. Stillmark en 1888; cuando estudiaba la toxicidad de la semilla de la higuera (*Ricinus communis*) observó que sus extractos aglutinaban eritrocitos; posteriormente, H. Hellin y H. Kobert identifican una actividad semejante en los extractos de otras semillas igualmente tóxicas de *Abrus precatorius*

Los resultados obtenidos por Stillmark indicaban alguna selectividad en la aglutinación con eritrocitos de diversas especies animales; sin embargo, esta observación fue reforzada y analizada en 1908 por Karl Landstainer y H. Raubischek en el Instituto Rockefeller de Nueva York, quienes identificaron que el extracto de chícharo (*Pisum sativum*) es más efectivo para la aglutinación de los eritrocitos de conejo que para los de carnero o paloma, también demostraron que las células humanas eran mejor aglutinadas por el extracto de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que por el de chícharo o lenteja (*Lens culinaris*). La especificidad de las lectinas por carbohidratos fue sugerida por James Sumner y Stacey F. Howell, de la Universidad Cornell en Nueva York, quienes en 1936 identifican que la capacidad aglutinante de la lectina Con A (*Canavalia ensiformis*) era inhibida por la presencia de almidón o glucógeno; entonces propusieron que el efecto aglutinante podía ser la consecuencia de la relación entre la proteína de la planta y los carbohidratos de la superficie de los eritrocitos. En 1954 William C. Boyd y Shalpeigh en la Universidad de Boston, e independientemente K. O. Renkonen en la Universidad de Helsinki, descubrieron la presencia de aglutininas en algunos extractos vegetales que reconocían específicamente eritrocitos de diversos grupos sanguíneos; de este modo se identificó que el extracto del frijol lima (*Phaseolus limensis*) o de haba (*Vicia faba*) aglutinaban eritrocitos humanos del grupo A, mientras que extractos de otras

semillas como *Lotus tetragonolobus* aglutinan solamente eritrocitos del grupo O. Por esta razón, en 1954 Boyd propuso que estas sustancias fueran llamadas lectinas [del latín *legere*, que significa escoger o elegir (Gold y Balding 1975)]:

En la década de los sesentas se descubrió en el campo de la inmunología que las lectinas aglutinan preferentemente células cancerosas y se concluyó de todas las investigaciones realizadas que la alta susceptibilidad para la aglutinación por las lectinas es una propiedad compartida por todas las células cancerosas.

Se han logrado identificar lectinas no sólo en vegetales, sino también en animales y bacterias, a pesar de que se desconoce la función de las lectinas en los organismos de origen, se han identificado diversos efectos biológicos inducidos por ellos y en todos los casos se ha demostrado que dicho efecto se debe a la interacción con estructuras sacarídicas.

Algunas de las actividades biológicas inducidas con lectinas son:

1. Actividad aglutinante de eritrocitos y células tumorales
2. Estimulación mitogénica en linfocitos
3. Actividad inmunosupresora
4. Inhibición del crecimiento de células tumorales
5. Induce la liberación de histamina por los basófilos
6. Citotoxicidad
7. Inhibición del crecimiento de hongos
8. Participa en la simbiosis bacteria-nódulo de raíces
9. Induce la liberación de insulina por los islotes pancreáticos
10. Inhibe la fertilización del óvulo por los espermatozoides

Las lectinas o hemaglutininas son proteínas que poseen una afinidad específica por ciertos carbohidratos. Puesto que aproximadamente la mitad de los carbohidratos existen en muchas membranas de células animales, ellas pueden adherirse a estos llamados grupos receptores. La reacción de hemaglutinación es el efecto más

fácilmente observable de esta adherencia y puede ocurrir sólo si la lectina tiene al menos dos grupos activos (43)

El sitio receptor de las superficie celular puede ser expuesto, a fin de reaccionar con la lectina específica. Además el grado de movilidad del sitio en la membrana celular determina la aglutinabilidad. La activación o sensibilización de los eritrocitos por digestión con papaina, tripsina o pronasa se debe probablemente a la exposición de los sitios receptores, así estos se tornan accesibles o disponibles a las lectinas

En lo referente a la estructura de las lectinas, todas tienen como característica común que son proteínas. La mayoría contienen azúcares unidos covalentemente y pueden entonces ser clasificadas como glucoproteínas. Una gran cantidad de lectinas son relativamente ricas en ácido aspártico, serina y treonina.

La estructura de algunas lectinas ha sido elucidada detalladamente, la Concanavalina A a pH neutro consiste en un tetrámero el cual está formado por cuatro subunidades idénticas de peso molecular 26,000, formado por una sola cadena polipeptídica de 237 aminoácidos. Cada subunidad contiene dos sitios de enlace de metales, uno con Mn^{2+} y otro con Ca^{2+} y otro sitio para un residuo de azúcar, también existen evidencias de la existencia de sitios hidrofóbicos.

Analogías estructurales se presentan en muchas lectinas de leguminosas, por ejemplo, constan de dos a cuatro subunidades y contienen iones metálicos bivalentes. Las subunidades pueden ser idénticas y su disociación puede ser reversible o irreversible, dependiendo de las condiciones a las que se someta.

Algunas lectinas de plantas superiores se encuentran en las semillas, tubérculos y en la savia de la planta, también se ha demostrado su presencia en las hojas, tallo y corteza. Se ha encontrado que en semillas inmaduras o verdes las lectinas contenidas pueden estar parcial o completamente unidas a inhibidores, éstos son termoestables y no precipitan con acetona. Durante la maduración el título de

aglutinación puede aumentar muy rápidamente, y esto puede ser causado por la liberación de las lectinas de los inhibidores. (6)

Mediante el uso de métodos inmunológicos se localizó la lectina de frijol en el citoplasma del cotiledón y del embrión, sin embargo, ésta apareció durante la maduración y desapareció durante la germinación. En base a lo anterior, algunos autores atribuyen a las lectinas cierto papel en la germinación de la semilla.

En lo referente a la actividad de las lectinas, existen diferencias importantes en la actividad de aglutinación entre semillas maduras de diferentes variedades; entre las explicaciones para este hecho se presume la posible presencia de inhibidores;asimismo, la aplicación de fertilizantes puede aumentar el contenido de lectinas en frijoles, de igual manera la formación de lectinas en plantas puede ser controlada por factores genéticos.

Se ha especulado mucho sobre la función de las lectinas en las plantas, entre las posibles funciones están: 1) actuar como "anticuerpos" contra bacterias, 2) protección contra hongos fitopatógenos, 3) protección contra insectos depredadores, 4) jugar un papel en el desarrollo y diferenciación de células embrionarias, 5) transporte de azúcares de almacenamiento, 6) control de la germinación y desarrollo de la semilla, 7) regulación de la extensión celular de la planta, 8) unión de microorganismos simbióticos nitrificantes a leguminosas, 9) enzimas.

Respecto a la toxicidad de las lectinas, no todas producen efectos tóxicos en animales de experimentación. Algunas semillas de leguminosas crudas causan retardo en el crecimiento y algunas veces los animales mueren cuando éstas se incorporan a la dieta. Es necesario mencionar que la toxicidad también depende de la especie y raza del animal empleado. Por ejemplo, la soya cruda puede causar la muerte de cuyas, más no la de ratas. Asimismo, diferentes razas de ratones presentan diferentes velocidades de mortalidad cuando se les inyecta un extracto de frijoles crudos. También se observó que la lectina de frijoles inhibe el crecimiento y causa la muerte de ratas cuando se administra al 0.5% en la dieta. En un experimento similar con

pollos, se observó que la disminución en el crecimiento fue mucho menor que en las ratas y no se presentó acción letal.

La lectina purificada de frijol causa la muerte de ratas jóvenes cuando es administrada intraperitonealmente: la lectina de soya no tiene acción letal cuando es administrada por el tubo estomacal a un nivel de 500 mg/kg. La pepsina puede ejercer cierta inactivación de algunas lectinas, siendo más susceptibles unas que otras.

Entre otros efectos tóxicos reportados se reporta que al administrar a ratas preparaciones crudas de lectinas obtenidas de ciertas leguminosas, se produjo daño al hígado y la muerte.

Se ha observado que la lectina de frijol administrada oralmente a ratas, reduce la absorción de todos los nutrientes. Esto se debe a que las lectinas se combinan con el revestimiento celular de la pared intestinal, causando interferencia no específica con la absorción de nutrientes. La administración intradérmica de lectinas puede producir hemorragia, y lesiones con edema y necrosis. (6)

Existen diversos reportes en la literatura, de casos de intoxicación humana, en los cuales las lectinas parecen haber sido los agentes causantes. En 1929 se descubrieron dos casos de envenenamiento en niños que consumieron frijoles crudos (*P. coccineus*), de igual manera, en 1964 fueron descritos casos de infantes que habían enfermado de una manera extrema después de la ingestión de bayas (*Phytolacca americana*) o exposiciones sistemáticas de su jugo en la mano. En 1948 se presentó una epidemia de gastroenteritis entre la población de Berlín Oriental debido al consumo de frijoles parcialmente cocidos. Asimismo, en Tanzania se determinó que una mezcla de maíz y frijoles cocidos insuficientemente era potencialmente nociva para los niños a los cuales se había destinado. Este problema surgió del hecho de que se realizó un cocimiento inadecuado, ya que se emplea loza de barro sobre fuego de leña, y debido a que se forma una masa viscosa y gruesa, la distribución del calor no es homogénea y por tanto ineficiente y en ausencia de un constante y vigoroso movimiento, grandes cantidades de lectinas escapan de ser destruidas. También una

disminución en el punto de ebullición del agua, tal como sucede en ciertas regiones montañosas, puede resultar en la incompleta destrucción de las lectinas.

En 1976 algunos infantes consumieron frijoles que habían sido remojados en agua pero no cocidos. Presentaron agudas náuseas, vómito y diarrea.

Todas las lectinas tóxicas producen trastornos parecidos, de mayor o menor gravedad, entre los que resalta la intensa inflamación de la mucosa intestinal, la destrucción de los epitelios, edema y hemorragia del tejido linfático. En el hígado se observa degeneración grasa y necrosis. También el miocardio sufre alteraciones degenerativas y en los capilares dilatados de todos los órganos se puede observar la formación de trombos. (6,44)

3.4.3 Saponinas.

El término "saponina" (del latín sapon= jabón) fue empleado por primera vez en 1811, por el químico Bucholtz, para designar sustancias de naturaleza heterocíclica, neutras o ácidas, las cuales tenían en común formar soluciones "falsas", que por agitación producían una espuma persistente.

En el México prehispánico los aztecas designaban a estas sustancias con la palabra "amoli" y las empleaban para lavar, puesto que no alteraban los colores de las telas. Desde entonces se hacía la distinción de "amoles bravos", las cuales provocaban picazón en la piel, y "amoles mansos", éstos no producían ningún efecto cutáneo.

Las saponinas son glucósidos que se encuentran en una amplia variedad de plantas, se caracterizan por su sabor amargo, por formar espuma en soluciones acuosas y por su capacidad para hemolizar glóbulos rojos.

Estructuralmente, las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos sacáricos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado sapogenina, el cual puede ser un esteroide (C_{27}) o un triterpenoide (C_{30}).

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se pueden encontrar en diversas partes de la planta tales como hojas, raíces, tallos y flores. Estas se encuentran y han sido aisladas de diversas muestras vegetales, entre ellas algunas plantas comestibles como son la remolacha plateada (Fig 1) y la soya (Fig.2).

Figura 1. Saponina de remolacha.

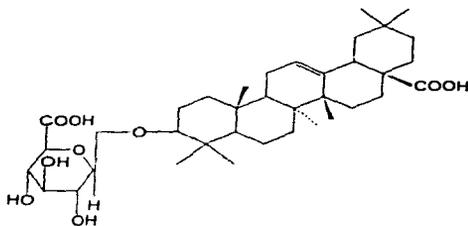
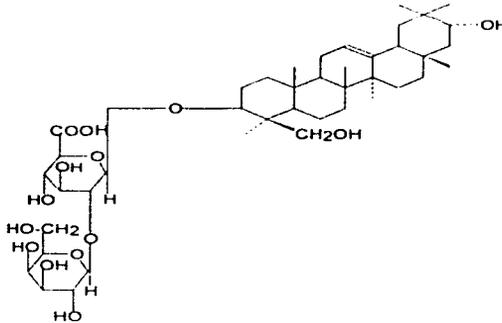


Figura 2. Soyasaponina III



Entre algunas de las propiedades de las saponinas se encuentran las siguientes:

Poseen un sabor amargo, son inodoras generalmente y difíciles de cristalizar, las soluciones coloidales de las saponinas producen espuma, por lo cual reducen de manera notable la tensión superficial y se pueden utilizar como estabilizantes de emulsiones de aceites y grasas; asimismo ocasionan irritación en los ojos y en la piel cuando se frota y estornudos frecuentes; son termorresistentes y pueden formar complejos con el colesterol.

En lo referente a solubilidad, son solubles en agua, y en etanol se disuelven casi completamente, aumentando la solubilidad con la temperatura y el grado de hidratación. Son insolubles en disolventes orgánicos.

Entre las actividades biológicas de las saponinas tenemos las siguientes:

A) Hemólisis - Numerosos ensayos y determinaciones cuantitativas de saponinas han sido basadas en sus propiedades hemolíticas. La hemólisis de eritrocitos ha sido ampliamente utilizada para demostrar la presencia de saponinas. La hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, liberándose hemoglobina. Se han reportado diferencias en el grado de hemólisis entre las hojas de alfalfa y extractos de saponinas del tallo. Se relaciona la actividad hemolítica con la estructura y composición de la molécula de saponina. Se demostró que la actividad hemolítica del extracto de la raíz de la alfalfa era superior al del ápice. Esto se atribuye al contenido superior en la raíz de ácido medicagénico. Se conoce que las saponinas contienen ácido medicagénico y hederagenina como sus aglucones y precipitan con el colesterol y poseen una fuerte actividad hemolítica.

