



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACION DE FACTORES TOXICOS EN VARIAS ALMENDRAS NO TRADICIONALES CON POTENCIAL APORTE DE PROTEINA Y GRASA DIETETICA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO DE ALIMENTOS PRESENTA: MARIO IVAN LOPEZ ESTRADA





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. I. María de Lourdes Flores Tellez
2do suplente	Prof. Lucia Cornejo Barrera

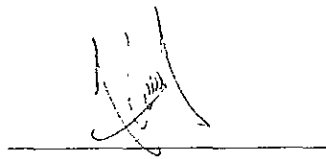
Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 111, Conjunto. E, Depto. de Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor:


Bernardo Lucas Florentino

Sustentante:


Mario Iván López Estrada

AGRADECIMIENTOS.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Química por darme una excelente formación profesional, por la cual siempre estaré orgulloso de pertenecer a ella.
- Al M. en C. Bernardo Lucas Florentino por sus enseñanzas, su apoyo y la confianza que me brindo durante la realización de está tesis.
- A la M. en C. Angela Sotelo por sus enseñanzas y el apoyo que me dio durante el desarrollo de este trabajo.
- A la Dirección General del Personal Académico (DGAPA) por la beca que me otorgaron para la realización de este tema.

DEDICATORIAS

A Dios por guiarme en mis metas y orientarme hacia el camino del bien y la felicidad.

*A mi mamá por su cariño, apoyo en todo momento y la confianza, por la formación y los valores que obtuve de su parte, los buenos consejos que me da, por que juntos hemos alcanzado una de mis grandes metas y por que siempre contaré con su amor
Te quiero mucho mamá.*

A mi papá por su cariño, su apoyo incondicional, la gran confianza que me tiene y por que me ha enseñado grandes cosas de la vida, así como el gran amor que me ha dado. Gracias por todo.

A mi hermana por su cariño, su compañía, el apoyo que siempre he tenido y que al igual siempre tendrás de mi parte y por la gran amistad que tenemos.

A Ana por su cariño, su apoyo en cualquier situación, por ayudarme y alientarme a salir adelante en todo momento, por que juntos hemos vivido grandes momentos y sobre todo gracias por estar siempre a mi lado. Siempre contarás conmigo.

A su familia por su cariño, confianza y hospitalidad.

A mi abuelita y tíos que siempre me han apoyado a lo largo de mi vida, gracias por darme aliento y cariño en todo momento.

A Hugo S. (q.e.p.d), por su gran amistad, su apoyo y consejos y por enseñarme a disfrutar cada momento de la vida. Gracias amigo

A Lety por su amistad y su apoyo durante la elaboración de este trabajo.

A mis amigos (Tripa, Coreano, Supermuñeco, Chama, Pancho, Mildhouse, Gila) por todos los momentos que pasamos en nuestra Universidad, gracias a cada uno por apoyarme y aconsejarme cuando lo necesite. Por el arduo entrenamiento al que fuimos sometidos.

A mis compañeros de generación por todas los momentos que convivimos y gracias por reconocer mi esfuerzo al final de la carrera, otorgandome el tan anhelado premio del que fuí acreedor, gracias al apoyo de todos

A mis compañeros de laboratorio y a doña Vicky por su ayuda y la gran convivencia que se siente en el laboratorio.

*"Nuestros deseos no son sino indicios de nuestras aptitudes
innatas y nos anuncian lo que somos capaces de lograr"*

(Goethe)

INDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Objetivo	
2.1. General	3
2.2. Paricular	3
3. Generalidades	
3.1. Historia	4
3.2. Alimentos "no tradicionales"	5
3.3. Clasificación botánica de las almendras analizadas	7
3.3.1. Capulín (<i>Prunus serotina</i>)	7
3.3.2. Mamey (<i>Colacarpum sapota</i>)	10
3.3.3. Napahuite (<i>Trichila hirta</i>)	11
3.4. Análisis proximal de las tres almendras	12
3.5. Factores tóxicos y antinutricionales	12
3.5.1. Inhibidores de tripsina	13
3.5.2. Fitoheماغلutininas o lectinas	15
3.5.3. Alcaloides	16
3.5.4. Glucósidos cianogénicos	18
3.5.5. Fitatos	19
3.5.6. Oxalatos	21
3.5.7. Saponinas	22
3.5.8. Taninos	23
3.6. Digestibilidad "in vitro"	25
4. Metodología	28
4.1. Obtención de la harina de almendra desengrasada	29
4.1.1. Capulín	29
4.1.2. Mamey	29
4.1.3. Napahuite	29
4.2. Almacenamiento de la harina desengrasada	30
4.3. Caracterización toxicológica de las muestras	30
4.3.1. Inhibidores de tripsina	30
4.3.2. Fitoheماغلutininas	34
4.3.3. Alcaloides	39
4.3.4. Glucósidos cianogénicos	43
4.3.5. Fitatos	50
4.3.6. Oxalatos	52
4.3.7. Saponinas	56
4.3.8. Taninos	62

4.4. Tratamiento térmico	66
4.4.1. Tratamiento térmico a la almendra de capulín	67
4.4.2. <i>Tratamiento térmico a la almendra de mamey</i>	67
4.5. Digestibilidad "in vitro"	68
5. Resultados y Discusión	
5.1. Factores termolábiles	
5.1.1. Inhibidores de tripsina	70
5.1.2. Lectinas	73
5.2. Factores termoestables	
5.2.1. Alcaloides	75
5.2.2. Glucósidos cianogénicos	75
5.2.3. Fitatos	77
5.2.4. Oxalatos	79
5.2.5. Saponinas	81
5.2.6. Taninos	83
5.3. Digestibilidad "in vitro"	84
6. Conclusiones	
6.1. Almendra de capulín	85
6.2. Almendra de mamey	85
6.3. Almendra de napahuite	86
7. Bibliografía	87

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país no está ajeno a la deficiencia de alimentos, en especial los de buena calidad nutritiva; ya que hay suficiente información que pone de manifiesto el alto grado de desnutrición en una gran parte de la población, en especial, en las zonas marginadas tanto urbanas como rurales. Sabemos que la dieta del mexicano consiste de 70% de productos vegetales y el restante 30% de productos de origen animal. (Comisión 1990)

En un principio se consideraba que la mayor parte de la desnutrición era causada por la carencia de proteína; sin embargo, en la actualidad existen pruebas suficientes que demuestran que otro factor muy importante es la deficiencia energética. Estos dos factores funcionan generalmente en forma simultánea, y se ha observado que en muchos casos de *desnutrición infantil*, ésta se presenta por una deficiente cantidad de alimentos ingerido o por el consumo de una cantidad adecuada pero de baja densidad calórica. (Comisión 1990, Murphy 1994)

Aquí es donde cobra vital importancia el estudio sistemático de las especies vegetales poco estudiadas, ya que muchas de ellas pueden tener un gran potencial alimenticio. Lo anterior queda de manifiesto en el profundo *desconocimiento de las condiciones reales de alimentación de ciertas comunidades rurales aisladas*, ya que se desconoce hasta lo más básico, como son los recursos naturales con que cuentan para satisfacer sus necesidades primarias, estas regiones indígenas. En estos entornos rurales, se corre el riesgo de la implantación de una modernidad mal planeada, que pone en peligro muchas especies vegetales que hasta el momento no han sido valoradas o en el mejor de los casos han sido pobremente estudiadas en el aspecto nutritivo y fitoquímico.

La deficiencia en el suministro de alimentos en estas zonas marginales, exige soluciones urgentes de preferencia a corto plazo, siendo una de ellas el estudio sistemático y multidisciplinario de aquellos alimentos "no tradicionales", para su valoración y propuesta en alimentación animal, o en el mejor de los casos

directamente como complemento en la alimentación humana. Sobre estas plantas, algunos autores las denominan como de cultivo incipiente o protegidas, ya que en los lugares donde se reproducen, los habitantes solo las protegen hasta su recolección y aprovechamiento, sin darles un cuidado especial

En el departamento de Farmacia, hace ya varios años se inició una línea de investigación, en la cual se han estudiado tanto especies vegetales silvestres como semi-silvestres con potencial alimenticio. Además, tenemos conocimiento que las nueces y almendras de algunas especies vegetales tradicionales, se comercializan por ser fuente de proteína y grasa, como son la nuez de Brasil, piñón, castaña, entre otras. Dentro de este tipo de material biológico, hemos realizado el estudio bromatológico de varias almendras, destacando por su contenido de grasa (46 a 48%) y proteína (12 a 33%), las almendras de mamey, capulín y napahuite, entre otras. (Castillo 1997)

Las tres almendras antes mencionadas, mostraron una composición de ácidos grasos similar a los aceites vegetales comestibles, con excepción de la grasa de capulín, mientras que para la fracción proteínica, su índice de aminoácidos esenciales (IAE) fue de 69, 59 y 53 por ciento para mamey, napahuite y capulín respectivamente, indicándonos una calidad nutritiva adecuada para proteínas de origen vegetal, si consideramos que al huevo se le asigna un IAE = 100. Entre otros resultados interesantes, tenemos que estas almendras son fuente de vitamina A y E, incluso la almendra de mamey es buena fuente de vitamina C. (Castillo 1997)

No obstante, que los primeros resultados químicos obtenidos de estas almendras indican que potencialmente pueden ser fuente de macro y micronutrientes, debido a que las podemos considerar como alimentos no tradicionales, será necesario evaluarlas desde el punto de vista toxicológico. Por lo tanto, será necesario determinar la presencia de factores tóxicos y antinutricionales en dicho material, ya que con esta información, se estará en la posibilidad de hacer una propuesta más sustentable para su utilización.

2. OBJETIVO

2.1 General.

- Determinar en las almendras de mamey (*Calocarpum sapota*), capulín (*Prunus serotina*) y napahuite (*Trichilia hirta*) el contenido de los factores tóxicos y antinutricionales naturales que con mayor frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal y evaluar para la fracción proteínica su digestibilidad "in vitro".