La actividad hemolítica de las saponinas es generalmente atribuida a su interacción con el colesterol en la membrana del eritrocito. La saponina interacciona con el colesterol de la membrana, con proteínas y fosfolípidos, no interacciona con ácidos grasos de la membrana. Los cambios estructurales, resultado de la interacción de los componentes membranales con la saponina, afectan la actividad de las enzimas membranales sólo escasamente. Se ha sugerido que el trastorno de la estructura de la membrana, proviene de la combinación de las interacciones no específicas de las saponinas con las proteínas de la membrana, fosfolípidos, y colesterol, y esto conduce consecuentemente a la hemólisis (6).

B) Efecto en hongos y otros microorganismos - La toxicidad selectiva de las saponinas sobre hongos, ha sido reportada por diversos autores. Se realizó un estudio en donde se prueba la influencia de una fracción de saponinas de alfalfa y otra fracción carente de éstas, sobre dos variedades, DuPuits y Lahontan, en 15 patógenos. Algunos de los microorganismos de prueba fueron inhibidos por la fracción que contenía saponinas, algunos fueron estimulados y otros no fueron afectados. Asimismo, se ha reportado que en algunas variedades de alfalfa con bajo contenido de saponinas, se incrementa la susceptibilidad de la planta a los patógenos. También se ha

estudiado el efecto de las saponinas sobre *Trichoderma viride*, y se encontró que la presencia o ausencia de ácido medicagénico explicaba la actividad o inactividad hacia el microorganismo.

Algunos investigadores han sugerido que las saponinas ejercen cierto efecto fungicida porque precipitan esteroides en la membrana celular. Gestetner y colaboradores demostraron que por la interacción entre las saponinas y los esteroides de la membrana, se presenta un cambio drástico en la permeabilidad de la membrana lo cual conduce a la inmediata y total pérdida del contenido celular.

C) Efecto en insectos.- Existen hipótesis acerca de que las saponinas constituyen un metabolito específico, el cual está involucrado en el mecanismo de defensa de la planta contra insectos. Kain y Atkinson demostraron la resistencia de la alfalfa (*Medicago sativa L.*) al ataque de larvas de un escarabajo europeo *Melolontha vulgaris F.* Se sugiere una posible relación entre el contenido de saponinas y la resistencia al ataque de insectos fitófagos.

D) Efecto en pollos y otros animales.- Estudios realizados de los efectos que las saponinas de alfalfa tienen sobre algunos animales de granja, mostraron diferentes respuestas en animales monogástricos con dietas en las cuales el contenido de saponinas era variable. Con un 20% de alfalfa en la dieta de pollos (equivalente a un 0,3% de saponina), se presentó un decremento en el peso. El efecto anterior se atribuyó al contenido de saponinas. No obstante, la misma proporción se incorporó a la alimentación de cerdos, y en este caso, no se presentó efecto alguno en el crecimiento.

Cheeké observó que el ratón es mucho menos tolerante a las saponinas de alfalfa, que la rata. Con un 2% de saponinas en la dieta se presentó un decremento en el peso en los ratones, sin embargo las ratas no fueron afectadas.

Reshef y colaboradores plantean que la inhibición del crecimiento está relacionado con el contenido de ácido medicagénico en las dietas preparadas.

E) Efecto en la germinación de la semilla.- Se ha reportado el efecto de inhibición de las saponinas de alfalfa sobre la germinación de semillas de algodón. El mecanismo por el cual las saponinas de alfalfa inhiben la germinación de las semillas fue estudiado por Marchaim y cols.

Debido a que las saponinas son potentes surfactantes interaccionan con la capa de la semilla y/o las membranas de la misma, sin penetrar al embrión. Esta interacción resulta en una reducción en el consumo de oxígeno por el embrión y se expresa en la inhibición de la germinación.

Otros investigadores indican que debido a que las saponinas poseen propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, ocasionan cambios en la microestructura natural de las membranas celulares. Esta hipótesis está basada en experimentos realizados con surfactantes sintéticos de diferente composición química y/o carga y observaciones realizadas en el microscopio electrónico muestran que la preinmersión de semillas de algodón en saponinas de alfalfa y otras soluciones surfactantes causan cambios estructurales en las membranas, afectando la permeabilidad hacia el oxígeno.

F) Efecto en los niveles de colesterol en sangre.- Existen estudios que mencionan que algunas saponinas forman un complejo insoluble con el colesterol. Una dieta con saponinas induce la adsorción de los ácidos biliares sobre la fibra de la dieta. La adsorción de ácidos biliares sobre la fibra dietética se ha propuesto como un mecanismo general para explicar la disminución de colesterol. En un experimento "in vivo" en el cual se incluía saponina purificada en una dieta, se incrementó la excreción de ácidos biliares en las heces de ratas y cerdos, disminuyendo los niveles de colesterol.

G) Efecto en enzimas.- Se ha observado que las saponinas de alfalfa y de soya inhiben a ciertas enzimas, tales como: la alfa-quimotripsina, la colinesterasa, y las enzimas involucradas en el ciclo del ácido cítrico. La inhibición es no específica y se ve suprimida por la presencia de cualquier otra sustancia proteínica.

La toxicidad de las saponinas se encuentra a discusión. En lo que respecta al contenido de saponinas para el hombre en ciertos productos alimenticios, el estatus del Merck Index indica que prácticamente las saponinas no son tóxicas por ingestión oral. Los extractos de plantas como el de sarsaparilla o de *Quillaja saponaria*, son permitidos como aditivos para alimentos en: Australia, Gran Bretaña y E.U.A.. Sin embargo en lugares como el oeste de Alemania, España y Marruecos, por ejemplo, es prohibido su uso en alimentos, por la considerable variación de toxicidad de diferentes saponinas.

Se han reportado dosis letales de saponinas que varían de 25 a 3000 mg/kg de peso corporal. Las saponinas normalmente crean lesiones gastrointestinales, y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar los eritrocitos, producir fallas en la respiración, convulsiones y coma.

Entre los usos de las saponinas, pueden emplearse como sustancias que disminuyen la tensión superficial, ya que son generadores de espuma y emulsificantes en productos como: detergentes, helados, bebidas carbonatadas, shampoos, jabones y extinguidores de fuego; también para disminuir la tensión superficial de emulsiones fotográficas.

Las saponinas esteroideas son fuentes importantes de materia prima para la síntesis de hormonas (progesterona y cortisona) y otros productos esteroideos. Actúan también como estabilizadores de emulsiones. Se emplean como protectores coloidales en rociadores de polvos saborizantes; varias patentes utilizan la glicirhizina en forma de sales de amonio, sodio y potasio. (6,45)

3.4.4 GLUCOSINOLATOS.

Los glucosinolatos fueron también llamados tioglucósidos. Muchas de las sustancias individuales de esta clase son todavía conocidas por nombres triviales tales como sinigrina, sinalbina y progoitrina. Este tipo de compuestos están presentes en plantas cultivadas y son responsables de los sabores picantes o pungentes de

condimentos como la mostaza y el rábano, y contribuyen a los sabores característicos del nabo, lo amargo de la col y otros vegetales relacionados.

Los glucosinolatos han sido encontrados sólo en plantas dicotiledóneas. Están presentes en las siguientes familias: Capparidáceas, Crucíferas, Resedáceas, Tovariaceas, Moringáceas, Salvadoráceas, Gyrostemonáceas, Limnantháceas y Tropaeoláceas. En al menos las primeras tres de estas familias los glucosinolatos parecen estar presentes en todas las especies. En las familias Caricáceas y Euforbiáceas sólo están presentes en pocas especies. Los glucosinolatos en las Crucíferas tienen un especial interés, ya que muchas de éstas que sirven como fuentes de alimento y condimento, pertenecen al género *Brassica*. Ejemplos de estos alimentos son la col y vegetales relacionados, el nabo, y la mostaza. El género *Brassica* incluye plantas que son utilizadas en muchas partes del mundo como pastura, forraje o ensilaje para ganado. (6)

Los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos nunca han sido encontrados en las mismas especies, por otro lado, en contraste con los glucosinolatos, los glucósidos cianogénicos han sido encontrados en muchas especies de la familia de las Euforbiáceas.

Muchos glucosinolatos contenidos en plantas, especialmente entre las Crucíferas, contienen varios glucosinolatos juntos, a menudo con amplias diferencias en concentración entre los componentes mayoritario y minoritario, de esta manera, han sido identificados en una sola especie 15 glucosinolatos. (46) La cantidad de los glucosinolatos varía de acuerdo a la parte de la planta examinada y a la edad fisiológica de la misma. (42)

Los glucosinolatos pueden estar presentes en diversas partes de la planta, tales como raíz, tallo, hojas y semilla. (6) En esta última, el endospermo es el sitio de acumulación. En el caso del rábano, se han localizado glucosinolatos en las vacuolas celulares de la raíz. (46)

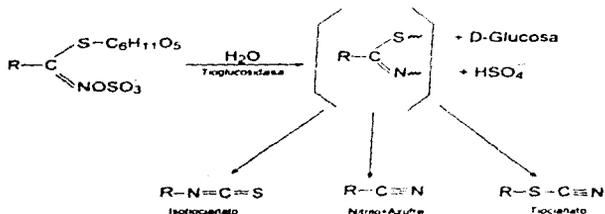
GENERALIDADES

Debido a su estructura, los glucosinolatos son compuestos hidrofílicos y no volátiles. Las sales son fácilmente solubles en agua e insolubles en solventes no polares. Algunos glucosinolatos han sido obtenidos como sales cristalinas con potasio, sodio o tetrametilamonio. Son bastante estables a valores de pH neutro, pueden ser descompuestos por la acción de ácidos y bases fuertes (46)

La estructura básica para un glucosinolato fue revisada por Ettlinger y Lundeen y confirmada por la síntesis de benzil-glucosinolato. Desde el punto de vista químico, estos compuestos son glucósidos, pero tienen la particularidad de que la unión a la parte aglucón es a través de un átomo de azufre, generalmente el azúcar es la β -D- tioglucosa, la cual se une al radical tiohidroxamato-O-sulfonato. (42) Los glucosinolatos son aniones y están presentes en las plantas en forma de sales.

Los glucosinolatos son hidrolizados por una enzima asociada, una tioglucosidasa, la cual se encuentra en diferente compartimento celular en el tejido intacto de la planta. En el momento en el cual se rompe la integridad celular, enzima y sustrato se ponen en contacto y se libera glucosa y el ion sulfato ácido. La porción orgánica del aglucón puede pasar por un rearrreglo intramolecular, seguido por una hidrólisis para dar isotiocianato, sin dicho rearrreglo, el aglucón forma un nitrilo, con la pérdida de azufre. Alternativamente, un rearrreglo para formar un tiocianato orgánico puede ocurrir. (6)

Los glucosinolatos tienen la siguiente fórmula general:



En 1961, Ettlinger y Dateo propusieron la nomenclatura sistemática, la estructura química de la cadena (R) es usada como prefijo al término glucosinato, donde el sufijo "ato" es indicativo del carácter aniónico del compuesto (6)

En la tabla siguiente se presentan los nombres triviales y sistemáticos de glucosinolatos comunes en plantas comestibles

ESTRUCTURA DEL GRUPO R	NOMBRE TRIVIAL
2-Propenil	Sinigrina
3-Butenil	Gluconapina
4-Pentenil	Glucobrassicapina
2(R)-Hidroxi-3-butenil	Progoitrina
p-Hidroxibencil	Sinalbina
3-Indolilmetil	Glucobrassicina

Los glucosinolatos son precursores de compuestos con acción goitrógena en mamíferos, incluyendo al humano. Los compuestos antitiroideos activos son: los isotiocianatos, oxazolidin-2-tionas y el ion tiocianato (46)

La presencia de glucosinolatos en las dietas de no rumiantes, ha sido ligada a un crecimiento y desarrollo pobre en cerdos y una variedad de desordenes en aves de corral, incluyendo pérdida de peso, reducción y manchas en el tamaño del huevo, pérdida de eficiencia en las aves ponedoras y hemorragia en el hígado

Evidencias de hipotiroidismo en terneros, ha sido atribuido a la presencia de goitrógenos en la leche. Al incluir en la dieta de ratas (de manera individual), algunos glucosinolatos, se observó disminución en el crecimiento, agrandamiento en pulmones, hígado y la tiroides y lesiones patológicas. En otro estudio similar, se observó que una alta concentración de glucosinolatos en la dieta ocasiona problemas de palatabilidad, reduce la utilización de proteína y afecta el tamaño de órganos internos (42)

Entre los productos de hidrólisis de los glucosinolatos están los isotiocianatos, éstos poseen cierto rango de actividad antibacterial y antifúngica debido a su facilidad para reaccionar con proteínas y en particular, con los grupos sulfhidrilo. Asimismo estos compuestos son responsables de ocasionar dermatitis irritante y de producir alergias en la piel. Algunos isotiocianatos, como el 2-propenil isotiocianato, no es teratogénico pero se ha encontrado que causa la muerte embrional y reduce el peso fetal

Otro producto de la hidrólisis de los glucosinolatos son las oxazolidin-2-tionas, éstas se han asociado con el incremento en el número de hepatocitos, incremento en el peso del hígado, interferencia con la síntesis de la hormona tiroidea, alargamiento de la glándula tiroidea y además pueden atravesar la placenta y son fuertes goitrógenos fetales y pueden acumularse en la leche por procesos de difusión

Entre los compuestos de hidrólisis más tóxicos están los nitrilos, al alimentar a ratas a niveles inferiores a 300 mg/kg de dieta, por 90 días, se presentó un

decremento en el peso de varios órganos; dependiendo de la dosis, hubo lesiones en el hígado, páncreas y especialmente lesiones renales (necrosis renal) (42)

El ion tiocianato aparece en alimentos como resultado de la descomposición de los isotiocianatos. Este ion causa agrandamiento de la tiroides (6)

Finalmente, los indoles son otros compuestos, productos de la hidrólisis de los glucosinolatos. Algunos derivados de estos compuestos se ha mostrado que inhiben la germinación, y tienen actividad antifúngica contra *Leptosphaeria maculans*.

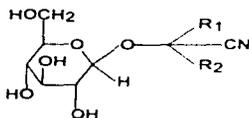
En particular, el indol-3-carbinol, indol-3-acetonitrilo y el diindolimetano, poseen la actividad de proteger contra agentes carcinogénicos (42)

3.4.5 GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS

La capacidad de los organismos vivos para producir cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico (HCN) es conocida como cianogénesis. Algunos de los organismos cianogénicos incluyen bacterias, hongos, milpiés y polillas, helechos y otros insectos.

El HCN no se encuentra libre en plantas superiores pero es liberado de los precursores cianogénicos como resultado de una acción enzimática. Entre los precursores se encuentran usualmente glucosidos de α -hidroxinitrilos (cianohidrinas); cuando la integridad celular del tejido de las plantas cianogénicas sufre una ruptura, los glucosidos cianogénicos se ponen en contacto con enzimas catabólicas las cuales hidrolizan los glucósidos y disocian los α -hidroxinitrilos.

Los glucósidos cianogénicos tienen la estructura general siguiente, y por lo tanto tienen como aglucón α -hidroxinitrilos. En gran parte de los glucósidos cianogénicos el azúcar unido es la D-glucosa, unida mediante un enlace α -1-glicosil. Hay cinco excepciones, que son amigdalina, vicianina, lucumina, linustatina y neolinustatina, las cuales tienen un disacárido unido.



R_1 y R_2 pueden ser sustituyentes alifáticos o aromáticos (o hidrógeno)

Algunos autores clasifican a los glucósidos cianogénicos de acuerdo a la naturaleza química de sus aglucones y otros los clasifican en base a su origen biosintético.

Entre las propiedades químicas de los glucósidos cianogénicos destacan las siguientes: Son degradados en ácido diluido a temperaturas no superiores a 60 °C para producir el azúcar respectivo y el α -hidroxinitrilo. Este último es inestable y puede disociarse a HCN y a un aldehído o cetona en una reacción dependiente del pH. La hidrólisis en ácido concentrado puede producir el α -hidroxiaácido y el NH_3 de el grupo nitrilo en el glucósido es hidrolizado más rápidamente que el enlace (1-glicosídico). El tratamiento con una base suave (por ejemplo $Ba(OH)_2$ saturado) hidroliza el grupo nitrilo de varios glucósidos cianogénicos para formar el correspondiente ácido glucosídico (por ejemplo ácido amigdalínico). Sin embargo la durrina y la taxifilina son lábiles en bases diluidas y se descomponen a HCN, glucosa, y *p*-hidroxibenzaldehído, los productos obtenidos en hidrólisis ácida.

La distribución de los glucósidos cianogénicos es muy amplia, se encuentran en plantas gimnospermas y monocotiledóneas y dicotiledóneas angiospermas. Entre las familias más notables para la cianogénesis están las Aráceas, Compositas, Euforbiáceas, Gramíneas, Leguminosas, Pasifloráceas y Rosáceas. En la siguiente tabla se muestran algunos géneros y familias de plantas en las cuales se han identificado glucósidos cianogénicos.

GENERALIDADES

Glucósido	Familia	Género
Amigdalina	Rosáceas	Prunus spp., Sorbus, Photinia, Cydonia,
		Eriobotrya
Cardiospermina	Sapindáceas	Cardiospermum, Heterodendron
Deidacina	Pasifloráceas	Deidamia
Durrina	Gramíneas	Sorghum spp.
	Proteáceas	Macadamia, Stenocarpus
Ginocardina	Flacourtiáceas	Ginocardia, Pangium
Linamarina	Euforbiáceas	Cnidioscolus, Hevea, Manihot spp.
	Leguminosas	Acacia, Lotus spp., Phaseolus, Trifolium
	Lináceas	Linum spp.
	Papaveráceas	Papaver
Lotaustralina	Euforbiáceas	Manihot
	Leguminosas	Acacia, Lotus spp., Phaseolus, Trifolium
Prunósina	Caprifoliáceas	Sambucus
	Leguminosas	Acacia spp., Holocalyx
	Mirtáceas	Eucalyptus
	Rosáceas	Cotoneaster spp., Cydonia, Prunus spp., Sorbus
Taxifilina	Euforbiáceas	Phyllanthus
	Gramíneas	Bambusa spp., Bouteloua, Chloris, Molinia
Vicianina	Leguminosas	Vicia spp.
Zierina	Caprifoliáceas	Sambucus
	Rutáceas	Zieria

La amigdalina fue identificada primeramente en la almendra amarga y también está presente en la semilla de otras frutas. La durrina está presente en el sorgo. La linamarina o faseolunatina y la metillinamarina o lotaustralina son los glucósidos de

legumbres, linaza, y mandioca o yuca. Entre las fuentes de estos glucósidos están: la papa dulce, el maíz, el mijo, el bambú, la caña de azúcar, chicharos y frijoles, semilla de almendra, limón, lima, manzana, pera, cereza, albaricoque, ciruela y ciruela pasa (6, 46)

En el proceso de catabolismo de los glucósidos cianogénicos, específicamente de la durrina, están involucradas dos enzimas, la primera una β -glucosidasa la cual cataliza la hidrólisis del enlace β -glucosídico de la durrina. La segunda enzima es una hidroxinitrilo liasa, la cual cataliza la disociación estereoespecífica de la (S)-cianohidrina producida cuando la durrina es hidrolizada (41, 46)

Las β -glucosidasas que actúan sobre los glucósidos cianogénicos muestran un alto grado de especificidad del sustrato para los glucósidos cianogénicos involucrados.

El papel fisiológico de los glucósidos cianogénicos en las plantas es indudablemente el relacionado a su capacidad para producir cantidades tóxicas de HCN. Se presume que estos glucósidos, como muchos otros compuestos secundarios han proporcionado el valor de sobrevivencia a la planta que los contiene, actuando como un freno para los herbívoros que amenazan con culminar la existencia de la planta. (46)

Es bien conocido que la toxicidad de los glucósidos cianogénicos se debe a la producción de HCN, el cual es un potente inhibidor respiratorio. El sitio de inhibición es la enzima citocromo oxidasa, el catalizador final respiratorio de los organismos aerobios. El cianuro tiene una fuerte afinidad por la citocromo oxidasa, formando una unión que resulta en la inhibición inmediata de la respiración celular. La muerte sobreviene con anoxia citotóxica y el cerebro probablemente empieza a ser el órgano más susceptible. En la literatura sobre la cianogénesis, ocasionalmente se refiere a "el contenido de HCN" de la planta o del tejido de ésta. Se debe hacer énfasis, sin embargo en que el HCN es producido, sólo después del rompimiento del tejido celular de la planta.

El metabolismo humano del cianuro inorgánico puede efectuarse a través de diversas rutas metabólicas. El cianuro ingerido es rápidamente absorbido desde el tracto intestinal. También pasa fácilmente a través de la piel, y en forma de gas es rápidamente absorbido a los pulmones. La ruta metabólica más estudiada es por la combinación con tiosulfato para formar tiocianato y sulfato; la reacción es inicialmente catalizada por la rodanasa, una enzima que puede ser descrita como una sulfotransferasa y se encuentra ampliamente distribuida en tejidos animales. Esta reacción requiere la presencia de cantidades adecuadas de cistina como donante de azufre. La conversión de cianuro a tiocianato representa una detoxificación de el HCN y el tiocianato producido es eliminado en la orina. La hidroxocobalamina juega un papel activo en la detoxificación de cianuro. La administración de ésta protege a los ratones contra el envenenamiento por cianuro (6,41)



El hombre está continuamente expuesto a pequeñas dosis de cianuro (en su dieta, en la contaminación atmosférica y particularmente en el humo del cigarro y como resultado de una infección urinaria con bacterias cianogénicas tales como *Pseudomonas pyocyanea*)

La hidroxocobalamina juega un papel activo en la detoxificación de cianuro. La administración de ésta protege a los ratones contra el envenenamiento por cianuro

La dosis letal mínima del HCN por vía oral está estimada entre 0.5 y 3.5 mg/kg de peso corporal. La dosis letal de los cianuros alcalinos es aproximadamente dos veces la del HCN. Una dosis relativamente grande de HCN puede causar la muerte en pocos minutos, sin embargo se han reportado casos de sobrevivientes después de 3 horas con pequeñas dosis de HCN. Los sobrevivientes han descrito síntomas iniciales como entumecimiento periférico y mareos. Estos son seguidos por estupor y confusión

mental, cianosis, contracción nerviosa y convulsiones con coma terminal. Dosis no letales pueden producir dolor de cabeza, una sensación de tensión en la garganta y en el pecho, palpitaciones y debilidad muscular. Los mismos síntomas pueden ocurrir al exponerse a bajas concentraciones del HCN en forma de gas. (6)

3.4.6 ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos metabólicamente activos en plantas y microorganismos; su biosíntesis y catabolismo juegan un papel importante en la ecología y fisiología de los organismos en los cuales están presentes (46)

La palabra "alcaloide" es derivada del término "álcali vegetal" usada originalmente para describir un grupo de bases de origen botánico (47) Los alcaloides tienen como característica común la presencia de nitrógeno, son bases nitrogenadas, usualmente heterociclos; existen principalmente en plantas superiores y algunos microorganismos y presentan actividad fisiológica significativa en humanos y animales.

Estos compuestos representan uno de los más amplios y más diversos grupos de productos naturales secundarios y algunos presentan estructuras moleculares muy complejas. (46,48,49)

Frecuentemente la actividad fisiológica de un alcaloide manifiesta en sí mismo una toxicidad extrema y por otro lado, muchos alcaloides tienen usos terapéuticos y propiedades farmacológicas en dosis subletales. (48)

Todos los alcaloides tienen alguna acción fisiológica, generalmente sobre el sistema nervioso central. Estos pueden ser utilizados para el beneficio del hombre, en el campo de la medicina. Algunos de los más potentes son la morfina y la cocaína.

La acción fisiológica específica de un alcaloide puede variar con cada especie animal. La morfina por ejemplo, causa adormecimiento y sueño en el hombre y en perros, sin embargo en caballos y gatos actúa como un estimulante.

Algunos alcaloides tienen propiedades teratogénicas, causando defectos en el feto. Lo anterior sucede, por ejemplo, cuando la madre ingiere o consume plantas que los contienen. Se ha sugerido que algunos daños en el esqueleto del feto como la espina bífida pueden ser causados por la solanina, esto como resultado del consumo excesivo de papas. En el sentido de efectos teratogénicos son especialmente potentes aquellos compuestos tales como pirrolizidonas, quinolizidonas y nicotina (49)

La distribución de los alcaloides en la planta es muy heterogénea, se han encontrado alcaloides en varias partes de la planta madura, tales como: semillas, raíces, rizomas, bulbos, hojas, frutos y cáscara.

También frecuentemente se ha encontrado que la producción de alcaloides totales es mayor en el estado temprano de florescencia. (47)

Muchos alcaloides son incoloros, aunque algunos son coloridos, por ejemplo la berberina es amarilla y la queliretrina es roja.

La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; así, el ácido quínico está unido a los alcaloides de la quina, el ácido mecónico con los del opio y el ácido acotínico con las aconitinas. Algunos alcaloides, como los del *Solanum* y *Veratrum* se encuentran en forma de glucósidos de la ramnosa, galactosa y glucosa. Otros alcaloides se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable. (50)

En lo referente a la función de los alcaloides en las plantas es probable estos metabolitos secundarios son útiles a la planta en varias vías. Se les ha asociado con la protección del vegetal ante los actos predatorios de insectos y animales herbívoros, aunque hay alcaloides que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales superiores, pero no para los insectos. Se sugiere que algunos alcaloides intervienen en el crecimiento vegetal, ya sea por su capacidad de formar quelatos o intervenir en fenómenos de óxido reducción (49, 50)

La propiedad química más característica de los alcaloides es su basicidad (exceptuando la ricinina, colchicina y otros casos particulares), por lo que los métodos para aislarlos, purificarlos e identificarlos por lo general aprovechan esta propiedad.

Las soluciones de varios ácidos de metales pesados, como el silicotúngstico, cloroplatinico, fosfomolibdico, forman precipitados con la mayoría de los alcaloides, igualmente el mercuriyoduro de potasio (reactivo de Mayer), el yoduro de bismuto (Dragendorff) o el yodo-yoduro de potasio (Wagner). Las anteriores soluciones, preparadas en condiciones específicas, forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, aunque los precipitados también pueden ser causados por proteínas, purinas, betainas, coumarinas y algunos polifenoles. Como la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides; se usan estos reactivos como prueba presuntiva de su presencia. (50)

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

El siguiente diagrama de bloques muestra la secuencia general del procedimiento empleado para el desarrollo de este trabajo.



4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES.

Esta fase del trabajo, estuvo supeditada al grupo de Ciencias Biológicas que con anterioridad mencionamos.

Se nos proporcionó el material crudo tal y como es recolectado, de igual manera, el material procesado fue preparado por este mismo grupo, bajo las mismas condiciones que los miembros de la etnia lo preparan; para su posterior consumo.

La procedencia de las muestras se indica a continuación:

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE LOCAL	LUGAR DE PROCEDENCIA	FORMA DE OBTENCIÓN
<i>Brosimum alicastrum</i>	Ojite, ojax	San Pedro de las Anonas, Municipio de Aquismón, S.L.P.	Recolección
<i>Cucurbita pepo</i>	Pipián	San Pedro de las Anonas.	Recolección
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Orejón	San Pedro de las Anonas.	Recolección
<i>Jatropha curcas</i>	Dhak peen té	San Pedro de las Anonas.	Recolección
<i>Phaseolus sp.</i>	Frijol coloni	Puhuitzé, Municipio de Aquismón, S.L.P.	Compra

4.2.2 CONDICIONES DE PROCESAMIENTO PARA LAS MUESTRAS VEGETALES.

En la siguiente tabla se indican las condiciones de procesamiento para las muestras vegetales de interés:

NOMBRE CIENTÍFICO	TRATAMIENTO TÉRMICO	CONDICIONES
<i>Brosimum alicastrum</i>	Cocción	Alcalinización pH 13.5 con cenizas del fogón, 2 horas, T= 92 °C
<i>Cucurbita pepo</i>	Tostado	T= 120-125 °C, aproximadamente 20 minutos.
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Cocción	Alcalinización pH 13.5, 3 horas, T= 92 °C
<i>Jatropha curcas</i>	Tostado	T= 120-125 °C, aproximadamente 20 minutos.
<i>Phaseolus sp.</i>	Cocción	2 horas, T= 92 °C

4.2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Al momento de la recepción de las muestras se procedió a efectuar un secado de aquellas que tuvieran una humedad mayor al 15%, así se determinó la humedad gruesa u original. Posteriormente, cuando las muestras estaban secas, se procedió a molerlas en un molino Thomas-Wiley Mod. 4, con malla de 1mm. de diámetro. De esta manera se efectuó una molienda gruesa del material.