2.2 Particular.

- Determinar la cantidad de factores tóxicos y/o antinutricionales termolabiles, en caso de encontrar la presencia de estos realizar un tratamiento térmico y evaluar su efectividad
- Determinar la cantidad de factores tóxicos y antinutricionales termoestables para evaluar la posible detoxificación y utilización de las almendras como alimento.
- Determinar la digestibilidad "in vitro" de las almendras antes y después del tratamiento térmico

3. GENERALIDADES

3.1 Historia.

La humanidad desde sus inicios ha sustentado una lucha continua por el abastecimiento de sus necesidades, siendo una de ellas, la alimentación, actividad que seguirá siendo una de las principales del hombre. Definitivamente, los alimentos fueron esenciales en la supervivencia de los organismos, vivos junto con el agua y el oxígeno, y nuestros ancestros aprendieron a preparar sus alimentos desde tiempos prehistóricos. En realidad el conocimiento sistemático de sustancias dañinas en los alimentos, se inicio aproximadamente hace 200 años y apenas hace algunas décadas, se ha establecido la toxicología de los alimentos como disciplina de enseñanza universitaria. (Leopold et all 1974, Liener 1980)

El hombre primitivo disponía en un principio de una restringida variedad de alimentos, a causa de la toxicidad de varios de los recursos naturales en especial *del reino vegetal*. Se sabe que muchas plantas tienen la capacidad de sintetizar una amplia variedad de sustancias químicas, que ejercen efecto dañino cuando estas son ingeridas por un organismo extraño. En base a lo anterior el hombre no requirió de mucha experiencia para poder entender y evitar el consumo de aquellas plantas que de manera inmediata le producían una reacción desagradable sensorialmente y que en muchos de los casos podían ser dañinas poniendo en riesgo su salud y hasta su vida. (Castillo 1997, Leopold et all 1974)

Nuestros ancestros seleccionaron sus víveres en base al sistema empírico de "ensayo y error", que definitivamente fue muy drástico, y solo pudo evidenciar el efecto dañino a corto plazo o sea su toxicidad aguda, ya que en realidad las plantas y animales que ha servido históricamente como alimentos para el hombre, no fueron diseñadas por la naturaleza para tal propósito, con excepción de la leche materna. Sin embargo, el valor de, "inocuos" conferido a los alimentos tradicionales, es relativamente aparente, ya que un alimento es un complejo agregado químico, formado de elementos sencillos y sales inorgánicas, hasta macromoléculas. Así, por ejemplo, la papa que es un alimento muy común, contiene aproximadamente 150 compuestos químicos, dentro de los que tenemos.

solanina, chaconina, ácido oxálico, arsénico, taninos, nitratos y otros, más, sin reconocida acción nutritiva y sí con una franca actividad farmacológica. (Ferrando 1980, Liener 1980)

Se menciona que no fue sino hasta hace aproximadamente 20,000 años que el hombre utilizó el fuego para el cocimiento de algunos alimentos. Se considera que después del conocimiento del fuego, se amplió significativamente la disponibilidad de alimentos principalmente de origen vegetal, lo anterior se refiere a que hay la teoría de que las plantas a diferencia de los animales no pueden huir de sus depredadores y ellas han evolucionado y permanecido debido a que pueden biosintetizar metabolitos secundarios que no son vitales para ellas, pero que tienen un carácter tóxico hacia organismos extraños que las ingieren. Se sugiere que un gran avance evolutivo del hombre fue el uso del fuego para cocinar sus alimentos, siendo lo anterior más significativo para los alimentos vegetales; ya que el cocimiento de éstos puede producir la destrucción o disminución sustancial de ciertos tóxicos naturales, además de hacerlos en ocasiones más palatables. (Leopold et al 1974, Liener 1980)

Sin embargo, en los últimos siglos la tendencia de selección de plantas para el suministro de víveres se ha acelerado y por consiguiente la variedad de alimentos ha disminuido a tal nivel, que en la actualidad el género humano depende de aproximadamente 20 especies vegetales que proporcionan el 90% de los suministros alimenticios. Con la domesticación de las plantas y animales seleccionadas, se ha llegado al extremo que estas especies no pueden sobrevivir sin el cuidado del hombre, pero a su vez él las necesita para poder subsistir; o sea, que el hombre y las especies domesticadas han quedado íntimamente relacionadas en la que algunos investigadores denominan como "evolución adaptativa conjunta".

3.2 Alimentos "no tradicionales".

En varios países en vías de desarrollo como el nuestro, no obstante el incremento en la producción y las importaciones de alimentos, se sigue

presentando una deficiencia de ellos, en especial los de buena calidad nutritiva, manifestándose una mala nutrición, la cual se pone en mayor evidencia en las zonas marginales rurales. Aunado a lo anterior, en estas comunidades indígenas, sus patrones alimenticios se están transformando hacia el consumo de alimentos de menor valor nutritivo, que les produce un desequilibrio en su dieta, presentándose una deficiencia tanto energética como proteínica. (FAO 1993, Ferrando 1980)

Un hecho que ha modificado profundamente los hábitos alimenticios en estas zonas rurales marginales, es la presión externa ejercida por siglos, por los patrones o modelos agropecuarios traídos del viejo continente, que con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema de monocultivo, se talan indiscriminadamente bosques silvestres o semi-silvestres que ponen en peligro el potencial germoplásmico, que algunos autores denominan como "Erosión genética". Lo anterior cobra vital importancia desde el punto de vista de la biodiversidad; ya que nuestro continente, tienen una enorme riqueza en lo que a especies vegetales y animales se refiere. Además, nuestro país se localiza en trópico de Cáncer y Capricornio, en el denominado "Cinturón Genético", del cual Harlan, identificó los centros genéticos ancestrales de origen agrícola. (Bermejo et al 1992, Castillo 1997).

Precisamente en Mesoamérica, el cambio y marginación de plantas alimenticias ha sido un proceso relativamente largo y difícil, y los cambios drásticos y violentos que trajo la conquista española, afectaron con más rapidez a las comunidades que tuvieron mayor contacto con la población dominante. Así, las comunidades indígenas más aisladas, han mantenido sus cultivos tradicionales y conservan sus técnicas de manejo y utilización de aquellos alimentos que se denominan como "no tradicionales". Esta información empírica se ha acumulado a través de los siglos, en busca de satisfacer sus necesidades con las variedades de especies vegetales y animales que les rodea, tratando de aprovechar los recursos naturales en forma integral, lo cual es congruente con la denominada "Agricultura Sustentable". (Esquinas 1983, Trápaga et al 1994)

A principios de este siglo se descubrió que algunas semillas de alimentos, al incorporarse de forma cruda a dietas experimentales se presentaban crecimientos anormales debido a la presencia de sustancias que se consideran tóxicas tanto para el hombre como para los animales. (Liener 1980)

3.3 Clasificación botánica de las almendras analizadas.

3.3.1 Capulín (*Prunus serotina*)

Nombre vulgar: capulín, capulín blanco, cerezo, black cherry, wild cherry cusabi, jeco.

Familia: Rosaceae

(Sinonimia botánica: *Prunus capuli*).

Arbol de 10 a 15 metros; hojas lanceoladas aserradas, flores blancas en amentos; fruto globoso de 1 cm, negro o rojizo, comestible con una semilla. Habita en climas cálidos, semiáridos, semisecos y templados. Se cultiva en las casas y crece de manera silvestre asociado a la selva tropical caducifolia y subcaducifolia, matorral xerófilo, bosques montaña, de encino y pino

Es una especie usada en el centro del país desde tiempos antiguos, por ejemplo en Agua Morelos, Hidalgo, Estado de México y el Distrito Federal, donde es recomendada para el alivio de la tos, gripa y el *mal de orín*, mediante el uso del cocimiento del fruto como agua de uso; también en otras regiones es empleada la corteza y las hojas para los casos de diarrea, catarro y fiebre. Resulta igualmente útil contra afecciones como disentería e insomnio y diversos grupos indígenas del centro del país lo usan para curar el mal conocido como *empacho*. Otra aplicación generalizada es su empleo en *limpias*, usando las ramas frescas en manojo, ya sea para pasarlas por el cuerpo o bien en baños. Cabe mencionar que, entre las creencias populares relacionadas con esta planta, está la de la protección que brindan sus ramas para alejar *males*.

Las zonas de cultivo son Hidalgo; San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Colima, Nayarit; Valle de México; Guanajuato y en lugares fríos y templados. (Martinez 1979)

Desde Venezuela hasta Perú podemos encontrar alrededor de las grandes villas árboles de capulín. Es un árbol fácilmente identificable y representa para los Andes lo que la palma representa para las zonas costeras. A pesar de que se localiza en los Andes se piensa que puede ser de origen mexicano, ya que su nombre proviene de la palabra azteca capuli.

El capulín es de la familia de la cereza negra y tiene un sabor y apariencia similar. Sin embargo se transporta como si fuera uva y su sabor se relaciona con el de la ciruela. Estos frutos son redondos, brillantes, púrpuras o negras, Su pulpa es verde, carnosa y jugosa. La piel es delgada, pero lo suficientemente fuerte para evitar que el fruto se rompa. Aunque comúnmente se consume fresca, también se le ha industrializado como vino y mermelada.

Las áreas de cultivo van desde los Andes hasta latitudes tropicales, estos árboles crecen en áreas templadas (2200 – 3100 m de altitud, a una temperatura de 10° a 22°C). También se ha cultivado en zonas subtropicales y calientes.

Algunas nuevas variedades fueron introducidas en Nueva Zelanda, donde no hay o se presentan con poca frecuencia heladas.

El hueso es grande con respecto al tamaño del fruto. También debe considerarse que la piel tiene un sabor amargo. Sin embargo, hay variedades que pueden incluso competir con las mejores cerezas.

Su propagación como cultivo se debe al aprovechamiento de la semilla y cualquier mejoramiento del árbol se ha logrado mediante injertos y germinación. Los árboles son extremadamente vigorosos. Las flores y frutos aparecen al tercer e incluso segundo año de vida.

Sus raíces alcanzan una longitud de 10m y los requerimientos del suelo no son muchos, puede crecer en cualquier suelo lo suficientemente fértil. Solo es susceptible al hongo negro y no se desarrolla en zonas húmedas.

Otro uso que se le da es en la reforestación ya que es una especie de rápido crecimiento y además se desarrolla en suelos pobres. Después de cinco

años de plantado, su madera puede usarse como carbón de madera, postes y para leña. Después de 6-8 años puede aserrarse su madera para fabricar guitarras, muebles, ataúdes y otros productos. Sus ramas jóvenes son fuertes y flexibles, como bastones de mimbre, y los restos son usados para fabricar canastas. Al capulín es frecuentemente utilizado como un sistema agroforestal. Sus raíces son profundas y ayudan a prevenir la erosión y evita que el suelo se seque se ha interplantado con cultivos de maíz, alfalfa y papas. Les proporciona protección del viento y sirve como una barrera biológica ya que los pájaros consumen sus frutos antes de consumir los cultivos. Sin embargo, hay excelentes posibilidades para seleccionar los frutos más carnosos y de mejor sabor. Con una propagación vegetativa, selección horticultural de variedades puede incrementar su población en América Latina donde su siembra es pobre.

Algunos árboles producen frutos carnosos y grandes, estas son las variedades que se deben seleccionar y propagar por capullos o injertos.

Las diferencias de sabor son muy importantes, hay algunos árboles que producen frutos de sabor amargo hasta desagradable y algunos otros frutos de sabor dulce, placentero y delicioso. Este tipo es comparable con las cerezas, por lo que se debe ser seleccionado y propagado.

Aunque es un árbol conocido en las Américas y los mejores frutos se encuentran en los Andes, se le debe dar mayor difusión en los países de América Latina. En Quito se han plantado árboles en zonas urbanas y sus frutos son consumidos por los escolares.

También ha empezado a cultivarse fuera de América, por ejemplo en Europa donde las cerezas no se cultivan. En Asia menor, en el norte de la India y en otras regiones de clima similar puede tener un gran valor.

Aunque no se puede comparar con el cultivo de la cereza producida por selección de generaciones y propagación vegetativa el capulín es un alimento de buena calidad y tiene mucho potencial de mejoramiento.(Bostid 1989)

3.3.2 Mamey (*Colacarpum sapota*).

Nombre vulgar: mamey, mamey colorado, mamey sapote o sapote.

Familia: Sapotaceae

(Sinonimia botánica *Colacarpum mammosum*, *Achraderpha mammosa*, *Pouteria sapota*, *Pouteria mammosa*)

Pertenece a la familia de las sapotaceas que engloba cerca de 35 géneros y unas 700 a 800 especies de árboles perennifolios y algunas plantas trepadoras.

Una de las características principales de esta especie, es la exudación de latex Compuesto de color blanco y pegajoso. (Escalante 1989)

Árbol frutal, de 10 a 30 m. de hojas ovadas, de 10 a 30 cm., con nervaduras paralelas; cuyo tronco llega a alcanzar un diámetro de 80 a 100 cm.; flores blancas de 9 a 10mm. De 5 lóbulos; fruto ovoide de 8 a 20 com. Con el epicarpio pardo y áspero y la pulpa roja, dulce y comestible. (Escalante 1989, Martínez 1979)

Es un árbol que crece espontáneamente en diferentes regiones del país, puesto que se ha propagado de manera natural por medio de semillas. Se considera originario de las selvas del sur de México y América Central, debido a la cantidad de tipos criollos originarios de semillas de esta región.

Actualmente se encuentra distribuido en Centroamérica, las Antillas, Sudamérica, Filipinas, Cuba y E.U.A.. El área más probable de dispersión original se ubica en Guatemala, Honduras, Costa Rica y el Sur de México, que comprende el Sur de Veracruz, Tabasco y el Norte y Oriente de Chiapas.

El sabor del fruto, cosechado en su estado de madurez ha favorecido para que se encuentre prosperando fuera de su hábitat original, dando como resultado el intercambio de especies. Por ello, es común encontrar plantaciones de árboles de mamey aisladas en diferentes regiones como son: Colombia, Ecuador, E.U.A. (California y Florida), Filipinas, Jamaica y Venezuela.

La época de cosecha de la fruta comprende de los meses de abril a julio y generalmente toda se vende en forma natural en los mercados internos. A pesar de que no se considera una fruta de estación, el período donde se obtiene la mayor producción es de abril a mayo.

Su comercialización se ha realizado por los productos alternos a su fruto como es su madera, latex y por la extracción del aceite de su semilla.

En general la pulpa se consume de manera natural en las regiones productoras. Sin embargo en algunas regiones se le industrializa en forma rústica para preparar dulces y conservas. En –Centroamérica se mezcla con cacao para la elaboración de chocolate. (Campbell 1967, Escalante 1989)

3.3.3 Napahuite (*Trichilia hirta*).

Nombre vulgar: Napahuite, Cabo de hacha

Familia: Meliáceas.

(Sinonimia batánica: *Trichilia havenensis*.)

Arbusto o arbolillo que se cosecha en lugares de clima cálido del país. Alcanza de 3 a 5 metros de altura. Sus hojas pinadas, compuestas de 7 a 23 hojuelas lanceolado-ovaladas o elípticas de 5 a 8 cm. Las flores verdoso-amarillentas se producen en racimos axilares, son pequeñas con cáliz de 4 a 5 piezas; los pétalos de unos 4 mm y con 8 ó 10 estambres formando un tubo.

El fruto es una cápsula como de 2 centímetros de diámetro de superficie rugosa, que se abre en 2 ó 3 valvas descubriendo 3 semillas globosas, de unos 6mm de diámetro y de color amarillo moreno, envueltas en un arilo carnoso y oleaginoso de color naranjado oscuro.

Tanto el arilo que se acaba de mencionar, como la almendra de la semilla, tienen aproximadamente 48.52% de aceite, cuya cantidad varía naturalmente según el estado de madurez del fruto, la época de recolección, etc.

La madera del árbol es de color rojizo, es fuerte y pesada.

A partir de la semilla se extraen compuestos llamados protolimonoides los cuales tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de gusanos polívoros lepidópteros *Peridoma saucia* y *spodoptera litura* (Martínez 1979)

3.4 Análisis proximal de las tres almendras.

De un trabajo previo, realizado con el mismo lote examinado en el presente trabajo, se obtuvieron los siguientes resultados de análisis proximal en las tres almendras. (Castillo 1997)

Tabla No. 1.

Determinación (% en peso)	Mamey		Capulín		Napahuite	
	Base seca	Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca	Base húmeda
Humedad	—	45.36	—	4.54	—	3.28
Sólidos totales	100	54.36	100	95.46	100	96.72
Proteína*	13.05	7.13	33.18	31.67	12.03	11.64
Grasa	48.29	26.38	46.30	44.22	49.48	47.86
Cenizas	2.93	1.60	2.72	2.60	2.37	2.29
Fibra	3.98	2.18	2.80	2.67	16.97	16.41
Carbohidratos	31.74	17.34	15	14.32	19.15	18.52

* Para determinar el contenido de proteína se utilizó el factor de 6.25

** La determinación del contenido de grasa se realizó con hexano (grado R A).

De esta tabla se observa una alta cantidad de proteína en el capulín y gran cantidad de grasa en las tres muestras.

3.5 Factores tóxicos y antinutricionales.

Por su modo de acción, las sustancias nocivas de los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- a) Las sustancias antinutritivas. El efecto tóxico de las cuales se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrientes implicados, a la larga determinan la aparición de una patología particular. Pertenecen, por ejemplo a este grupo las sustancias que impiden el aprovechamiento del yodo

provocando bocio, que actúan aumentando las necesidades de yodo del organismo y los inhibidores de enzimas digestivas, como el factor antitripsínico de las leguminosas.

Los estudios de degradación *in vitro* bajo la acción de enzimas digestivas son indispensables para definir la cualidad del alimento y para verificar la ausencia o presencia de sustancias antinutricionales.

Los efectos nocivos de las sustancias antinutricionales pueden pasar desapercibidos en el caso de una copiosa alimentación. En el caso contrario, la compensación del nutriente deficitario puede mejorar rápidamente el estado general. Cuando la carencia crónica determina un estado grave del organismo resulta imposible restablecer la actividad normal por simple administración del elemento en defecto

- b) Los tóxicos de los alimentos, de efectos indeseables, que no pueden compensarse por aporte suplementario de nutrientes. Son compuestos que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo. 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. (Derache 1990)

Los factores tóxicos ó antinutricionales más comunes en alimentos de origen vegetal y los cuales serán estudiados son:

3.5.1 Inhibidores de tripsina.

Los inhibidores de proteasas son también proteínas que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Los inhibidores de tripsina son probablemente los más distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas. Actúan inhibiendo a la tripsina la cual es una enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de nutrimentos de los humanos y animales monogástricos.

Estos inhibidores son considerados factores antitripsínicos que han sido aislados en una gran variedad de fuentes naturales vegetales. Los inhibidores de

proteasas son proteínas termolábiles que se encuentran en granos y semillas, cuyo consumo reduce la digestibilidad y el aprovechamiento de proteínas que participan en el proceso digestivo. Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Bowman-Birk de la soya; el primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos de un peso molecular de 21,500 con dos enlaces disulfuro, de los cuales uno de ellos es fundamental para su actividad; el segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7,975, éste contiene ocho enlaces de disulfuro, se asocia reversiblemente y forma una mezcla de monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero. ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumento de la secreción de bilis y jugo pancreático. (Liener 1975, Lidner 1980)

Principales efectos nocivos de los inhibidores de tripsina:

- Inhibe el crecimiento
- Reduce la digestibilidad de la proteína
- Incrementa los requerimientos de aminoácidos azufrados
- Hipertrofia del páncreas
- Estimula la secreción de enzimas pancreáticas
- Estimula la actividad de la vesícula biliar
- Reduce la energía metabolizable
- Inhibe la proteólisis

En cuanto al mecanismo de inhibición existen varias teorías entre los investigadores entre las cuales se menciona que.

- Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman fuertes complejos con las enzimas que ellos inhiben.
- La enzima e inhibidor experimentan un tipo de interacción enzima-sustrato.
- Los inhibidores son resistentes a la proteólisis, aunque en la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos.

La mayoría de los inhibidores de tripsina pueden ser destruidas mediante un tratamiento térmico adecuado, con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de las proteínas (Feeney et al 1969 Lindner 1980)

3.5.2 Fitohemaglutininas o lectinas

En muchas semillas principalmente de leguminosas existen sustancias de origen protéico, llamadas fitohemaglutininas o lectinas por la capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos humanos y de otras especies animales debido a su especificidad para glucoproteínas de los sitios receptores en la superficie celular.

La primera descripción de una lectina fue presentada por Stillmark que en 1889 estudió la semilla de ricino y atribuyó su toxicidad a una proteína que llamó ricina. Landstiner en 1908 encontró en las leguminosas el grupo de lectinas más importante, desde el punto de vista nutricional, observaron que los extractos producían aglutinación pero en otros no se detectaba acción toxicológica. (Liener 1980)

Posteriormente, Summer aisló de una leguminosa una globulina que llamó concavanina A, la cual tiene actividad aglutinante. La hemaglutinina de soya fue aislada por Liener en 1953. (Jaffé 1968)

Para que una lectina presente un efecto dañino sobre el organismo es necesario que resista el proceso de digestión.

Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto tóxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Se supone que la lectina interacciona con grupos receptores situados en la superficie de las células que conforman la mucosa gástrica, de una manera semejante como se combinan con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de nutrientes. Se ha observado en estudios anteriores que cuando animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas con elevado contenido de lectinas presentan diarreas, daño hepático, absorción reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso y en algunos casos la muerte. (Jaffé 1973, Liener 1975)

Las fitohemaglutininas como la mayoría de las proteínas, son termolábiles y generalmente su efecto tóxico se puede eliminar o disminuir notablemente por medio de un tratamiento térmico adecuado, presentándose así, un incremento en cuanto al valor nutritivo de las leguminosas. (Hughes et al 1973)

3.5.3 Alcaloides

Los alcaloides son una clase heterogénea de productos naturales de las plantas. La palabra alcaloide es derivada del término "alcali", usado originalmente para describir un grupo de bases de origen botánico, lo cual nos indica que estas sustancias se comportan como alcali químico. (Hughes et al 1973)

Los alcaloides contienen nitrógeno en su molécula, frecuentemente en un anillo heterocíclico, son de naturaleza básica. Generalmente se encuentran como sales de ácidos orgánicos y la mayoría poseen importantes propiedades farmacológicas. La mayoría contienen oxígeno y son sólidos cristalinos. Todos son ópticamente activos. En general son insolubles en agua como base y solubles en disolventes orgánicos; sus sales sí son solubles en agua; en estas propiedades se fundan los procedimientos que siguen para su extracción de las plantas, así como para su purificación. Algunos compuestos han sido considerados como alcaloides, pero son considerados como excepciones como: la colchicina y ricinina ya que no son básicos o la efedrina, muscarina y mescalina que no son compuestos heterocíclicos nitrogenados. (Goodwin et al 1974)

Los alcaloides con anillos heterocíclicos son llamados Alcaloides verdaderos y son clasificados de acuerdo al sistema anular presente en la molécula. Además poseen las siguientes características:

- El átomo de nitrógeno es parte del sistema heterocíclico.
- El compuesto tiene una estructura molecular compleja.
- El compuesto posee importante actividad farmacológica.
- El compuesto pertenece al reino vegetal.

Aquellos que no tienen anillos heterocíclicos son conocidos como Protoalcaloides y son aminas. Los Protoalcaloides y los Alcaloides verdaderos son generalmente derivados directamente de aminoácidos. (Goodwin et al 1974, Pelletier 1982)

El nitrógeno de los alcaloides puede ser primario, secundario, terciario o cuaternario, o puede estar presente como un óxido de amina.

Los alcaloides se encuentran principalmente en las Centrospermae, Magnoliales, Renunculales, Papaveraceae, Leguminosae, Papulioaceae y Rutaceae. Las

Monocotiledóneas son generalmente pobres en alcaloides a excepción de las Liliiflorae y Graminae. Los alcaloides tienden a acumularse en cuatro tipos de tejido: tejido activamente creciendo, células epidérmicas e hipodérmicas, cubiertas vasculares y en vasos.

Algunos alcaloides se relacionan como precursores de aminoácidos

La amplia distribución de alcaloides en hojas y raíces indica una función de estos compuestos en el metabolismo general de plantas. Aparte del efecto biológico de protección contra depredadores, otras funciones han sido propuestas:

- 1) Los alcaloides son productos finales del metabolismo del nitrógeno así como son la urea y ácido úrico en animales
- 2) Es una reserva de nitrógeno que es utilizada bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.
- 3) Actúan como reguladores del crecimiento, posiblemente como inhibidores de la germinación, ya que son agentes quelantes.
- 4) Ayudan a mantener el balance iónico. (Goodwin et al 1974, Hughes et al 1973)

Los alcaloides y sus preparados constituyen una importante proporción de las sustancias empleadas frecuentemente en la moderna terapéutica. Como medicamentos se caracterizan por su gran potencia; una ligera disminución en la proporción de alcaloides en un preparado puede causar una importante reducción en su acción fisiológica y por otra parte, un ligero exceso puede ocasionar efectos tóxicos

Las cantidades de alcaloides que se hallan presentes varían considerablemente en las muestras debido a:

- 1) Edad de la planta en el momento de la recolección.
- 2) Estación del año en que se efectúa la colecta, clima y suelo en que se desarrolla la planta.
- 3) Tipo de variedad de la misma especie. (Jenkins et al 1951)

3.5.4 Glucósidos cianogénicos.

El ácido cianhídrico en cantidades traza se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, se presenta principalmente en forma de glucósidos cianogénicos. Se han encontrado en relativamente altas concentraciones en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendras de frutas. Estos glucósidos pueden contener en su molécula un monosacárido generalmente glucosa, o bien un disacárido como la gentobiosa unidas a una cianhidrina.

La amigdalina fue el primer glucósido cianogénico identificado en las almendras amargas, presentándose también en otras clases de semillas. La durrina se encuentra en el sorgo y algunos pastos, en la linaza podemos encontrar lotastraulina y linamarina, esta última se presenta en diferentes variedades de leguminosas. Otros alimentos que contienen glucósidos cianogénicos son el frijol de lima, la yuca, el lupino, la casava y la tapioca. (Liener 1980)

Los glucósidos cianogénicos no son tóxicos por sí mismos, sino lo son por el ácido cianhídrico liberado; la forma como se libera el ácido cianhídrico de estos glucósidos es por vía enzimática, llegándose a presentar autólisis de estos compuestos, solo cuando hay un daño físico en la planta. La liberación espontánea del ácido cianhídrico en la planta depende de la presencia de la enzima específica, β -glucosidasa y agua. Las enzimas se encuentran extracelulares y actúan solamente después de la ruptura de los tejidos de la semilla. El rango de toxicidad permitida para los glucósidos cianogénicos es de 10 a 20 mg de HCN/100g de muestra). (Contreras et al 1972)

La dosis letal media de ácido cianhídrico para un individuo cuando es ingerida por vía oral se ha estimado entre 0.5-3.5mg/kg de peso corporal. Con esta dosis se presentan síntomas de adormecimiento periférico con ligeros mareos, seguidos por confusión mental, cianosis, temblores, convulsiones, coma y finalmente la muerte. El ácido cianhídrico es un potente inhibidor del sistema respiratorio a nivel celular, ya que su sitio de acción es sobre la citocromo oxidasa, la cual es el catalizador respiratorio terminal de los organismos aerobios. En caso de dosis subletales se puede presentar dolor de cabeza, sensación de opresión en la garganta, palpitaciones y debilidad muscular. En estos casos el organismo es

capaz de llevar a cabo un proceso de destoxificación, ya que existe una sulfotransferasa (rodonasa) que cataliza la reacción del ácido cianhídrico con el tiosulfato formando sulfito y tiocianato que es eliminado por orina. (Conn 1980, Haborne et all 1971)

3.5.5 Fitatos.

Químicamente el ácido fítico es hexafosfato de inositol, es un constituyente de los cereales. Es conocido por que disminuye la biodisponibilidad del zinc y otros elementos traza necesarios para humanos y animales monogástricos. (Wolfgang et all 1983)

Puede ser desfosforilado en cierto grado hasta inositol en el lumen intestinal por la enzima fitasa, además se encuentra en abundancia en el trigo en el centeno y la cebada, la fitasa de centeno es más activa. Está fitasa es destruida por el calor. (FAO 1980)

Este ácido esta ampliamente distribuido en la naturaleza. En las plantas particularmente en los cereales y las leguminosas, localizándose frecuentemente en el pericarpio, es la principal forma de almacenamiento de fósforo. Por tratamiento con ácido y calor o por la acción de la enzima fitasa presentes en los alimentos ricos en ácido fítico, este se hidroliza, liberando inositol y ácido fosfórico

El ácido fítico y sus sales, fitatos, son componentes comunes de los tejidos vegetales relacionados con productos alimenticios.

Seis grupos reactivos de fosfato presentes en la molécula del ácido fítico hacen de este compuesto un agente fuertemente quelante, en el que 8 de los 12 protones disociables del fitato están disponibles para atrapar metales que se une a minerales tales como Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} y Fe^{+2} . Bajo las condiciones de pH en el interior del conducto gastrointestinal se forma complejos insolubles de metal-fitato, los cuales hacen que algunos minerales como el Calcio, Fierro, Zinc y otros metales bivalentes no estén disponibles para su absorción en las paredes del intestino de animales monogástricos y seres humanos. Además, forma complejos con proteínas impidiendo la absorcion de estas.

La absorción de calcio esta influenciada no solo por el fitato sino también por la vitamina D, lípidos, y otros factores. Si la vitamina D es limitante en la dieta, la absorción de calcio será menos eficiente y el efecto del fitato será más pronunciado. Un gramo de ácido fítico secuestra irreversiblemente un gramo de calcio.

La absorción de hierro depende de la abundancia de cuerpos férricos, de la cantidad y forma química ingerida de hierro, ácido ascórbico y otros factores interrelacionados. El fitato de hierro es menos soluble en ácido diluido, por lo que es insoluble en el estomago, pero empieza a disociarse al pH del duodeno y forma hidróxido férrico. El fitato disminuye la habilidad del hierro por la disminución del acomplejamiento del hierro con gastroferrina en el estomago.

El efecto del fitato en la disminución de la disponibilidad de los elementos antes mencionados se debe a que forma sales muy insolubles de fitato a valores de pH encontrados en la parte superior del intestino delgado. (Oberleas 1975)

El ácido fítico es dos veces desmineralizante; lo es una primera vez proporcionando fósforo inutilizable; y una segunda vez acomplejando elementos indispensables al organismo, puede preovocar osteoporosis y/o raquitismo debido al papel descalcificante del ácido fítico. El papel desmineralizante del ácido fítico, aumenta a causa de preparaciones culinarias que destruyen la fitasa debido al calentamiento. (FAO 1980)

Los fitatos reducen la digestibilidad de las proteínas, almidón y lípidos. También se ha visto que la acción de algunas enzimas es inhibida por el ácido fítico y también por inositol pentafosfato.

El ácido fítico se considera como una mala fuente de fosfato para el hombre porque no se libera o porque se encuentra en forma de sales insolubles. Existen numerosos reportes que indican que este ácido aumenta la pérdida fecal de calcio y contribuye a la descalcificación del organismo con un aporte normal de calcio y vitamina D, también pueden quedar reducidas la utilización digestiva de oligoelementos como cobre, zinc, magnesio y hierro. (Derache 1990)

3.5.6 Oxalatos.

El ácido oxálico (COOH-COOH) es el ácido dicarboxílico más simple, está presente en numerosas plantas en forma libre o en forma de sales solubles de sodio y potasio y sales insolubles de calcio, estas últimas casi insolubles en agua. El interés en la toxicidad de los oxalatos radica en el severo o fatal envenenamiento ocasionado por el consumo de hojas de ciertas plantas (ej. riubarbo) conocidas por tener grandes cantidades de oxalatos. La ingestión accidental de ácido oxálico químicamente puro es conocida que produce severa acción corrosiva, por lo que se supone el envenenamiento por ingestión de altos contenidos de oxalato de plantas esta probablemente relacionada con esta propiedad. Los dos aspectos de toxicidad presentados por el ácido oxálico son la interferencia con la asimilación del calcio y la formación de cálculos renales, por consecuencia de la débil disociación de las sales de oxalato cálcico. El umbral de toxicidad del ácido oxálico es bastante bajo, la dosis letal mínima en el hombre se valora en 5g aproximadamente para un adulto, por otro lado el margen de seguridad es limitado, un consumo excesivo de riubarbo puede representar una décima parte de la dosis letal mínima. Por otra parte se ha visto que el 15% del total de oxalato de calcio es degradado durante el paso de éste a través del tracto gastrointestinal.