Debido a que en la mayoría de las determinaciones analíticas interfiere la fracción lipídica, se procedió a su extracción en un dispositivo tipo Soxhlet con éter de petróleo, así se determinó la denominada "grasa cruda".

Una vez que se tuvo el material seco y desengrasado, se sometió a una molienda fina, en un molino Tecator, empleando una malla de 0.5 mm de diámetro, obteniendo así el material con un tamaño de partícula equivalente a 30 MESH (British-Standard).

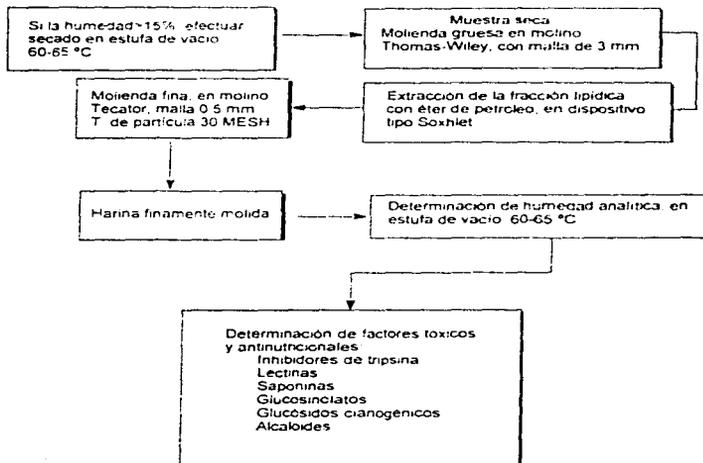
Posteriormente se le determinó a la harina finamente molida la humedad analítica, con la finalidad de poder determinar el contenido de sólidos totales no grasos y poder manejar nuestros resultados tanto en base seca como en la muestra original.

Así, finalmente, al disponer de las muestras en forma de harina seca, desengrasada y finamente molida, se procedió a efectuar la determinación de los siguientes factores tóxicos y antinutricionales:

- ♦ Inhibidores de proteasas (en especial de tripsina)
- ♦ Hemaglutininas o Lectinas
- ♦ Saponinas
- ♦ Glucosinolatos
- ♦ Glucósidos Cianogénicos
- ♦ Alcaloides

PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se muestra un diagrama de bloques de los pasos realizados para la preparación de las muestras y enseguida se describen algunas partes relevantes, así como cada una de las metodologías indicadas.



4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.

A continuación se describen las metodologías empleadas tanto para la preparación de la muestra como para las determinaciones de los factores tóxicos y antinutricionales mencionados previamente.

4.3.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Fundamento: La pérdida de material que se volatiliza bajo ciertas condiciones de temperatura y presión, se denomina humedad.

Material:

*Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620

*Desecador

*Balanza analítica

*Charolas de aluminio

Procedimiento:

1. Poner a peso constante las charolas de aluminio en una estufa de vacío a una temperatura de 60-65 °C y una presión de 15 a 20 inHg durante 2 a 4 horas.
2. Pesar de 2 a 5 g de muestra en cada charola y colocarlas en la estufa para su secado.
3. Se saca la charola y se coloca en el desecador, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se pesa. La determinación concluye hasta que las charolas quedan a peso constante o hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de más de 0,001 g.

Cálculos:

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

Donde:

P_i = peso de la charola con muestra húmeda, en gramos

Pf= peso de la charola con muestra seca, en gramos

m= peso de la muestra en gramos

4.3.2 DETERMINACIÓN DE GRASA CRUDA

Fundamento: La determinación se basa en la solubilidad de las grasas en éter; la cantidad de material extraído de una muestra mediante el reflujo con éter se denomina extracto etéreo o grasa cruda e incluye grasa verdadera, ácidos grasos, aceites esenciales, ésteres, vitaminas liposolubles y carotenoides principalmente.

Material y Reactivos:

- Dispositivo de extracción Soxhlet
- Balanza analítica
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Estufa de vacío LAB-LINE Mod. 3620
- Canasta de calentamiento eléctrica GLAS-COL
- Éter de petróleo R.A.

Procedimiento:

1. Pesar de 2 a 5 g de muestra en un cartucho de celulosa. Es conveniente emplear la muestra seca o la que se empleó en la determinación de humedad, pues así se evitará el arrastre de los componentes hidrosolubles debido a la humedad de la muestra, como son los carbohidratos
2. Tapar el cartucho con un pedazo de algodón y colocarlo en el compartimiento de extracción. En este caso, el matraz receptor debe contener unas perlas de vidrio para controlar la ebullición.
3. La cantidad de solvente depende del tamaño del dispositivo de extracción y en términos generales se recomienda la cantidad que produzca dos descargas y una más que solo cubra el cartucho de celulosa pero sin llegar a sifonear
4. A continuación se procede a un calentamiento moderado que permita un período de extracción de aproximadamente 8 horas.

5. Después de dicho tiempo se retira el matraz colector y se recupera el disolvente por simple destilación.
6. El matraz junto con las perlas de ebullición, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipóide

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{Pf - Pi}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del recipiente después de la extracción (en gramos).

Pi= peso del recipiente antes de la extracción (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.

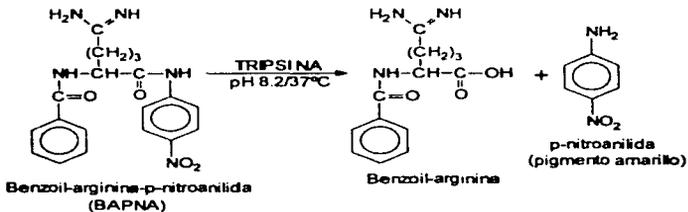
NOTA 2: Debido a que el punto de ebullición del éter de petróleo es bajo (34-45 °C) se recomienda enfriar los refrigerantes con agua-hielo.

4.3.3 DETERMINACIÓN DE COMPONENTES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES

4.3.3.1 INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso directo o diluido de una muestra con una solución estándar 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 estándar de tripsina (c)
- * HCl 0.001N

Preparación:

a). Solución amortiguadora Tris (hidroximetil-amino-metano): pesar 6.05 g de tris y 2.94 g CaCl₂ 2H₂O, disolverlos en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 litro.

b). Solución de benzoin-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 estándar 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 mg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:

PREPARACIÓN 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 imán 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.

DETERMINACIÓN 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.

PARTE EXPERIMENTAL

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	5 min >	ml BAPNA 37°C	10 min >	ácido acético 30% (Aac)
B1	18	02	20+10 ml Aac*		50		00
1	18	02	20		50		10
B2	14	06	20+10 ml Aac*		50		00
2	14	06	20		50		10
B3	10	10	20+10 ml Aac*		50		00
3	10	10	20		50		10
B4	06	14	20+10 ml Aac*		50		00
4	06	14	20		50		10
BR	00	20	20+10 ml Aac*		50		00
R	00	20	20		50		10

PARTE EXPERIMENTAL

* A los blancos se les adiciona enseguida 1 ml de ácido acético 30% para inactivar la enzima.

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 00 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.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{R - A_3}{R} \times 100$$

Donde:

R = U.T. de la referencia (Tubo con 00 ml de extracto)

A3 = U.T. del tubo 3 (Tubo con 1.0 ml de extracto)

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.

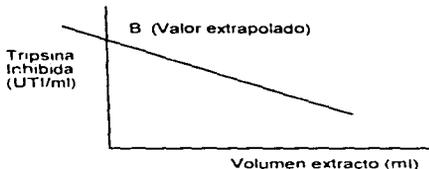
$$U.T.I. = R - U.T.$$

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 en U.T.I./ml

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

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

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

Donde:

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

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

$$F = \frac{A_1}{a_1} \times \frac{A_2}{a_2}$$

Donde A₁ = aforo(s) y a₁ = alícuota(s)

N = aforo inicial/mg muestra

4.3.3.2 LECTINAS O HEMAGLUTININAS

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA

Fundamento: La determinación se basa en el poder aglutinante que tienen ciertos componentes de naturaleza proteica 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

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 µl MICROTITER KIT (Cook Eng.-Alexander Virginia USA)
- * Pipeteador de gota de 50 µl DYNATECH
- * Placas para aglutinación tipo V
- * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS

- * Sangre de hamster 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 páncreas porcino SIGMA T-8128
- * Pronasa de *S. griseus* SIGMA P-5005

Preparación:

a). Cuando la sangre se use de inmediato, se puede usar como anticoagulantes la heparina o citrato en las siguientes concentraciones:

15-20 UI de heparina por ml 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 ALSEVER 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:

PREPARACIÓN 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%.

PREPARACIÓN DE LA SANGRE:

1. Una vez sangrado el animal, colocar la sangre en un matraz pequeño que contenga la solución anticoagulante, homogenizar suavemente
2. Trasvasar la sangre con anti-coagulante 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 glóbulos rojos.

SENSIBILIZACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS:

1. Por cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregar 1 ml de solución de proteasa (para sangre de hamster se emplea pronasa al 0.2%) 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 coagulos, es necesario filtrar a través de gasa en un embudo de tallo corto.

AJUSTE DE LA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS.

1. Tomar 1 ml de la suspensión de glóbulos 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.

PARTE EXPERIMENTAL

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.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS.

1. Con ayuda de la pipeta automática de 12 canales depositar 50 μ l 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 difusión de eritrocitos en todo el pozo (aglutinación) y negativo aquel pozo donde se observe sedimentación de eritocitos en el centro. Se reporta la máxima dilución donde se presenta aglutinación (título).

4.3.3.3 SAPONINAS

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA

Fundamento: La determinación está basada en el aprovechamiento de la capacidad hemolítica de las saponinas sobre eritrocitos. Se emplea un método de microtitulación (como en la determinación de hemaglutininas) en el cual se pone en contacto un

extracto metanólico de la muestra, resuspendido en solución salina, con los eritrocitos sensibilizados.

En este caso se emplearon eritrocitos de conejo.

MATERIAL Y REACTIVOS

- * Equipo para extracción de grasas Goldfisch LABCONCO
- * Vasos de borde esmerilado KIMAX
- * Rotavapor BUCHI Mod R
- * Incubadora BLUE-M
- * Centrifuga DYNATECH
- * Tubos para centrifuga de 15 ml graduados PYREX
- * Placas para hemólisis tipo U
- * Pipeta automática de 12 canales LABSYSTEMS
- * Microdilutores de 50 μ l MICROTITER KIT (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- * Pipeteadores de gota de 50 μ l DYNATECH
- * Eter de petróleo R.A.
- * Mezcla metanol-agua 85:15
- * Solución salina al 0.9%
- * Eritrocitos de conejo sensibilizados (a)
- * Solución estándar de saponinas (saponina de quillaja BDH y digitonina SIGMA).
- Solución de tripsina al 0.1% en solución salina (Tripsina de páncreas porcino SIGMA T-8128)

Preparación:

a) La preparación de la sangre de conejo se lleva a cabo de la misma forma que en la determinación de hemaglutininas, empleando tripsina al 0.1% para la sensibilización de los eritrocitos.

b) Solución estándar de saponinas: preparar una solución de saponinas al 0.5% en solución salina al 0.9% empleando una mezcla 1:1 de saponina de quillaja y digitonina.

Procedimiento:

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Pesar 2.5 g de muestra en un cartucho de celulosa. Colocar el cartucho en el extractor de grasas Goldfisch y desengrasar con éter de petróleo (igual que en la determinación de grasa cruda).

EXTRACCIÓN DE SAPONINAS

1. Sobre la muestra desengrasada y empleando el mismo extractor Goldfisch, se lleva a cabo una extracción con 50 ml de mezcla metanol-agua 85:15 durante 2 horas y colocando el control de temperatura en high. Debe emplearse un vaso de borde esmerilado limpio.
2. El extracto metanólico se transfiere del vaso a un matraz bola de 100 ml y se concentra con el rotavapor hasta sequedad. Es importante eliminar todo el metanol.
3. Resuspender el residuo del matraz bola con solución salina al 0.9%. Filtrar a través de papel Whatman No. 4 y aforar el filtrado a 50 ml con solución salina al 0.9%.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Las placas tipo U se preparan de la misma manera como se preparan las placas para la determinación de hemaglutininas. En cada placa se aplica en una hilera del estándar de saponinas como control positivo, de la misma forma como se aplica el extracto de las muestras, y se siguen los mismos pasos hasta la incubación a 37 °C durante 1 hora.

LECTURA

Transcurrido el tiempo de incubación se colocan las placas en el dispositivo para lectura, se consideran positivos aquellos pozos que se observen translúcidos (hemólisis) y negativos aquellos pozos en los que se presente un punto rojo en el centro indicando la sedimentación de los eritrocitos.

Por definición, 1 Unidad de hemólisis (U.H) equivale a 0.1 mg del estándar, que es el límite de detección para la sangre empleada, de tal manera que pueden

expresarse los resultados en base a U.H. dependiendo del título obtenido para cada muestra.