El efecto del oxalato en la absorción de otros metales (ej zinc) indica una posible interacción de estos con otros agentes quelantes como los fitatos.

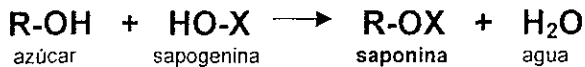
Desde un punto de vista estrictamente nutricional, el problema principal que determina es el de la disponibilidad de calcio en la ración alimentaria. Si consideramos que 2.5 g de ácido oxálico precipitan 1g de calcio, la disponibilidad de calcio de un alimento viene determinada por la relación g de ácido oxálico/ g de calcio. Algunos alimentos tienen relaciones altas: riubarbo (1/0.04), espinacas (1/0.1), papas (0.15/0.03). Todos los alimentos que tengan una relación superior a 2.25 constituyen una mala fuente de calcio y además pueden considerarse como descalcificantes.

Se ha observado que para que hubiera un problema crónico tendría que haber una combinación de circunstancias, como son: -una muy alta ingesta de

oxalatos con una simultanea baja de calcio y vitamina D por un largo período (Derache 1990, Fasset 1973)

3.5.7 Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser ya sea un esteroide ó un triterpeno, aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides



Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal en hojas, raíces, tallos y flores.

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, en general inodoras, de difícil cristalización; sus soluciones coloidales al producir espuma, reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones de grasas y aceites, tienen propiedades estornutatorias, irritan los ojos y la piel cuando se frota, son termoresistentes, forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroides. Son medianamente solubles en agua y muy solubles en alcohol. Al enfriarse las saponinas precipitan. En disolventes orgánicos son insolubles

En ácido sulfúrico concentrado, las soluciones de saponinas esteroides producen una coloración que varía del rojo al violeta. Las soluciones alcohólicas de saponinas reaccionan con soluciones también alcohólicas de colesteroína formando precipitados característicos. (Girón 1992)

Algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y hongos, ya que actúan precipitando esteroides en la pared celular

Estudios realizados de los efectos que las saponinas de alfalfa tienen sobre algunos animales, mostraron diferentes respuestas en los animales monogástricos con dietas en las cuales el contenido de saponinas era variable. Con un nivel de

0.3% de saponinas, se detectó un decremento en el peso. En general el modo de acción de las saponinas sobre los animales monogástricos es poco conocido

En cuanto al contenido de saponinas para el hombre en ciertos productos alimenticios, el estratus del Merck Index (1976) indica que prácticamente las saponinas no son tóxicas por ingestión oral. La dosis letal media (DL_{50}), estudiada en perros conejos y ratas va de 25 a 3000mg/kg de peso corporal. Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, pueden producir fallas en la respiración, convulsiones y coma. (George 1965)

Las saponinas producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos; la hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, que produce liberación de hemoglobina.

La membrana celular de los eritrocitos está constituida por esteroides, fosfolípidos y proteínas, se observó que quince saponinas y seis sapogeninas formaron complejos con el colesterol, pero no con lecitina ni con albúmina; esto implica que el punto de ataque en la hemólisis con saponinas, es el colesterol de la membrana de los eritrocitos. Se observó que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para que se produzca la hemólisis que es una consecuencia de que las moléculas de saponina se unan al colesterol, dando lugar a la formación de canales en la membrana y / o una posible desnaturalización. (Clavert et all 1967)

La toxicidad de las saponinas está a discusión ya que en algunos países se tienen límites permitidos mientras que en otros se utilizan como aditivos para alimentos. (Girón 1992)

3.5.8 Taninos.

Entre los compuestos polifenólicos que se encuentran en los alimentos, los taninos constituyen un grupo caracterizado por su facultad de combinarse con las proteínas. Esta reactividad particular en la que se basa el curtido de pieles, que presentan los taninos hidrolizables y los taninos condensados, define también su actividad biológica, que se manifiesta por su gusto astringente.

La presencia de estos polifenoles en los alimentos determina una disminución del valor biológico de éstos, debido, en gran parte, a una interferencia con la utilización digestiva de las proteínas

Numerosos trabajos muestran, en efecto, la acción antinutritiva de los taninos presentes en los alimentos (cacao, plátanos, habas, sorgo).

Los taninos se usan también como aditivos en enología, cervecería y en la industria de conservas, su dosis diaria admitida es de 500 mg/día¹¹, esta dosis es fácilmente superada en dietas alimentarias que se consideran normales. Efectivamente en los frutos, los taninos están presentes en tasas que varían entre los 0.2 y 1 g por 100g de peso fresco y en las verduras entre 0,5 y 2g.

El nivel de astringencia de las raciones parece tener una función importante en la elección alimentaria.

Los efectos antinutricionales de estos polifenoles se manifiestan principalmente por un aumento de la excreción fecal de nitrógeno. Diversas hipótesis han intentado explicar el fenómeno.

- Presencia en los alimentos de complejos tanino-proteínas resistentes al ataque de enzimas digestivas.
- Inhibición no específica de las enzimas digestivas por los taninos libres de los alimentos.
- Acción directa de los taninos sobre la mucosa digestiva que estimula las secreciones.

Es difícil evaluar la importancia relativa de estos mecanismos en el efecto final, que depende también del tipo de tanino presente en el alimento y de su estado, libre o asociado a proteínas. La deshidratación puede favorecer la oxidación de los taninos. Las quinonas así formadas contribuyen al establecimiento de enlaces covalentes con las proteínas. Estos complejos, difícilmente hidrolizables por las enzimas proteolíticas, participan en la pérdida fecal de nitrógeno.

La actividad antinutricional de los taninos puede manifestarse también por la aptitud que tienen estos polifenoles a asociarse a los iones di- y trivalentes. Se ha demostrado que la ingestión de té disminuye la disponibilidad de hierro del

alimento. En cambio, la formación de complejos con el plomo y los metales pesados puede tener una función protectora impidiendo su absorción. El ácido tánico, al combinarse con la vitamina B₁₂ y al factor intrínseco, disminuye la disponibilidad de esta vitamina. Por otro lado, la vitamina B₁ puede ser destruida por los taninos del té y las reservas hepáticas de vitamina A, disminuyen en presencia de determinados taninos en la dieta (Derache 1990)

3.6 Digestibilidad “in vitro”.

Hoy en día es necesario determinar el sitio y los productos finales de los componentes durante el proceso de digestión.

El proceso de digestión se ha definido, como el proceso de reducción del tamaño de una molécula orgánica por hidrólisis, ella precede a la absorción que es la entrada de nutrimentos, iones y moléculas de las células de la mucosa intestinal. Sin embargo los dos fenómenos se miden combinados y al valor obtenido se le llama digestibilidad de un nutrimento.

El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante ya que este es el que va a marcar la diferencia entre la alimentación cuantitativa de la cualitativa. En las pruebas de digestibilidad o de balance se cuantifican los nutrimentos que se ingieren y se absorben en el tubo digestivo y las cantidades que se eliminan en las heces. Para esto es necesario conocer la cantidad del alimento ingerido como excretado, siendo la diferencia entre ambas cantidades la parte que se asume fue digerida y absorbida, que al ser expresada como porcentaje resulta ser el coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca o de cada uno de los componentes de los alimentos, en general, los valores de la digestibilidad obtenidos son aparentes ya que normalmente no se hacen mediciones, ni correcciones de los aportes metabólicos endógenos, tales como enzimas, hormonas, metabolitos y células de descamación, entre otros, que se producen como consecuencia del proceso digestivo y que aparecen en las heces sin ser un residuo alimentario. Cuando dichos valores son tomados en consideración y corregidos se obtiene la digestibilidad verdadera.

Las condiciones de procesamiento y almacenamiento pueden tener efectos adversos en la calidad nutricional de las proteínas, especialmente en su digestibilidad.

La utilización biológica de una proteína es primariamente dependiente de su *digestibilidad por peptidasas gástricas, pancreáticas e intestinales*, por esto es de suma importancia, para poder evaluar la calidad nutricional de un alimento.

Existen diferentes métodos para determinar la digestibilidad de un alimento, entre ellos se encuentran la digestibilidad "in vivo", "in vitro" e "in situ".

El valor nutritivo potencial de un alimento puede ser determinado en primera instancia por el análisis químico proximal, pero el valor real del mismo para el animal solo se puede lograr a través de un análisis de las pérdidas inevitables que ocurren durante la digestión, absorción y metabolismo. Esto obedece que después de consumir un alimento, hay residuos no digeridos y que son excretados en las heces. Lo cual significa una merma en términos de la utilización del alimento por lo que la primera pérdida impuesta al mismo está representada por la parte que no es digerida, ni absorbida.

El análisis de la digestibilidad de un alimento es muy importante ya que existen diferentes moléculas en éste, unas de fácil absorción y otras que son resistentes a la degradación enzimática en el caso de los animales monogástricos *y por ende excretadas en las heces*; es precisamente este tipo de análisis los que marcan la diferencia entre la alimentación cuantitativa de la cualitativa de un alimento

- Los métodos para la medición de la digestibilidad "in vivo" implican el empleo de animales de laboratorio. El experimento se refiere a la cantidad de alimento que se puede digerir por unidad de tiempo y es función de la dieta. Este tipo de experimento resulta costoso por el tiempo, la mano de obra calificada, las grandes cantidades de alimento y al número de análisis químicos que requieren, pero poseen menos posibilidades de error en relación a los métodos alternos.
- Los estudios "in vitro" se han desarrollado como alternativa a las técnicas de digestibilidad "in vivo", *en condiciones de laboratorio* Los métodos "in vitro"

para probar la digestibilidad se basan en el uso de enzimas proteolíticas para correlacionarse con la digestión de la proteína "in vivo". Para imitar la digestión humana, se usan enzimas gástricas y/o pancreáticas además de enzimas intestinales en el ensayo. La principal ventaja de este método es la rapidez de este y la poca cantidad de muestra que se requiere para el ensayo.

- La técnica "in situ", usa pequeñas bolsas de nylon con un poro de 20 micrones. La muestra dentro de las bolsas sufre una predigestión con proteasas. La técnica ha sido utilizada durante varios años para proporcionar valores estimados de la tasa de desaparición de la materia seca, proteína cruda y fundamentalmente de la fibra y sus fracciones en tracto intestinal, estas son introducidas mediante una cánula duodenal y recuperada en las heces, esta técnica tiene la ventaja de dar una estimación rápida de la tasa y el grado de degradación de los alimentos, sin necesidad de ningún procedimiento complicado mas que simplemente pesar. Otra ventaja consiste en que el material alimenticio se encuentra en íntimo contacto dentro del tracto intestinal con el ambiente digestivo (temperatura, pH, enzimas, etc.) cosa que no sucede en la técnica de digestibilidad "in vitro".(Boisen et all 1991, Swaisgood et all 1991)

4. METODOLOGÍA

En el siguiente diagrama de bloques, se muestra el desarrollo que se siguió para realizar el estudio de las tres muestras.