4.3.3.4 GLUCOSINOLATOS

Fundamento: Al llevarse a cabo la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos, se liberan estequiométricamente glucosa y el anión bisulfato, esta metodología se basa en el uso de la actividad específica de la tioglucosidasa, la cual nos liberará la glucosa de los glucosinolatos y por cuantificación de esta glucosa y la glucosa libre, tendremos indirectamente el contenido de glucosinolatos.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Digestor TECATOR Mod. AB-20/40
- Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod. 340
- Tubos de rosca PYREX Mod. 9825
- Tapones de rosca con cubierta de teflón
- Pipeta automática LABSYSTEMS de 200-1000 μ l
- Vortex LAB-LINE Mod. 5
- Cronómetro
- Solución de ácido benzoico (a)
- Solución patrón de reserva de glucosa (b)
- Soluciones patrones de trabajo de glucosa (c)
- Reactivo de o-taluidina (d)
- Buffer de fosfatos pH 7.0 (e)
- Ácido acético concentrado (f)
- Solución de Tioglucosidasa comercial (SIGMA Cat. T-4528) (g)

Preparación:

(a). Solución de ácido benzoico: Disolver 14 g de ácido benzoico en 800 ml. de agua desionizada con calentamiento. Dejar enfriar y aforar a 1000 ml

PARTE EXPERIMENTAL

(b). Solución patrón de reserva de glucosa: Disolver 1g de glucosa en 80 ml. de solución de ácido benzoico y afajar a 100 ml. con la misma solución

(c) Soluciones patrones de trabajo de glucosa: Tomar alícuotas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 ml. del patrón de reserva de glucosa, y afajar cada una a 50 ml con la solución de ácido benzoico.

(d) Reactivo de o-toluidina: Disolver 15 g de tiourea en aproximadamente 900 ml. de ácido acético. Adicionar 60 ml. de o-toluidina y afajar a 1000 ml. con ácido acético. Dejar en reposo por lo menos 24 horas. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

(e) Buffer de fosfatos pH 7.0. Mezclar 39.0 ml. de una solución 0.2 M de fosfato monobásico de sodio (27.8 g en 1000 ml.) con 61 ml. de una solución 0.2 M de fosfato dibásico de sodio (53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 1000 ml) y afajar a 200 ml.

(g) Solución de tioglucosidasa comercial: Se pesan 20 mg de tioglucosidasa y se afajar a 10 ml. con buffer de fosfatos pH 7.0.

Procedimiento:

• Determinación de glucosa total.

1. Pesar de 12.5 a 25 mg de muestra (harina desengrasada y finamente molida) en un tubo de ensaye, y disolverla en 1 ml. de buffer de fosfatos pH 7.0.
2. Colocar el tubo en un baño de agua a 37 °C. Adicionar 0.5 ml. de solución de tioglucosidasa y dejar actuar a la enzima durante 15 minutos, midiendo el tiempo con cronómetro.
3. Pasado este tiempo, detener la reacción adicionando 0.5 ml. de ácido acético concentrado. Mezclar perfectamente utilizando un vortex.
4. Tomar una alícuota de 0.5 ml y adicionarlos a un tubo con tapa roscada forrada de teflón que contenga 3.0 ml. de reactivo de o-toluidina.
5. Colocar este tubo en un digestor precalentado a 100 °C y dejarlo durante 13 minutos.

PARTE EXPERIMENTAL

6. Una vez transcurrido este tiempo, sacar el tubo y enfriarlo al chorro de agua fría hasta temperatura ambiente.

7. Leer absorbancia a 630 nm.

• Determinación de glucosa libre.

1. Pesar de 12.5 a 25 mg de muestra (harina desengrasada y finamente molida) en un tubo de ensayo y adicionar 0.5 ml. de ácido acético. Mezclar perfectamente con la ayuda de un vortex.

2. Adicionar 1 ml. de buffer de fosfatos pH 7.0 y 0.5 ml. de solución de tioglucosidasa. Homogeneizar nuevamente con el vortex.

3. Tomar una alícuota de 0.5 ml. y proceder de la misma manera que para la determinación de glucosa total (pasos 4-7).

Glucosa liberada:

La glucosa liberada se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$G.L. = \frac{G_T - G_0}{M}$$

En donde:

G.L. es la glucosa liberada en $\mu\text{g}/\text{mg}$

G_T es la glucosa total en μg

G_0 es la glucosa libre en μg

M es el peso de la muestra en mg.

Finalmente, se calcula el contenido total de glucosinolatos conforme a la fórmula siguiente.

$$\%G_sT = GL \times \frac{PM_{G_sP}}{180.16} \times \frac{100}{1000}$$

En donde:

% Gs. T. es el porcentaje de glucosinolatos totales.

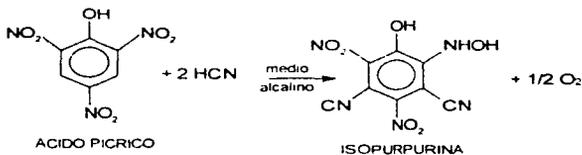
G.L. es la glucosa liberada en $\mu\text{g}/\text{mg}$

PM_{gluc} es el peso molecular del glucosinolato principal de la muestra, en g/mol.

La determinación de glucosinolatos se lleva a cabo con un tiempo de reacción de 15 minutos, considerando que a este tiempo ya se llevó a cabo la hidrólisis del glucosinolato en más de un 98%.

4.3.3.5 GLUCÓSIDOS CIANOGENÉNICOS

Fundamento: El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. Para cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de una β -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico, el HCN liberado reacciona con el ácido picrico formando la isopurpura de color café rojizo, el color es directamente proporcional al contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra.



MATERIAL Y REACTIVOS

- Baño de agua con agitación LAB-LINE

PARTE EXPERIMENTAL

- * Incubadora BLUE-M
- * Congelador comercial
- * Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod 340
- * Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX No. 9826
- * Solución de β -glucosidasa SIGMA G-8625 con activador (a)
- * Solución de picrato de sodio alcalinizada (b)
- * Papel indicador de HCN (c)
- * Solución estándar de HCN equivalente a 100 mg de HCN/ml (24.1mgKCN/100 ml)
- * HCl 0.5N
- * Amortiguador de fosfatos pH=7.0 (d)
- * Fécula de maíz comercial.

Preparación:

a). Solución de β -glucosidasa con activador: pesar 0.25 g de β -glucosidasa y disolverlos en buffer de fosfatos pH=7.0, agitando con cuidado para evitar la formación de espuma. Una vez disuelta la enzima se agregan 1.7 g de NaNO_3 que actúa como activador de dicha enzima, aforar a 250 ml con buffer pH 7.0. La concentración final es de 1 mg de β -glucosidasa /ml y 0.08 M de NaNO_3 .

b). Solución de picrato de sodio alcalinizada: pesar 2.5 g de ácido pícrico y disolverlos en agua destilada, agregar 12.5 g de carbonato de sodio, agitar hasta su disolución, aforar a 500 ml con agua destilada.

c). Papel indicador de HCN: sumergir papel Whatman No 2 en una solución de picrato de sodio alcalinizada (b), escurrir y secar en estufa a una temperatura de 55-60 °C durante 30 minutos. Cuando esté seco, cortar tiras lo más exacto posible de 2x10 cm.

d). Amortiguador de fosfatos pH=7.0: se preparan dos soluciones como se indica continuación:

A: Solución de fosfato de sodio monobásico 0.2 M (27.8 g en 1 l)

PARTE EXPERIMENTAL

B: Solución de fosfato de sodio dibásico 0.2 M (53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en l)

Mezclar 39 ml de A y 61 ml de B y afarlo a 200 ml. Finalmente se ajusta el pH a 7.0 empleando el potenciómetro.

Procedimiento:

LIBERACIÓN DEL HCN DE LA MUESTRA

1. Pesar de 20 a 500 mg de muestra finamente molida en un tubo de cultivo Pyrex. Si no se tiene información sobre el contenido de glucósidos cianogénicos en la muestra se pesan 500 mg. El ensayo se hace por duplicado.
2. Adicionar 5 ml de solución de β -glucosidasa (fría) procurando humedecer toda la muestra. Homogenizar.
3. Colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo sin tocar las paredes y cerrar herméticamente con el tapón de rosca (FIG.1)

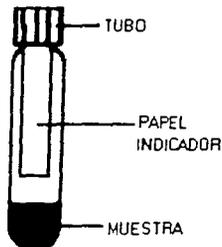


FIG.1

4. Colocar los tubos en el baño de agua que ya debe estar a una temperatura de 40 °C y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas.

PARTE EXPERIMENTAL

5. Transcurrido el tiempo, colocar los tubos en el congelador durante 30 minutos
6. Sacar los tubos del congelador y destapar para adicionar 1 ml de HCl 0.5N (frío). Volver a tapar los tubos. Homogenizar teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador. Si se usan los tapones adecuados, la tira de papel quedará adherida al tapón y no se presentarán problemas de manipulación
7. Colocar los tubos en la incubadora por espacio de 30 minutos a 60 °C. Transcurrido el tiempo sacarlos y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa. Aquellos tubos que presenten una coloración café-rojiza se consideran positivos y se procederá a realizar la determinación cuantitativa. Los tubos que no presenten coloración se consideran negativos. De manera simultánea se corre un blanco (todos los reactivos sin la muestra) y una curva estándar.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

1. Para simular la interacción muestra-HCN liberado se emplea fécula de maíz; se pesa en cada tubo 500 mg de fécula de maíz (matriz).
2. Se adiciona a cada tubo los ml correspondientes de solución estándar de KCN y en seguida 5 ml de amortiguador de pH 7.0, procurando humedecer la fécula.
3. Se colocan las tiras de papel indicador como se describió anteriormente y se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN de la muestra

En el cuadro 1 se muestra la forma de preparar los tubos. La curva estándar va de 5 a 60 mg de HCN, ya que fué el rango óptimo encontrado en la respuesta concentración de HCN vs. D.O. ($r=0.99$) en donde se cumple la ley de Lambert-Beer.

TUBOS PARA LA CURVA ESTÁNDAR

Cuadro 1

ml de solución estándar	fécula de maíz (mg)	ml buffer pH 7.0	$\xrightarrow{4 \text{ hrs}}$ $\underline{40} \text{ } ^\circ\text{C}$	HCl 0.5N (frío)	[HCN] mg
0.0	500	5.0		1.0	0
0.05	500	5.0		1.0	5.0
0.10	500	5.0		1.0	10.0
0.20	500	5.0		1.0	20.0
0.40	500	5.0		1.0	40.0
0.60	500	5.0		1.0	60.0

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA.

1. Extraer con cuidado la tira de papel indicador y colocarla en otro tubo de cultivo con tapón de rosca, adicionar 20 ml de agua destilada (medidos con bureta), tapar y agitar vigorosamente para extraer el pigmento del papel (isopurpurina).
2. Filtrar el contenido del tubo para separar los residuos de papel. En caso de que éstos presenten aún coloración se puede hacer otra extracción con 20 ml de agua destilada, filtrando y reuniendo el filtrado con el de la primera extracción.
3. El filtrado se transfiere a una celda para su lectura en el espectrofotómetro previamente ajustado a 100% T con el blanco a 520 nm. La curva estándar se lee de igual forma solo que en este caso el blanco corresponde al tubo que tiene 0.0 ml de solución estándar de KCN.

Cálculos

Transformar las lecturas de % de Transmitancia a % de Absorbancia:

$$A = \log \frac{1}{\%T/100}$$

Trazar la gráfica de A vs. mg de HCN con los datos de la curva estándar e interpolar los valores de % A de las muestras para obtener los respectivos mg de HCN o de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal el correspondiente contenido de HCN puede ser calculado.

$$\text{mg HCN} / 100 \text{ g de muestra} = \frac{A \times D \times 100}{m}$$

Donde:

A= mg de HCN

D=número de veces que se adicionaron 20 ml de agua (dilución)

m= mg de muestra

4.3.3.6 ALCALOIDES

DETERMINACION CUALITATIVA.

Fundamento El material seco de la planta se extrae con metanol. Una solución acuosa de la porción soluble en ácido del extracto con metanol, se hace básico con amoníaco. Dicha porción es sujeta a extracción diferencial con diclorometano-etanol. Los dos extractos así obtenidos son ensayados con siete reactivos para alcaloides:

- 1) Reactivo de MAYER (cloruro de mercurio y yoduro de potasio)
- 2) Reactivo de WAGNER (triyoduro de potasio)
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF (nitrato de bismuto y yoduro de potasio).
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIN (ácido fosfomolibdico)
- 5) Reactivo de HAGER (ácido picrico).
- 6) Reactivo de SCHEIBLER (ácido fosfotúngstico).
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTÉNICO.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Embudo de separación de 125 ml.
- Rotavapor BUCHI Mod. R.

- Matraces bola de 100 ml PYREX
- Papel filtro Whatman No. 1
- Parrilla de agitación CORNING Mod PC-351
- Estufa de vacío LAB-LINE INSTRUMENTS
- Acido nítrico 30% d_4^{20} : 1.180
- Acido sulfúrico 17%
- Acido silicotungsténico ($4H_2O \cdot SO_2 \cdot 12WO_2 \cdot 22H_2O$)
- Metanol R.A.
- Sulfato de sodio anhidro
- Amoniaco concentrado (aprox. 25%).
- Diclorometano R.A.
- Etanol R.A.
- Reactivo de Mayer (a)
- Reactivo de Wagner (b)
- Reactivo de Dragendorff (c)
- Reactivo de Sonnenschein (d)
- Reactivo de Hager (e)
- Reactivo de Scheibler (f)
- Reactivo de Acido Silicotungsténico (g)

Preparación

a). Reactivo de Mayer: disolver 1.36 g de $HgCl_2$ en 60 ml de agua y aparte disolver 5.0 g de KI en 10 ml de agua. Reunir las dos soluciones y aforar a 100 ml con agua destilada

b). Reactivo de Wagner: disolver 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 ml de agua; aforar a 100 ml con agua destilada.

c). Reactivo de Dragendorff: disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de HNO_3 al 30% (d_4^{20} : 1.18) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se

mezcan las 2 soluciones y se deja reposar 24 horas. Decantar y aforar a 100 ml con agua destilada.

d). Reactivo de Sonnenschein: a 100 ml de solución caliente de molibdato de amonio (43 g en 100 ml de agua), adicionar 100 ml de una solución caliente de fosfato dibásico de sodio anhidro (10 g en 100 ml de agua); a esta solución clara adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado, se forma un precipitado amarillo, dejar reposar 1 hora. Eliminar el líquido sobrenadante, resuspender el precipitado en 50 ml de agua destilada y calentar. Cuando ya está caliente, se le agregan 100 ml de solución caliente de carbonato de sodio anhidro (28 g en 100 ml de agua), se forma una solución clara que se trasvasa a una cápsula de porcelana y se evapora a sequedad; flamear con un mechero bunsen la superficie del polvo hasta que se encienda para evaporar las sales de amonio. El polvo se pesa en un vaso de precipitados (deben obtenerse aproximadamente 30 g), y disolverlo en 200 ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar 50 ml de ácido nítrico concentrado. Aforar a 300 ml con agua destilada. Se obtiene una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

e). Reactivo de Hager: preparar una solución saturada de ácido picrico, esto es: 2.0 g en 100 ml de agua.

f). Reactivo de Scheibler: disolver 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico en 50 ml de agua. Acidular la solución con ácido nítrico

g). Reactivo de Acido Silicotungsténico: disolver 50 g de ácido silicotungsténico en la cantidad necesaria de ácido sulfúrico 6N para preparar 100 ml de solución.