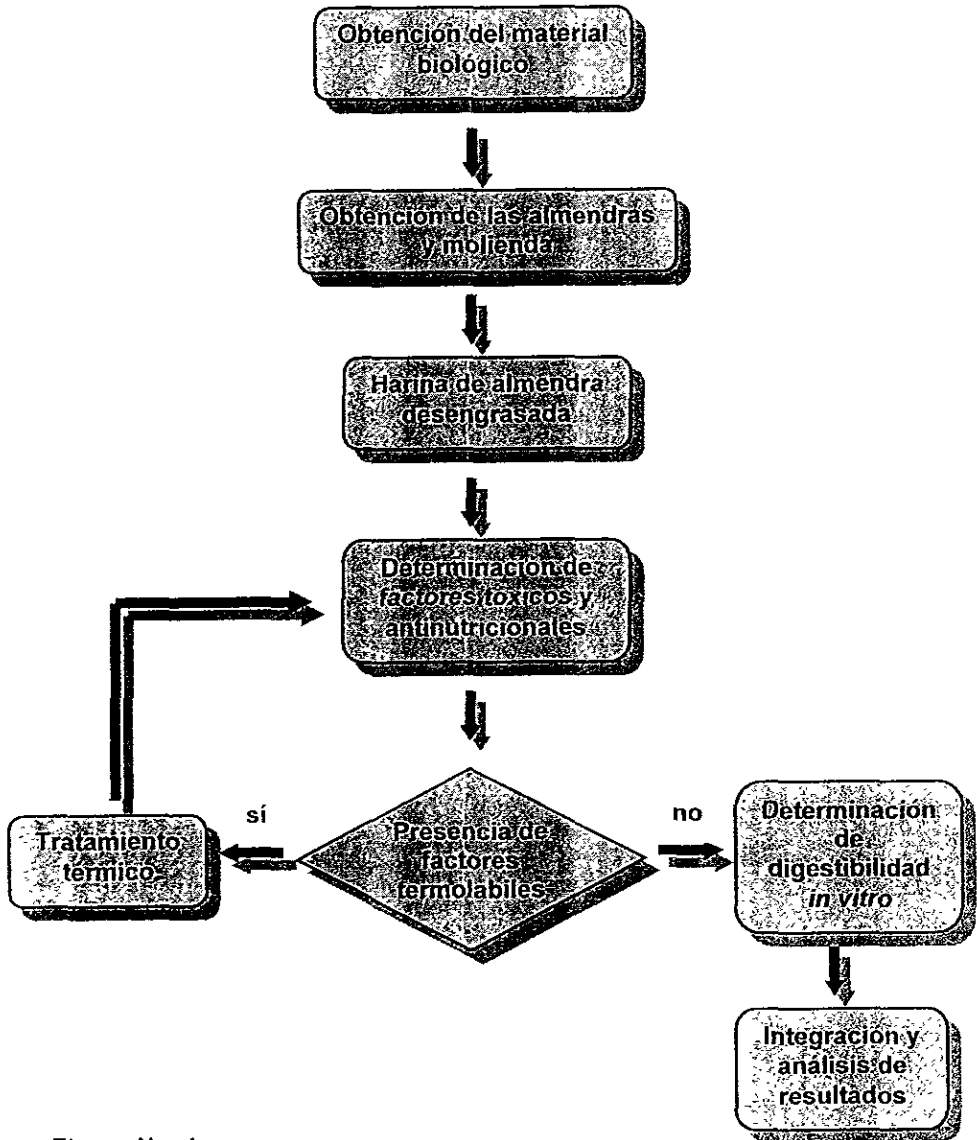


Figura No. 1.

4.1 Obtención de la Harina de Almendra Desengrasada

Debido al alto contenido de grasa de las almendras, es necesario separar la fracción lipídica, ya que en la mayoría de las determinaciones químicas esta fracción produce interferencia

4.1.1 Capulín.

Se toma una muestra homogénea de las semillas y se extrae la almendra, rompiendo el caparazón, tratando de no dañar la almendra.

Se muelen en molino Willey modelo 4 y que pasen por malla No. 1.

Se coloca la harina, en cartuchos de celulosa y se desengrasan con hexano en un aparato de extracción continua tipo Goldfish, por un tiempo mínimo de 6 horas, a una temperatura aproximada de 40°C para no dañar los factores termolabiles. Se elimina el disolvente en rotavapor.

4.1.2 Mamey.

Se extraen las almendras del mamey rompiendo las semillas con la ayuda de pinzas. Como el contenido de humedad en la almendra integra es elevado (45.36%)⁷ se secan en una estufa de recirculación a una temperatura de 50°C hasta peso constante.

Se muelen en molino Willey modelo 4 y que pasen por malla No. 1.

Se coloca la harina, en cartuchos de celulosa y se desengrasan con hexano en un aparato de extracción continua tipo Goldfish, por un tiempo mínimo de 6 horas, a una temperatura aproximada de 40°C para no dañar los factores termolabiles. Se elimina el disolvente en rotavapor.

4.1.3 Napahuite.

Se contaba con suficiente harina desengrasada, hecha en estudios previos.

4.2 Almacenamiento de la harina desengrasada.

Ya desengrasada la harina de cada una de las muestras se evapora el disolvente, dejando las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos. Se guardan en frascos color ámbar y se almacenan en un lugar fresco.

4.3 Caracterización toxicológica de las muestras.

Contando con harina de almendra desengrasada de cada muestra, se procede a la determinación de los siguientes factores tóxicos y antinutricionales (tabla No. 2).

Tabla No. 2.

Factores termolabiles	Factores termoestables
Inhibidores de tripsina Fitohemaglutininas	Alcaloides Glucósidos cianogénicos Fitatos Oxalatos Saponinas Taninos

4.3.1 Inhibidores de tripsina. (Kakade et al 1974, Liu et al 1989)

FUNDAMENTO:

La técnica es una modificación de la utilizada por Kakade y colaboradores la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina. El extracto se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina y después de un cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente por medio de un sustrato sintético (BAPNA Benzol-arginina-p-nitroanilida) la cual producirá una coloración debido a

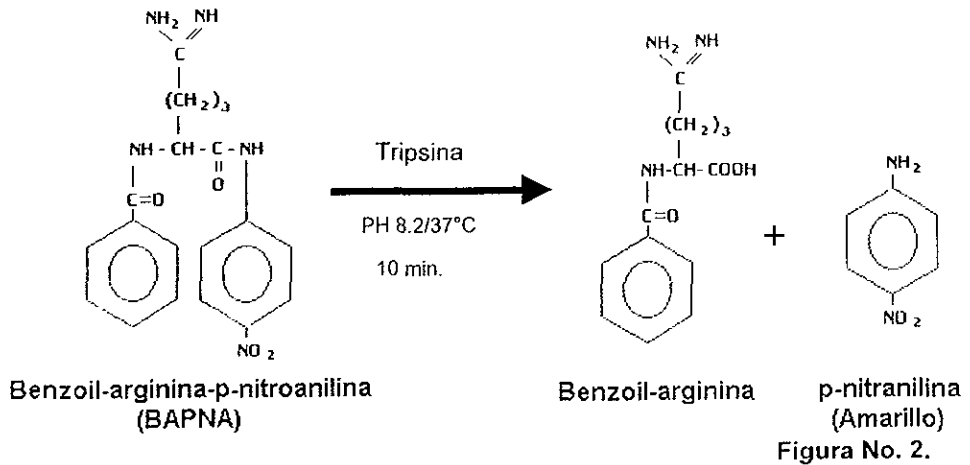
la producción de p-nitroanilina, que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. (fig. No. 2).

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (UTI).

Las modificaciones hechas en este trabajo son las siguientes:

1. Se usa agua en vez de una disolución de álcali para extraer los inhibidores.
2. El extracto acuoso es desestabilizado con buffer Tris (Hidroximetil-amino-metano) y filtrado antes en vez de después de realizar la reacción.
3. Se usa tripsina porcina (Tipo IX, Sigma) en vez de bovina.
4. La enzima y no el sustrato es agregada al final de la mezcla de reacción, lo que elimina la espera de 10min que se llevaba la reacción enzima-sustrato.
5. El volumen de la mezcla de reacción es reducido de 10 a 4 ml, por lo que se ahorran reactivos.

Hidrólisis de BAPNA con tripsina.



MATERIAL Y REACTIVOS:

- Potenciómetro CORNING, pHmeter 430
 - Baño GRANT, mod SE 10
 - Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER, mod.340
 - Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer
 - Solución amortiguadora de TRIS, pH 8.2 y 0.05M (a)
 - Solución BAPNA (b)
 - Ácido acético al 30%
 - Solución estándar de tripsina (c)
 - HCl 0.001N
- (a) 6.05g de TRIS (hidroximetil-amino-metano) y 2.94g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.2 y se afora a un volumen de 1 lt
- (b) 100mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) se disuelven en 2.5ml de dimetil sulfóxido y se diluye a 250ml con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C. ESTA SOLUCIÓN DEBE SER PREPARADA EL MISMO DÍA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.
- (c) Una solución stock de tripsina se prepara disolviendo 10mg de tripsina porcina cristalina (Type IX, SIGMA CHEMICAL Co., St Luis , MO) en 50ml de HCl 1mM, con un pH de 2.5 aproximadamente. La solución se guarda a 4°C donde puede durar de 2-3 semanas sin perder actividad. Para preparar la solución de trabajo de tripsina, se toman 2ml de la solución stock y se diluye a un volumen de 25ml, usando la solución de HCl 1mM. Esta solución tiene 16µg de tripsina/ml.

PROCEDIMIENTO

A) Preparación del extracto:

Se pesa aproximadamente medio gramo (0.5g) de muestra, que se extrae con 50ml de agua destilada por 30min con agitación mecánica a una velocidad de 200rpm. 10ml de la suspensión se desestabilizan agregando un volumen de buffer necesario para tener una inhibición de 40-60% por ml de muestra, esto se realiza para reducir la desviación estándar relativa después se agita de 2-3min, si es necesario filtrar con papel Whatman No.2

B) Determinación de la actividad:

Toda la reacción se debe llevar a cabo a una temperatura de 37°C. En un tubo de ensayo se agregan 2ml de la solución de BAPNA, recién preparada, luego se agrega 1ml de la muestra y 0.5ml de enzima. Exactamente 10min después de haber agregado la tripsina, se detiene la reacción con 0.5ml de ácido acético al 30%. Es necesario correr un blanco, en el cual se siguen los mismos pasos, pero la muestra es sustituida por 1ml de agua destilada

En la tabla No. 3, se muestra la secuencia de mezclado de los reactantes

Tabla No. 3.