Procedimiento:

1. Pesar de 2 a 4 g de muestra seca y molida, adicionar 40 ml de metanol, agitar y dejarla toda la noche.
2. Al día siguiente calentar durante 4 horas a 50 °C en baño de agua con agitación interrumpida

PARTE EXPERIMENTAL

3. Filtrar el extracto y lavar el residuo con 20 ml de metanol. Transferir el filtrado a un matraz bola de 100 ml y con ayuda del rotavapor evaporar el metanol hasta sequedad.
4. Resuspender el residuo con 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1%, agitar y filtrar.
5. Para lavar el residuo se usan 8 ml. de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se hace básico con amoniaco concentrado (aprox. 25%).
6. Se extrae con tres porciones de 20 ml. de diclorometano cada una, dando la fracción "A".
7. A la solución acuosa residual de la anterior extracción, se procede a extraerla con una mezcla diclorometano-etanol (3:2 v/v), con tres porciones de 20 ml cada una, con lo cual se obtiene la fracción "B".
8. Las fases orgánicas son lavadas con 5 ml. de solución media saturada de sulfato de sodio y secada con sulfato de sodio anhidro.
9. Las dos fracciones A y B, son evaporadas en un rotavapor por separado, y el residuo es resuspendido con 1.5 ml. de HCl al 1% y 1.5 ml. de diclorometano y se agita vigorosamente.
10. La fase acuosa de cada fracción es pipeteada con una pipeta Pasteur y filtrada a través de algodón y dividida en siete porciones; estas alícuotas son ensayadas con los siete reactivos indicados:

REACTIVO	PRECIPITADO
Mayer	pp blanco
Wagner	pp flocculento color marrón.
Dragendorff	pp anaranjado-marrón.
Sonnenschein	pp amarillo
Hager	pp amarillo.
Scheibler	pp blanco-grisáceo
Acido Silicotungsténico	pp blanco-grisáceo

Resultados

Debido a la frecuencia de reacciones falsas-positivas con los reactivos comunes para determinar alcaloides, sólo se considera como positiva la presencia de ellos en nuestra muestra, cuando cualquiera de las dos fracciones (A y B) dan reacción positiva con los siete reactivos anteriormente enumerados.

Debe mencionarse que en el reactivo de Hager (ácido pícrico) es de baja sensibilidad, por lo tanto cuando da prueba negativa mientras todas las demás son positivas, puede descartarse y debe considerarse positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

5. RESULTADOS.

5.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

La siguiente tabla corresponde a los resultados obtenidos en la determinación de humedad gruesa y grasa de las muestras crudas estudiadas.

NOMBRE CIENTÍFICO	% HUMEDAD	% GRASA CRUDA
<i>Brosimum alicastrum</i>	52.17	0.72
<i>Cucurbita pepo</i>	4.90	45.38
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	17.50	1.24
<i>Jatropha curcas</i>	16.69	53.10
<i>Phaseolus sp.</i>	11.32	0.86

Para el caso de las muestras procesadas, bajo diferentes tratamientos térmicos, tenemos los siguientes resultados:

NOMBRE CIENTÍFICO	% GRASA CRUDA
<i>Brosimum alicastrum</i>	0.69
<i>Cucurbita pepo</i>	48.94
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	1.31
<i>Jatropha curcas</i>	52.27
<i>Phaseolus sp.</i>	2.43

Cabe mencionar que a estas últimas no se les determinó la humedad, ya que cuando se nos proporcionaron, se encontraban secas.

En la siguientes tablas se indican los resultados de la determinación de humedad analítica efectuadas a las muestras en forma de harina seca, desengrasada y finamente molida, ya que con el material en esta forma fue como se realizaron las determinaciones de factores tóxicos y antinutricionales.

MUESTRAS CRUDAS

NOMBRE CIENTÍFICO	% HUMEDAD
<i>Brosimum alicastrum</i>	1.55
<i>Cucurbita pepo</i>	6.30
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	4.17
<i>Jatropha curcas</i>	5.64
<i>Phaseolus sp</i>	5.64

MUESTRAS PROCESADAS

NOMBRE CIENTÍFICO	% HUMEDAD
<i>Brosimum alicastrum</i>	7.77
<i>Cucurbita pepo</i>	2.53
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	2.22
<i>Jatropha curcas</i>	3.22
<i>Phaseolus sp</i>	4.12

5.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Se presenta en la siguiente tabla los resultados obtenidos para esta determinación, expresados en Unidades de Tripsina Inhibida por mg de harina seca, desengrasada y finamente molida.

MUESTRAS CRUDAS	UTI/mg harina
<i>Brosimum alicastrum</i>	48.00
<i>Cucurbita pepo</i>	No se detectó
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	No se detectó
<i>Jatropha curcas</i>	154.41
<i>Phaseolus sp</i>	54.07

En las muestras en las cuales estuvieron presentes los inhibidores de tripsina, se procedió a efectuar la determinación en las muestras procesadas, ya que debido a su naturaleza proteica, estos componentes son termolábiles.

Los resultados obtenidos son los que a continuación se indican:

MUESTRAS PROCESADAS	UTI/mg harina
<i>Brosimum alicastrum</i>	8.36
<i>Jatropha curcas</i>	107.42
<i>Phaseolus sp</i>	2.42

RESULTADOS

Para expresar los resultados en base al material fresco, es necesario reportarlos en Unidades de Tripsina Inhibidas por mg. de muestra original, para lo cual es necesario considerar el porcentaje de grasa y de humedad de la semilla íntegra y de igual manera el porcentaje de humedad de la harina seca, desengrasada y finamente molida (HSDFM).

A continuación se indican los cálculos correspondientes.

Necesitamos calcular los sólidos totales no grasos (STNG).

$$STNG = 100 - (\% Grasa + \% Humedad)$$

Para el caso de las muestras en forma de harina seca, desengrasada y finamente molida, solamente consideramos el % de humedad, ya que la muestra se encuentra desengrasada.

Una vez que se han calculado los STNG de las harinas (Muestras crudas y procesadas) y tomando en cuenta los resultados expresados en UTI/mg harina y los STNG, realizamos lo siguiente:

$$A \frac{UTI}{mg \text{ HSDFM}} \times \frac{100 \text{ mg HSDFM}}{B \text{ mg STNG}} = C \frac{UTI}{mg \text{ STNG}}$$

Ahora, refiriéndonos a la muestra original (semilla íntegra), calculamos nuevamente los STNG.

$$STNG = 100 - (\% Grasa + \% Humedad) = \frac{D \text{ mg STNG}}{100 \text{ mg Muestra Original}}$$

Finalmente:

$$C \frac{UTI}{mg \text{ STNG}} \times \frac{D \text{ mg STNG}}{100 \text{ mg Muestra Original}} = E \frac{UTI}{mg \text{ Muestra Original}}$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESULTADOS

MUESTRAS CRUDAS	UTI/ mg M.O.
<i>Brosimum alicastrum</i>	40.27
<i>Jatropha curcas</i>	49.44
<i>Phaseolus sp</i>	47.01

Para el caso de las muestras procesadas, los resultados son los siguientes:

MUESTRAS PROCESADAS	UTI/ mg M.O.
<i>Brosimum alicastrum</i>	7.49
<i>Jatropha curcas</i>	33.53
<i>Phaseolus sp</i>	2.06

5.3 LECTINAS O HEMAGLUTININAS.

En el siguiente cuadro, se indican los títulos de aglutinación obtenidos para las muestras crudas.

MUESTRAS CRUDAS	TÍTULOS DE AGLUTINACIÓN			TÍTULO PROMEDIO*
<i>Brosimum alicastrum</i>	15	15	14	15
<i>Cucurbita pepo</i>	12	12	13	12
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	12	12	12	12
<i>Jatropha curcas</i>	12	13	12	12
<i>Phaseolus sp.</i>	36	37	36	36

*Promedio redondeado al número entero inmediato

En base a los resultados anteriores y tomando en cuenta la naturaleza proteica de las lectinas, se procedió a realizar la determinación en las muestras procesadas, obteniéndose los siguientes resultados:

MUESTRAS PROCESADAS	TÍTULOS DE AGLUTINACIÓN			TÍTULO PROMEDIO-
<i>Brasimum alicastrum</i>	10	10	10	10
<i>Cucurbita pepo</i>	8	8	7	8
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	11	11	11	11
<i>Jatropha curcas</i>	11	11	11	11
<i>Phaseolus sp.</i>	13	12	13	13

*Promedio redondeado al número entero inmediato

Para tener una referencia se realizó la prueba con dos muestras vegetales, las cuales fueron chícharo y garbanzo, eligiéndose estas debido a que en estudios anteriores se reporta que tienen un contenido bajo de lectinas y además la toxicidad de éstas es poco significativa. De igual manera se empleó una lectina purificada: utilizando una solución de concentración conocida, para poder efectuar una comparación entre los títulos de estas muestras de referencia y las de interés en este estudio.

RESULTADOS

MUESTRA	TÍTULOS DE AGLUTINACIÓN			TÍTULO PROMEDIO
Chicharo	9	9	9	9
Garbanzo	7	7	7	7
Lectina purificada de frijol*	46	47	46	46

*Compañía SIGMA artículo # L-8754 [0.1 mg/ml]

5.4 SAPONINAS.

Al efectuar esta determinación se obtuvieron los siguientes títulos de hemólisis para el caso de las muestras crudas.

MUESTRAS CRUDAS	TÍTULOS DE HEMÓLISIS			TÍTULO PROMEDIO-
<i>Brosimum alicastrum</i>	1	1	1	1
<i>Cucurbita pepo</i>	2	2	2	2
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	0	0	0	0
<i>Jatropha curcas</i>	1	1	1	1
<i>Phaseolus sp.</i>	1	1	1	1

*Promedio redondeado al número entero inmediato

Para el caso del estándar de saponinas empleado el resultado fue:

ESTÁNDAR DE SAPONINAS	TÍTULO		
Mezcla 1:1 de saponina de quillaja y digitonina al 0.5% en solución salina.	4	4	4

RESULTADOS

Se realizó la determinación para las muestras procesadas, obteniéndose lo siguiente:

MUESTRAS PROCESADAS	TÍTULOS DE HEMÓLISIS			TÍTULO PROMEDIO
<i>Brosimum alicastrum</i>	1	1	1	1
<i>Cucurbita pepo</i>	2	2	2	2
<i>Jatropha curcas</i>	1	1	1	1
<i>Phaseolus sp</i>	1	1	1	1

Para cuantificar estos compuestos se tiene que las unidades asignadas en esta metodología se definieron como Unidades de hemólisis por miligramo de muestra en forma de harina seca, desengrasada y finamente molida (HSDFM).

La concentración del extracto vegetal para todos los casos es de 0.05 mg/μl.

En una dilución seriada se tiene lo siguiente:

Concentración del extracto

2^t

Donde:

t = título de hemólisis

Para un título de hemólisis con valor de 1, se tienen 1.25 mg de muestra.

Si la solución estándar de saponinas tiene un título promedio de 4, y en ésta se tiene una concentración de 0.25 mg de saponina en 50 μl, entonces en este pozo se tiene que $0.25 \text{ mg}/2^4 = 15.6 \text{ } \mu\text{g}$ de saponina.

Recordemos que por definición 1μg de saponina equivale a 10 Unidades de Hemólisis, por lo tanto, tenemos lo siguiente:

RESULTADOS

$$\frac{15.6 \text{ mg saponina}}{1.25 \text{ mg Muestra}} \times \frac{12.48 \text{ mg saponina}}{\text{mg Muestra}} \times \frac{10 \text{ U.H.}}{1 \text{ mg saponina}} = \frac{124.8 \text{ U.H.}}{\text{mg Muestra}}$$

De esta manera se procede con los diferentes valores de títulos de hemólisis obtenidos. Para expresar los resultados en base al material original, a la semilla fresca, se tienen que tomar en cuenta los valores de humedad y grasa, y los cálculos se realizan de la misma manera que como se indicó para inhibidores de tripsina y glucosinolatos, sólo que en este caso las unidades son Unidades de Hemólisis (U.H.)

A continuación se presentan los resultados referidos al material fresco, expresados en Unidades de Hemólisis por mg de muestra original

MUESTRAS CRUDAS	U.H./ mg M.O.
<i>Brosimum alicastrum</i>	104.69
<i>Cucurbita pepo</i>	132.44
<i>Jatropha curcas</i>	39.96
<i>Phaseolus sp</i>	108.51

Para las muestras procesadas los resultados son:

MUESTRAS PROCESADAS	U.H./ mg M.O.
<i>Brosimum alicastrum</i>	111.75
<i>Cucurbita pepo</i>	127.32
<i>Jatropha curcas</i>	38.96
<i>Phaseolus sp</i>	106.78

RESULTADOS

En estudios anteriores realizados con la misma metodología, se estudiaron diversas muestras que se conoce contienen saponinas (45). En la siguiente tabla se presentan algunos de estos datos, los cuales nos serán de utilidad como parámetro de comparación.