Orden de mezclado	Reactivo	Volumen
1ro	BAPNA	2ml
2do	Muestra	1ml
3ro	Enzima	0.5ml
4to	Acido acético	0.5ml
Volumen total		4ml

La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 410nm. Es necesario primero ajustar el aparato a 100% de transmitancia con agua.

CALCULOS.

Definiendo una Unidad de Tripsina como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia A_{410} , bajo las condiciones de prueba, la actividad de los inhibidores de tripsina son expresados en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra, como se muestra en la figura No. 3.

$$\text{UTI/mg muestra} = \frac{[(A_{410}^b - A_{410}^m) * 100] F}{\text{mg mtra/ B}}$$

Figura No. 3.

Donde:

A_{410}^b = Absorbancia del blanco

A_{410}^m = Absorbancia de la muestra

F = Factor de dilución

B = Aforo al que se llevo la muestra.

4.3.2 Fitohemaglutininas.

FUNDAMENTO:

La detección de hemaglutininas o lectinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Agitador magnético con tacómetro THERMOLINE.
- Centrífuga para tubos DYNAC.

- Tubos de centrifuga de 15ml con graduación.
- Jeringa de 5 o 10ml # 22.
- Incubadora BLUE-M.
- Espectrofotometro COLEMAN, Junior II-A
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- Filtro de vidrio poroso.
- Sangre de hamster desfibrinada y lavada.
- Solución anticoagulante (a).
- Solución salina al 1%.
- Solución salina al 0.9%.
- Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b).
- Pronasa de *S. grigens* (sigma P-5005).

(a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación.

Sol. Heperina:sangre = 15- 20UI: 1ml sangre

Sol. de citrato:sangre = 0.1 ml:1ml sangre

Sin embargo, si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1:1 o sea 1ml de solución ELSEVER por 1ml de sangre fresca.

(b) En términos generales se usa tripsina al 0.1% en solución salina, para el proceso de sensibilización; sin embargo, cuando se trabaja con sangre de cualquier roedor (ratón, hamster, etc), es conveniente trabajar con pronasa al 0.2% en solución salina 0.9%.

METODOLOGIA:

a) Preparación del extracto

Una vez que se tiene la muestra finamente molida (y desengrasada si el caso lo amerita), se suspende 1 gr en 10 ml de solución salina al 1%, se efectúa una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a la temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifuga el extracto a 1400 rpm (40 U) durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1%, para llevar el extracto filtrado al volumen inicial.

b) Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra por el ojo al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante (No interrumpir hasta el momento de diluirla)

La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre.solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 rpm (50U) durante 10 min. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada mililitro de glóbulos rojos 24ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1ml de solución de tripsina al 0.1% (en solución salina) y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5%, por lo cual cada mililitro de paquete de eritrocitos se le adicionan 19ml de solución salina 0.9%

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario separarlos de esta suspensión, para lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocado dentro de un embudo de cuello corto.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 1ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4ml de solución salina al 0.85%. Se lee el espectrofotómetro a 620nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1cm² de luz y como blanco solución salina al 0.85%.

La lectura que se debe obtener será de $25\% \pm 1$ de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter, colocar, en cada pozo una hilera de 50µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.(fig 4 y 5).



Figura No. 4.

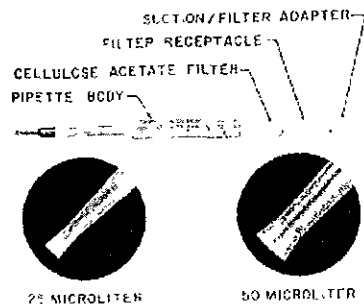


Figura No. 5.

A continuación llenar el microdilutor de 50 μ l (fig. 6) por contacto con la superficie del extracto problema para proceder a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión.

NOTA: Es recomendable checar que el volumen que esté tomando nuestro microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza con solución salina en una placa de prueba. (fig. 7).



Figura No. 6.

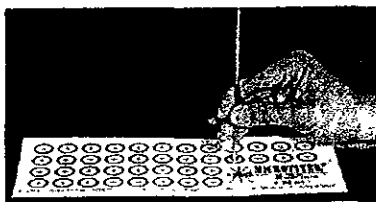


Figura No. 7.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 μ l de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C por espacio de 1 hora. (fig. 8).

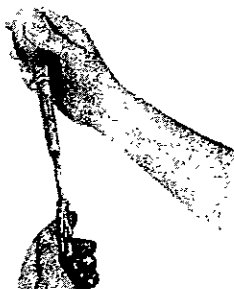


Figura No. 8.

f) Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo, se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura (fig. 9). Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba.

Se reporta la última dilución que presenta aglutinación

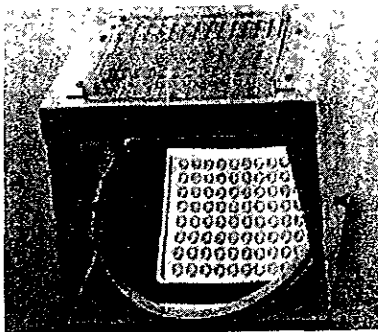


Figura No. 9.

4.3.3 Alcaloides. (Abisch et al 1960)

FUNDAMENTO:

El material seco de la planta se extrae con metanol. Una solución acuosa de la porción soluble en ácido del extracto con metanol fue hecha básica con amoníaco y sujeto a extracción diferencial con cloroformo-etanol. Los 2 extractos así obtenidos fueron entonces ensayados con 7 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 SONNENSCHNEIDER (ácido fosfomolibdico).
- 5) Reactivo de HAGER (ácido picrico).
- 6) Reactivo de SCHEIBLER (ácido fosfotungsténico).
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTENICO.

El precipitado formado con los reactivos para alcaloides varían en cantidad con los diferentes alcaloides, en consecuencia, una estimación de la concentración de los alcaloides a partir de la cantidad de precipitado con un reactivo, es solamente aproximado.

La exactitud puede ser mejorada usando varios reactivos y el método está basado en la comparación de la cantidad de precipitado obtenido con los 7 diferentes reactivos de alcaloides, comparando con los precipitados obtenidos con una solución de estricnina de concentración conocida.

MATERIAL Y REACTIVOS:

- Embudo de separación de 125ml.
- Parrilla de agitación CORNING, mod PC-351.
- Estufa de vacío marca LAB-LINE INSTRUMENTS.
- Papel filtro Whatman # 1.
- Rotavapor BUCHI 461, mod RE 111.
- Acido nítrico (30% o $\delta=1.180$).
- HCl 1%
- Acido silicotungstico ($4H_2O-SO_2-12WO_2-22H_2O$).
- Metanol (R.A)
- Amoniaco concentrado (aprox. 25%).
- Diclorometano (R.A).
- Etanol (R.A.).
- Sulfato de sodio anhidro (R.A.).
- Estricnina (U.S.P).
- Reactivo de MAYER (a).
- Reactivo de WAGNER (b).
- Reactivo de DRAGENDORFF (c).
- Reactivo de SONNENSCHNEIN (d).
- Reactivo de HAGER (e).

- Reactivo de SCHEIBLER (f)
 - Reactivo de ACIDO SILICOTUGSTENICO (g).
- (a) Se disuelven 1.36g de HgCl_2 en 60 ml de agua y 5g de yoduro de potasio en 10ml de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100ml con agua destilada.
- (b) Se disuelven 1.27g de yodo (resublimado) y 2g de yoduro de potasio en 20ml de agua; la solución se afora a 100ml con agua destilada.
- (c) Se disuelven 8gr de nitrato de bismuto pentahidratado en 20ml de ácido nítrico y 27.2g de yoduro de potasio en 50ml de agua. Se mezclaron las 2 soluciones y se dejaron reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua a 100ml.
- (d) A 100ml de una solución caliente de molibdato de amonio (43g/100ml), adicionar 100ml de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10g/100ml); a esta solución clara adicionar 10ml de ácido nítrico concentrado, al precipitado amarillo en 50ml de agua destilada y calentar. A la suspensión caliente adicionar 100ml de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28g/100ml). Una solución clara debe formarse, y esta solución es evaporada en cápsula a sequedad; flamear la superficie del polvo con un mechero bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Pesar el polvo y debe ser aproximadamente 30g. Disolver el polvo con 200ml de agua destilada caliente, calentar y adicionar a esta solución 50ml de ácido nítrico concentrado, a esta solución adicionar agua destilada hasta llevar a un aforo de 300ml , resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.
- (e) Preparar una solución acuosa saturada de ácido pícrico (2g/100ml).
- (f) Se disuelven en 50ml de agua 10g de tungstato de sodio y 7g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico.
- (g) Se disuelven 5g de ácido silicotúgstico en el ácido sulfúrico (6N) necesario para formar 100ml de solución.

PROCEDIMIENTO

2-4g. de muestra seca y molida (se debe secar por debajo de 50°C), es mantenida toda la noche con 40ml de metanol; a continuación se calienta durante 4 horas a 50°C (agitando ininterrumpidamente). La mezcla es entonces filtrada y el residuo es lavado con 20ml de metanol y los extractos se combinan y se evapora el metano en un rotavapor. El residuo es resuspendido con 2ml de metanol y 12ml de HCl al 1% la mezcla es agitada y filtrada, para lavar el residuo se usan 8ml de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se hace básico con amoníaco concentrado (aprox. 25%). Se extrae con tres porciones de 20ml de cloroformo cada una, dando la FRACCION "A".

A la solución acuosa residual de la anterior extracción, se procede a extraerla con una mezcla de cloroformo-etanol (3:2 v/v), con tres porciones de 20ml cada una, con lo cual se obtiene la FRACCION "B".

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

Las dos fracciones A y B, son evaporadas en un rotavapor por separado; y el residuo es resuspendido con 1.5ml de HCl al 1% y 1.5ml de cloroformo, se agita vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción es pipeteada y filtrada a través de algodón y dividida en 7 porciones; estas alícuotas son ensayadas con los siguientes 7 reactivos de alcaloides:

- (1) Reactivo de MAYER: El reactivo sólo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H₂SO₄ diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Solo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.
- (2) Reactivo de WAGNER: La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.
- (3) Reactivo de DRAGENDORFF: Se usa sobre soluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o con disolvente similar.