MUESTRA VEGETAL	U.H./mg MUESTRA
Jinicuil	684.9
Magüey	341.33
Haba	42.7
Soya	21.3
Alfalfa	21.3
Chicharo	10.6
Avena	5.3

5.5 GLUCOSINOLATOS.

Los resultados de la curva estándar de glucosa se presentan a continuación:

CURVA PATRÓN DE GLUCOSA

TUBO No.	[Glucosa] $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$	ABSORBANCIA
1	25	0.112
2	50	0.228
3	75	0.360
4	100	0.480
5	125	0.602
6	150	0.685
7	175	0.826
8	200	0.852
9	225	1.048
10	250	1.170

Al efectuar la determinación de glucosa libre y glucosa total, tenemos los siguientes resultados expresados en porcentaje total de glucosinolatos. (La forma de realizar este cálculo se indica en la parte experimental)

MUESTRAS CRUDAS	% TOTAL DE GLUCOSINOLATOS
<i>Brosimum alicastrum</i>	0.22
<i>Cucurbita pepo</i>	0.20
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	0.23
<i>Jatropha curcas</i>	0.25
<i>Phaseolus sp</i>	7.88×10^{-2}

RESULTADOS

Al indicar los resultados en base al material fresco, éstos los expresamos en mg de glucosinolatos por mg de muestra original.

Los cálculos para obtener estas unidades se indican a continuación:

De acuerdo a la metodología utilizada y tal como se indica en la parte experimental, los resultados obtenidos se expresan en porcentaje total de glucosinolatos, por lo tanto se tienen A gGst/100 g HSDFM

De igual manera que como se indicó en los cálculos correspondientes a Inhibidores de tripsina, se requieren los sólidos totales no grasos (STNG) tanto de las harinas como de las muestras originales:

Así, tomando en cuenta los STNG de las harinas, tenemos lo siguiente:

$$\frac{A \text{ g Gst}}{100 \text{ mg HSDFM}} \times \frac{1 \text{ g HSDFM}}{1000 \text{ mg HSDFM}} \times \frac{100 \text{ mg HSDFM}}{B \text{ mg STNG}} = C \frac{\text{g Gst}}{\text{mg STNG}}$$

Ahora, considerando los STNG de la muestra original se tiene que:

$$C \frac{\text{g Gst}}{\text{mg STNG}} \times \frac{D \text{ mg STNG}}{100 \text{ mg Muestra Original}} \times \frac{1000 \text{ mg Gst}}{1 \text{ g Gst}} = E \frac{\text{mg Gst}}{\text{mg Muestra Original}}$$

MUESTRAS CRUDAS	mg Gst/mg M.O.
<i>Brosimum alicastrum</i>	1.84×10^{-3}
<i>Cucurbita pepo</i>	1.06×10^{-3}
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	1.95×10^{-3}
<i>Jatropha curcas</i>	8.00×10^{-4}
<i>Phaseolus sp</i>	6.85×10^{-4}

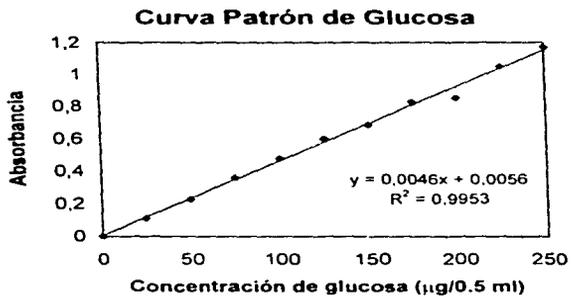
RESULTADOS

Para comparar los resultados obtenidos con una referencia, los expresaremos en mg de Glucosinatos totales por g de harina desengrasada.

Para realizar esta conversión, se considera que:

$$\frac{A \text{ g Gsl}}{100 \text{ g HSDFM}} \times \frac{1000 \text{ mg Gsl}}{1 \text{ g Gsl}} = N \frac{\text{mg Gsl}}{\text{g HSDFM}}$$

MUESTRAS CRUDAS	mg Gsl/g harina desengrasada
<i>Brosimum alicastrum</i>	2.2
<i>Cucurbita pepo</i>	2.0
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	2.3
<i>Jatropha curcas</i>	2.5
<i>Phaseolus sp</i>	0.79



5.6 GLUCÓSIDOS CIANOGÉNICOS.

A continuación se presentan los datos de la curva estándar de ácido cianhídrico.

Curva estándar de HCN

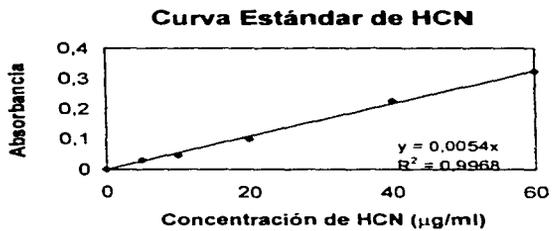
ml. de solución estándar	[HCN] μ g	Absorbancia
0.00	0.0	Bianco
0.05*	5.0	0.031
0.10	10.0	0.046
0.20	20.0	0.099
0.40	40.0	0.226
0.60	60.0	0.323

* límite de detección

Para el caso de la determinación cualitativa se obtuvo lo siguiente:

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

MUESTRAS CRUDAS	COLORACIÓN DEL PAPEL	PRUEBA
<i>Brasimum alicastrum</i>	Amarillo	Negativa
<i>Cucurbita pepo</i>	Amarillo	Negativa
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Amarillo	Negativa
<i>Jatropha curcas</i>	Amarillo	Negativa
<i>Phaseolus sp</i>	Amarillo	Negativa



5.7 ALCALOIDES.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados obtenidos para cada muestra, al ensayar las dos fracciones (A y B), con los siete reactivos indicados.

MUESTRAS CRUDAS										
NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Brosimum alicastrum</i>		<i>Cucurbita pepo</i>		<i>Enterolobium cyclocarpum</i>		<i>Jatropha curcas</i>		<i>Phaseolus sp</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
FRACCIÓN	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
REACTIVO										
Dragendorff	+	±	+	+	-	-	-	-	±	+
Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wagner	+	+	+	+	-	-	-	-	±	±
Sonnenchein	+	+	+	±	-	-	-	-	±	±
Scheibler	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido silico-tungsténico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hager	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RESULTADOS

En donde:

- + Indica reacción francamente positiva, es decir, con la formación notable del precipitado.
- ± Formación de una turbidez incipiente y ausencia del precipitado, indica reacción ligeramente positiva.
- Indica reacción negativa, con la ausencia total de turbidez.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Se puede apreciar en los resultados correspondientes a este apartado, que en efecto, algunas de las muestras estudiadas, en particular, *Cucurbita pepo* y *Jatropha curcas* contienen un porcentaje importante de grasa cruda, lo cual se traduce en un material con una densidad calórica importante.

Es necesario mencionar que las muestras vegetales restantes no revisten de importancia en cuanto a su contenido de grasa, pero sí en lo referente a su contenido de proteína cruda. Lo anterior se indica en base a información proporcionada por el grupo de investigadores del Instituto Politécnico Nacional.

6.2 INHIBIDORES DE TRIPSINA.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, al efectuar primeramente la determinación en las muestras crudas, solamente en tres de las cinco muestras estudiadas se encontraron inhibidores de tripsina, siendo la semilla de *Jatropha curcas* la que presentó una actividad inhibitoria significativa.

En el caso de las semillas de *Cucurbita pepo* y *Enterolobium cyclocarpum*, no se encontraron inhibidores de tripsina, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente; en trabajos previos, se reporta la presencia de dichos inhibidores en estas especies vegetales. (16,26) Esto puede deberse a que existen ciertos factores que influyen en la cantidad de sustancias tóxicas contenidas en una planta, encontrándose factores de tipo geográfico, climático y geológico que pueden modificar el contenido de los compuestos tóxicos.

Aunado a lo anterior, los tóxicos no están distribuidos de manera uniforme en todos los órganos de las plantas; asimismo, la fase de crecimiento es importante, ya que algunas plantas son venenosas en todos los estadios de su desarrollo y otras lo son tan sólo cuando florecen. De igual manera, algunas de las sustancias tóxicas no son

estables y se pueden desdoblarse en compuestos inocuos cuando se secan o almacenan. (51)

También es importante mencionar que para el caso de la semilla de *Enterolobium cyclocarpum*, en un estudio realizado por Sotelo y colaboradores (16), se reporta la presencia de inhibidores de tripsina en esta especie, sin embargo este estudio se realizó con una metodología, la cual ha sido modificada significativamente, por lo que actualmente se utiliza otra que varía notablemente, la cual se empleó en este estudio. Posiblemente esto influyó, aunado a los factores anteriormente mencionados. (52,53)

En base a los resultados anteriores se procedió a realizar la determinación con las muestras procesadas, y se puede apreciar la disminución notable de la actividad inhibitoria, al comparar los resultados obtenidos con los de las muestras crudas. Esto se debe a que el procesamiento de las muestras implica un tratamiento térmico y tomando en cuenta la naturaleza proteica de los inhibidores de tripsina, éstos son termolábiles, lo cual se ve reflejado en los resultados obtenidos.

Se considera que a partir de 10 Unidades de tripsina inhibidas por miligramo de muestra, se presenta un efecto tóxico importante, en base a esto, la única muestra cuyo contenido de inhibidores de tripsina es relevante, corresponde a *Jatropha curcas*.

6.3 LECTINAS O HEMAGLUTININAS.

Para efectuar esta determinación, se empleó sangre de hamster, ya que en base a otros trabajos anteriores, se ha comprobado que posee una mayor sensibilidad, aunque menos especificidad hacia las lectinas que otros eritrocitos, tales como los de conejo, o bovinos. En base a esto, podemos explicar las diferencias en los títulos de aglutinación obtenidos en este estudio y en un trabajo realizado por Sotelo y cols., para la muestra de *Enterolobium cyclocarpum*. Se reporta que esta semilla carece de fitohemaglutininas, cabe mencionar que este estudio último se efectuó con eritrocitos

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

de conejo, de vaca y humanos, y en la presente investigación se trabajó con eritrocitos de hamster. En base a lo anterior se explica la diferencia en la actividad hemaglutinante encontrada (16,44,54)

Al realizar la determinación, inicialmente con las muestras crudas, todas las semillas en estudio presentaron títulos de aglutinación, siendo el más alto el correspondiente a *Phaseolus sp*

Debido a que las lectinas son sensibles al calor por su naturaleza proteica, se realizó la determinación en las muestras tratadas térmicamente, observándose una disminución notable en el caso de *Phaseolus sp*, en donde el título inicial disminuyó aproximadamente una tercera parte con el tratamiento térmico

En el caso de las muestras restantes, la disminución en los títulos de aglutinación no fue tan significativa como en el caso anterior.

Para tener una referencia, se realizó la prueba con dos muestras vegetales, las cuales fueron chícharo y garbanzo, ya que se conoce que tienen un contenido bajo de lectinas y además la toxicidad de estas no es relevante. Asimismo se empleó una lectina purificada, utilizando una solución de concentración conocida, para así poder efectuar una comparación entre los títulos de estas muestras de referencia y las de interés en el presente estudio. La determinación efectuada es semicuantitativa y al comparar los títulos de las referencias con los de las muestras, éstos no se consideran significativos, ya que en estos inmunoensayos las cantidades detectadas o el límite de detección son cantidades del orden de pico o nanogramos, por lo tanto la cantidad de lectinas presentes no es relevante

Es necesario hacer notar que para el caso de *Jatropha curcas*, el título del material crudo y procesado no mostró cambio significativo, lo cual es de llamar la atención, ya que como se indicó anteriormente, existen numerosas referencias que indican que la semilla de esta planta es sumamente tóxica y además contiene una toxialbúmina denominada "curcina": sin embargo, es importante mencionar que estos

estudios se han desarrollado en países de Asia y Africa, principalmente, y la semilla en cuestión es originaria de estos lugares.

Sólo se encontró una referencia en donde se estudia la semilla de *Jatropha curcas* proveniente de Papantla, Veracruz y en este trabajo no se reporta toxicidad de dicha semilla

Pero, es necesario recordar, como ya se mencionó anteriormente, que existen factores diversos que repercuten en la cantidad de sustancias tóxicas contenidas en una planta (tipo de suelo, clima, altitud, estación del año, entre otros), por lo cual se sugiere efectuar un estudio posterior con esta semilla en especial, para demostrar su toxicidad o inocuidad

6.4 SAPONINAS.

Esta determinación se efectuó tanto con las muestras crudas como con las procesadas. No se presentaron diferencias en los títulos de hemólisis obtenidos, puesto que las saponinas son compuestos termoestables, lo cual explica que no disminuyeran los títulos al ensayar las muestras procesadas térmicamente

Al cuantificar y expresar los resultados en Unidades hemolíticas/ mg de muestra original, se pueden comparar los resultados obtenidos en este estudio, con los obtenidos en un trabajo anterior, en el cual se estudiaron diferentes muestras vegetales que se conoce contienen saponinas. Considerando que de estas muestras las de mayor consumo humano son el haba, la soya, el chicharo y la avena, al compararlas con los resultados del presente trabajo, se puede observar que los únicos resultados significativos, corresponden a *Brasimum alicastrum*, *Cucurbita pepo* y *Phaseolus sp*

Aunque como ya se mencionó anteriormente, la toxicidad de las saponinas se encuentra a discusión, ya que en algunos países su uso está permitido incluso como aditivo alimenticio, mientras que algunos autores ponen a discusión la inocuidad de estos compuestos.

6.5 GLUCOSINOLATOS.

Tomando en cuenta la tabla final de resultados en donde se reporta el contenido de estos compuestos en miligramos de glucosinolatos por gramo de harina desengrasada y considerando que algunos expertos reportan como límite máximo permitido para el consumo de estos tóxicos 5 mg de glucosinolatos/ g de harina desengrasada (42), al comparar los resultados obtenidos, con el dato anterior, se observa que todas las muestras en estudio se encuentran por debajo de este límite, por lo cual las podemos considerar seguras en lo que respecta a este tóxico en particular.

En la literatura se reporta que ciertos factores afectan el contenido de glucosinolatos, tales como factores genéticos, el estado ontogenético de la planta y la parte de la planta examinada, asimismo, la aplicación de sulfato puede incrementar el contenido de glucosinolatos, mientras que el nitrato puede reducir los niveles de éstos. También afectan factores de estrés; la sequía y la densidad de la planta influyen de igual manera. Los niveles de glucosinolatos generalmente empiezan a incrementarse en respuesta al estrés.

Algún proceso que dañe la integridad celular de la planta puede afectar el contenido de glucosinolatos por inicio de la degradación enzimática.

6.6 GLUCOSIDOS CIANOGENICOS.

Al efectuar la determinación cualitativa para el caso de las muestras crudas, se puede observar en la tabla correspondiente que esta prueba se consideró negativa, debido a que en el papel filtro la coloración que se presentó fue igual al blanco.

En base a lo anterior, se reporta que el contenido de glucósidos cianogénicos, en caso de estar presentes, es menor a 5 µg de HCN/ 0.5 g de muestra, siendo este último el límite de detección de la metodología empleada.

Dicha cantidad equivale a menos de 1 mg de HCN/ 100 g de muestra

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es necesario mencionar que como limite se considera de 10-20 mg de HCN/ 100 g de muestra.

6.7 ALCALOIDES

De acuerdo a la metodología ensayada, para que se considere que una muestra contiene alcaloides, debe obtenerse una prueba positiva con todos los reactivos ensayados, para descartar las reacciones falsas positivas que pueden presentarse. Cabe mencionar que sólo se acepta como prueba negativa la reacción de Hager, debido a su baja sensibilidad.

Las soluciones empleadas en esta metodología forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, y en los casos en los cuales se presentó prueba positiva, (tal como puede apreciarse en el cuadro correspondiente) se debe a que los precipitados formados pueden deberse a la presencia de proteínas, las cuales pueden precipitar con la adición de metales pesados contenidos en algunos de los reactivos empleados. Dentro de este mismo grupo de proteínas, se incluyen las "sustancias albuminosas" y las peptonas, también como causantes de reacciones falsas positivas, entre otras sustancias o compuestos reportados están ciertos glucósidos, algunos carbohidratos, purinas, betainas, aminas metiladas, taninos, sales de amonio, cumarinas y algunos polifenoles (47,55)

7. CONCLUSIONES

- Se realizó la caracterización químico-toxicológica de una manera cualitativa y cuantitativa de las semillas estudiadas.
- Las muestras que presentaron inhibidores de tripsina fueron *Brasimum alicastrum*, *Phaseolus sp* y *Jatropha curcas*, siendo el contenido de esta última el único significativo, incluso después de tratada térmicamente.
- En el caso de las saponinas, la única muestra que no contiene estos compuestos es *Enterolobium cyclocarpum*.
- Las cinco semillas estudiadas contienen glucosinolato; sin embargo, se encuentran en cantidades inferiores al nivel reportado como seguro por una ingesta prolongada y repetitiva.
- Para el caso de la determinación de glucósidos cianogénicos y alcaloides, no se detectó su presencia en ninguna de las muestras estudiadas.
- En la determinación de lectinas, todas las muestras estudiadas presentaron títulos de aglutinación, considerando seguros los títulos de las muestras tratadas térmicamente al compararlos con las muestras de referencia, ya que la cantidad de lectinas se consideró no relevante o poco significativa; no obstante, la inocuidad de la semilla de *Jatropha curcas* está a discusión.

- Se comprobó que para el caso de inhibidores de tripsina y lectinas, por ser de naturaleza proteica y por tanto termolábiles, se disminuye la cantidad de éstos significativamente en las muestras tratadas térmicamente, con excepción de *Jatropha curcas*, ya que tiene un contenido apreciable de inhibidores de tripsina, pero el simple tostado no disminuye de manera considerable estos compuestos indeseables.

RECOMENDACIONES.

La caracterización químico-toxicológica efectuada en este estudio es la fase inicial del estudio toxicológico. Se recomienda completar éste con los bioensayos en animales de laboratorio para demostrar la inocuidad de las especies vegetales en cuestión.

La caracterización químico-toxicológica realizada en este trabajo será indispensable para tener la justificación de la experimentación animal, ya que por ética se debe contar con antecedentes bien fundamentados para poder diseñar un protocolo de bioensayos "in vivo" donde será necesario el sacrificio de animales de experimentación.

B. BIBLIOGRAFÍA

- 1).- Bermejo, J.E. y León, J. Cultivos marginados (otra perspectiva de 1942). FAO, colección de producción y protección vegetal # 26, XIX-XII, 3-33, 40, 41, 61-69, Roma (1992).
- 2).- Barba, A.A. y Luna, R.S. Los recursos vegetales de México. Tópicos de Investigación y Posgrado ENEP Zaragoza, pág. 22-32, México, D.F. (1989).
- 3).- Keyfitz, N. Demographic discord. *The Sciences* 34, 21-27 (1994).
- 4).- Grande, F.C. Nutrición y Salud. Ediciones Temas de Hoy, S.A., pág. 11-43, Madrid (1988).
- 5).- Leopold, A.C. and Andrey, R. Toxic substances in plant and the food habits of early man. *Sciences* 176, 512-514 (1974).
- 6).- Liener, I.E. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, pp 1-5, 7-102, 143-263. N.Y. (1980).
- 7).- Ferrando, F. Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO, colección de alimentación y nutrición # 2, pág. IX-XI y 83-130, Roma (1980).
- 8).- Coon, J.M. Natural food toxicant (a perspective). *Nut. Rev.* 32, 321-332 (1974).
- 9).- FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. FAO, colección agricultura # 26, pág. 122-144, Roma (1993).
- 10).- Bostid, F.R. (Editor) Lost crops of the incas. National Academic Press, pp. 162-189, Washington, D.C. (1989).
- 11).- Flores, N. (Editor) ¿Producir para la desnutrición? Centro de Ecodesarrollo, pág 13-34 y 243-266, México, D.F. (1988).
- 12).- Boner, M., Chong, Y., Moreno, E., Quintanilla, J y Torres, F. (Compiladores). El agua y la energía en la cadena alimenticia. PUAL, PUE. e Inst. de Invest. Económicas, UNAM, pág. 29-38 y 177-208, México, D.F. (1994).
- 13).- Trápaga, Y. y Torres, F. (Coordinadores) El mercado internacional de la agricultura orgánica. Inst. de Invest. Económicas, UNAM, pág. 11-44, México, D.F. (1994).

- 14).- Sotelo, A. Leguminosas silvestres, reserva de proteínas para la alimentación del futuro. *Rev. ICYT (México)* 3 (54), 28-32 (1981).
- 15).- Villagran, J. R. Nuestro país desaprovecha su riqueza florística. *Gaceta-UNAM* 2498, pág. 16-19, México, D.F. (1990).
- 16).- Giral, F., Sotelo, A., Lucas, B. and De la Vega, A. Chemical Composition and Toxic Factors Content in Fifteen Leguminous Seeds. *Quart. J. Crude Drug Res.* 16 (3), 143-149 (1978).
- 17).- Sotelo, A., Lucas, B., Uvalle, A. and Giral, F. Chemical Composition and Toxic Factors Content of Sixteen Leguminous Seeds (II). *Quart. J. Crude Drug Res.* 18 (1), 9-16 (1980).
- 18).- Ruvalcaba, J. y Alcalá G. (Coordinadores) Huasteca (prácticas agrícolas y medicina tradicional. *Arte y sociedad*) Centro de Invest. y Estudios Superiores de Antropología Social, SEP, pág. 11-39, México, D.F. (1993).
- 19).- Avila, M. Hábitos alimenticios: una manifestación de la cultura Tének en la Huasteca potosina. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Antropología e Historia, SEP, México, D.F. (1989).
- 20) Avila, M., Suárez, M. y Velasco, O. Estado nutricional de preescolares de la etnia Tének en el municipio de Aquismón de la Huasteca potosina. *Memorias del Ier. Congreso Nacional de Nutrición*, pág. 76. Mérida, Yucatán (1992).
- 21) -Derache, R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, S.A., pág. 109-132, 444,445, Barcelona (1990)
- 22).- INI, SEDESOL. *Pueblos Indígenas de México. Huastecos de San Luis Potosí*. México, D.F. 1993
- 23).-Grosser, E. Los tenek de San Luis Potosí. *Lengua y Contexto* INAH, pág. 14,18-23, México, D.F. (1991).
- 24).-Martínez, M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. F.C.E. pág. 63, 648, 656, 747, 1062, 1096, 1110, 1141, México, D.F. (1979).
- 25).-Martínez, R. and Sánchez, V. Dietary value of fruits and seeds to spiny pocket mice, *Heteromys desmarestianus* (Heteromyidae). *J. Mamm.* 74 (2) 436-442 (1993)

- 26).-Henderson, C.W., Scheerens, J.C. and Berry, J.W. Antinutritional factors in *Cucurbita* seed meals. *J. Agric. Food Chem.* 34 (3) 434-436 (1986)
- 27).-Aguilar C.A y Zolla, C. Plantas tóxicas de México. Unidad de Inv. Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria del IMSS, pág. 96, 97, 124, 125. México, D.F. (1982).
- 28).- Grant, G., More, L.J., McKenzie, N.H., Donward, P.M., Buchan, W.C., Telek, L. and Pusztai, A. Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. *J. Agric. Sci.* 124 (3) 437-445 (1995).
- 29).- Anderson, D., Weiping, W. and Lewis, G.P. The composition and properties of eight gum exudates (Leguminosae) of American origin. *Biochem. Syst. Ecol.* 18 (1) 39-42 (1990).
- 30) - Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A. True protein content and non-protein amino acids present in legumes seeds. *Nutr. Rep. Int.* 37 (3) 545-553 (1988).
- 31).- Cano, L. Estudio Químico de la semilla de *Jatropha curcas*. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1978).
- 32).- Franco, J. Estudio químico de las semillas de *Jatropha mcvaughii*. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1991)
- 33) - Cano, L., Hernández, C. El piñoncillo INIREB, comunicado No 27, Xalapa, Ver., (1978).
- 34).- Ahmed, O.M.M. and Adam, S.E.I. Toxicity of *Jatropha curcas* in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* 27 (1) 89-96 (1979).
- 35).- El Badwi, S.M.A., Adam, S.E.I. and Hapke, H.J. Toxic effects of low levels of dietary *Jatropha curcas* seed on brown hisex chicks. *Vet. Hum. Toxicol.* 34 (2) 112-115 (1992).
- 36).- El Badwi, S.M.A., Mousa, H.M., Adam, S.E.I., Hapke, H.J. Response of brown hisex chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. *Vet. Hum. Toxicol.* 34 (4) 304-306 (1992).
- 37).- El Badwi, S. M. A., Adam, S.E.I., Hapke, H.J. Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in Brown Hisex chicks. *Dtsch. tierarztzl. Wschr.* 102 (2), 75-77 (1995).

BIBLIOGRAFÍA

- 38).- Abdu-Aguye, I., Sannusi, A., Alafiya-Tayo, R.A., Bhusurmamath, S.R. Acute toxicity studies with *Jatropha curcas* L. *Human Toxicol.* 5 (4) 269-274 (1986).
- 39).- Panigrahi, S., Francis, B.J., Cano, L.A., Burbage, M.B. Toxicity of *Jatropha curcas* seeds from Mexico to rats and mice. *Nutr. Rep. Int.* 29 (5) 1089-1100 (1984).
- 40).- Stirpe, F., Pession-Brizzi, A., Lorenzoni, E., Strocchi, P., Montanaro, L., Sperti, S. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. *Biochem. J.* 156 (1), 1-6 (1976).
- 41).- Toxicants Occurring Naturally in foods. National Academy of Sciences, pp 276-286, 299-306. Washington, D.C. (1973).
- 42).- Watson, D.H. (Editor). *Natural Toxicants in Food: Progress and Prospects*. Ellis Horwood LTD, pp 76-100, 110-115. Chichester (England). (1987).
- 43).- Serrano, C. (Editor). *Genes, evolución y diversidad humana. Temas de Antropología molecular*. Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM, pág. 107-116. México, D.F. (1995).
- 44).- Ramírez, G. "Efecto de la concentración de extractos de leguminosas para la determinación de lectinas". Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1989)
- 45).- Girón, M. Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1992).
- 46).- Stumpf, P.K. and Conn, E.E. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive treatise. Vol 7 (Secondary Plant Products)*. Academic Press, pp 317-319, 479-498, 502-523, (1981).
- 47).- D.W. Hughes, Miller, L.P. (Editor). *Phytochemistry*. Van Nostrand Reynold Co. Vol. II, pp 118-170. N.Y. (1973).
- 48).- Geissman, T.A. and Crout, D.H. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. Freeman, Cooper & Company, pp 429-431, USA. (1969).
- 49).- Vickery, M. L. and Vickery Brian. *Secondary Plant Metabolism*. University Park Press, pp 255-257, Baltimore, (1981).

BIBLIOGRAFÍA

- 50).- Domínguez, X. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. pág. 211-226, México, D.F. (1979).
- 51).- Forsyth, A.A. *Iniciación a la Toxicología vegetal. Manuales de técnica agropecuaria*. Ed. Acribia, pág. 8-15, España, (1968).
- 52).- Kakade, M, Simons, N and Liener, E. An Evaluation of Natural vs. Synthetic Substrates for Measuring the Antitryptic Activity of Soybean Samples. *Cereal Chem.* 46, 518-526 (1969).
- 53).- Kakade, M., Rackis, J., McGhee, J. and Puski, G. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. *Cereal Chem.* 51, 376-382 (1974).
- 54).- Lucas, B. and Sotelo, A. A useful modification of the haemagglutination method for the screening of lectins in legume seeds. *Second International Workshop on Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds*. pp. 71-74, Wageningen (1993).
- 55).- Farnsworth, N.R. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.*, 55, 245-256 (1966).
- 56).- Espinosa, M. Desarrollo de un método general para determinar el contenido total de glucosinolatos en crucíferas. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1994).