- (4) Reactivo de SONNENCHEIN. Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos. Se puede recuperar los alcaloides disolviendo en amoniaco.
- (5) Reactivo de HAGER. La mayoría de soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.
- (6) Reactivo de SCHEIBLER. La solución acidulada da un precipitado color blanco grisáceo.
- (7) Reactivo de ACIDO SILICOTUGSTENICO: La solución acidulada da un precipitado color blanco grisáceo.

RESULTADOS:

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

Hay que mencionar que para el caso del reactivo de HAGER, debido a su baja sensibilidad, cuando da una reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar; considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

Esta prueba preliminar de selección para la determinación de alcaloides, se puede manejar en forma semi-cuantitativa cuando los precipitados formados se comparan con soluciones de estricnina de concentración conocida.

4.3.4 Glucósidos cianogénicos. (Lucas et al 1984)

FUNDAMENTO

El ácido cianhídrico en cantidades trazas está ampliamente distribuido en el reino vegetal y se presenta principalmente en forma de glucósidos cianogénicos;

sin embargo concentraciones relativamente altas de estos tóxicos son encontradas en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendras de frutas

El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Grignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN. (fig. No. 10).

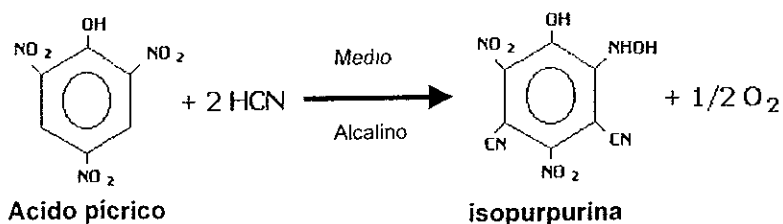


Figura No. 10.

Para poder 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; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas.

Con el anterior método se pueden detectar cantidades del orden de 5μg de HCN, equivalente a 46μg de glucósidos cianogénicos (referido con linamarina).

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Potenciómetro, CORNING, phmeter 430.
- Incubadora marca BLUE-M.
- Congelador comercial
- Espectrofotómetro, SEQUOIA-TURNER, mod 340.
- Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENTS.
- Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX # 9825 y 9826.
- Micro-molino marca TECATOR, mod CYCLO_TEC.

- Papel indicador de HCN (a).
- Solución de β -glucosidasa con activador (b)
- Solución de KCN equivalente a $100\mu\text{g HCN/ml}$ ($24.1\text{mg KCN}/100\text{ml}$)
- HCl 0.5 N.
- Buffer de fosfatos pH 7 (c).
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (d).
- Fécula de maíz comercial.

(a) Papel Whatman del # 2 se empapa en una solución de picrato de sodio (c), se deja escurrir y se coloca en una estufa a secar a una temperatura de $55\text{-}60^\circ\text{C}$ por espacio de 30 minutos. A continuación se cortan tiras bien medidas de $2 \times 10\text{ cm}$. (fig. No. 11)

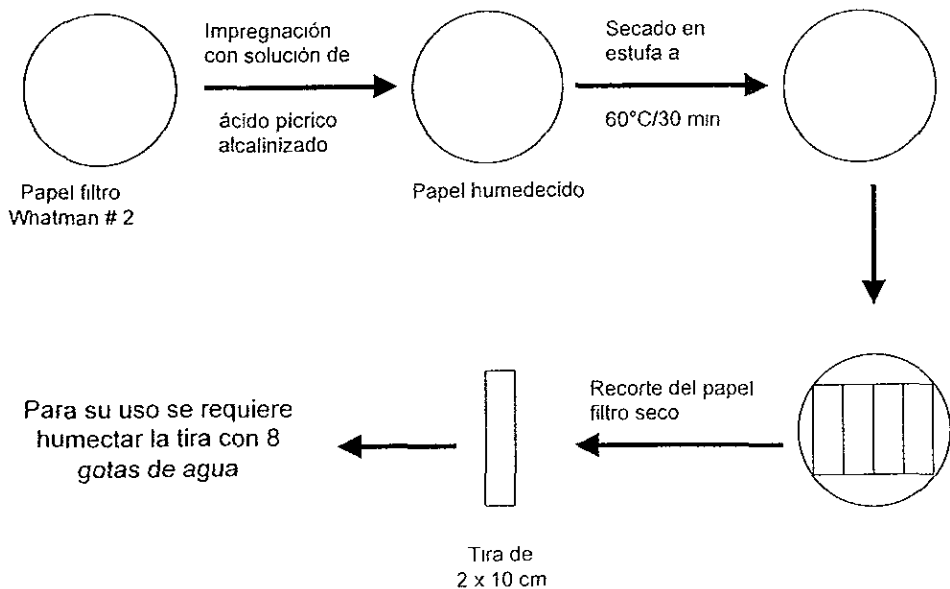


Figura No. 11.

(b) 0.25g de β -glucosidasa (250mg) se disuelven con buffer de fosfatos pH 7 (c) teniendo la precaución de agitar suavemente (de lo contrario se formará una gran cantidad de espuma) una vez disuelta la enzima se le adiciona 1.7 g de NaNO_3 .

(c) Se preparan las siguientes soluciones:

A: Sol. de fosfato de sodio monobásico 0.2M (27.8g en 1L).

B: Sol. de fosfato de sodio dibásico 0.2M (53.65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó 71.7g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1L).

Mezclar 39ml de A y 61ml de B y aforarlo a 200ml. Ajustar el pH a 7.0 empleando un potenciómetro.

(d) Se disuelve en agua destilada 2.5g de ácido pícrico y a continuación 12.5g de carbonato de sodio, llevándose a un volumen de 500ml con agua destilada.

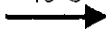
PROCEDIMIENTO

1). Curva estándar: Para la elaboración de nuestra curva de referencia, se usa una solución de cianuro de potasio cuya concentración equivalga a $100\mu\text{g}$ HCN/ml. Además con el fin de simular la interacción muestra-HCN liberada, se introduce en nuestra curva estándar la llamada *matriz alimenticia*, que en este caso se usó fécula de maíz comercial. (tabla No.4).

La curva estándar va de $5\text{-}60\mu\text{g}$ de HCN ya que fue 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. Dicha serie de tubos se trabajan en la misma forma que para la liberación de HCN en la muestra.

CURVA ESTÁNDAR

Tabla No. 4.

ml solución estándar	Matriz alimenticia	Buffer pH 7	40°C  4 horas	HCl 0.5N (en frío)	Concentración de HCN
0.00	500mg	5ml			1ml
0.05	500mg	5ml		1ml	5
0.1	500mg	5ml		1ml	10
0.2	500mg	5ml		1ml	20
0.4	500mg	5ml		1ml	40
0.6	500mg	5ml		1ml	60

2). Preparación de la muestra: Cuando se requiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro; para lo cual el material íntegro fresco se somete a una molienda fina e inmediatamente se pasa a un frasco que cierre perfectamente y si no se va a realizar en ese momento la determinación, se procede a colocar la muestra ya molida en el congelador.

3). Liberación del HCN de la muestra: Se coloca en un tubo de cultivo Pyrex # 9826 de 20-500mg de muestra, dependiendo de su contenido aproximado de glucósidos cianogénicos (cuando no se tiene información se coloca la cantidad máxima de 500mg), a continuación se le adicionan 5ml de solución de β -glucosidasa (fría) se homogeniza y se procede a colocar la tira de papel indicador humedecida (aproximadamente con 8 gotas de agua) en la boca del tubo y se cierra herméticamente con un tapón de rosca. (fig No. 12).

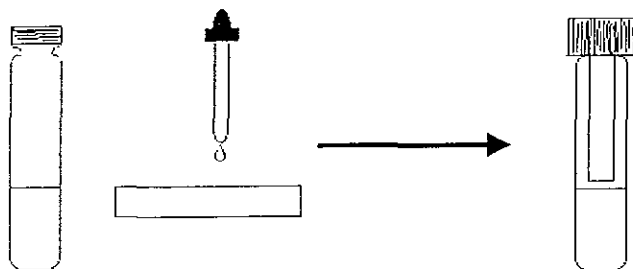


Figura No. 12.

Una vez que se tiene el anterior dispositivo se coloca en el baño maría que esta a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1$ y con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 por espacio de 4 horas. Al final de dicho tiempo se saca el tubo y se coloca en el congelador por 30 minutos.

Transcurrido el anterior tiempo se saca el tubo y se destapa para adicionarle 1ml de HCl 0.5N (frio); hay que hacer notar que si se usan los tapones adecuados, la tira de papel indicador quedará adherida a dicho tapón y no se presentaran problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se vuelve a cerrar perfectamente, se homogeniza teniendo la precaución de que el líquido no toque el papel indicador y se coloca en la incubadora por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60°C . Transcurrido el tiempo se saca de la incubadora y en ese momento se puede realizar visualmente la detección cualitativa, ya que aquellos tubos que no muestren ni siquiera ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto que aquellos que si muestran aunque sea una tenue coloración se consideran positivos y se procede a su detección cuantitativa.

4). Determinación cuantitativa: Con cuidado se procede a recuperar el alcaloide del papel indicador y para esto se coloca en un tubo de cultivo Pyrex # 9825, se le adiciona 20ml de agua destilada (medidos con bureta) se tapa y se agita vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.

Después de extraer el pigmento (aproximadamente de 2-5 minutos) se recupera el solvente (agua), eliminando los residuos del papel por una simple filtración con papel de filtración rápida. Hay que hacer notar que cuando así se requiera se puede hacer otra nueva adición de agua (20ml) para extraer completamente el pigmento (dilución).

La solución filtrada se coloca en la fotocelda para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520nm; previamente ajustado a 100% de transmitancia con el blanco correspondiente (todos los reactivos excepto la muestra).

CALCULOS:

Una vez que se tiene elaborada la curva estándar, en donde se encuentra relacionado el contenido de HCN vs D.O. expresado en absorbancia, se pasa el valor obtenido de % T a A.

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

Con el dato de absorbancia se puede interpolar o calcular de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal, el correspondiente contenido de HCN (X).

$$\frac{X \times D \times 100}{M} = \text{mgHCN}/100\text{g de muestra}$$

Donde :

X = μg de HCN

D = número de veces de adición de 20ml de agua (dilución)

M = mg de muestra.

4.3.5 Fitatos. (Wolfgang et al 1983)

FUNDAMENTO:

El método se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo de fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de hierro III de concentración conocida de hierro. El decremento de hierro (determinado coloriméricamente con 2,2-bipiridina) en el sobrenadante es una medida del contenido del ácido fítico. El método debe ser calibrado con soluciones estándar de ácido fítico.

MATERIAL Y REACTIVOS:

- Parrilla de calentamiento, SUPELCO, mod 3-3315
- Espectrofotometro, SEQUOIA-TURNER, mod 340.
- Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer.
- HCl 0.2N.
- HCl 2N.
- Ácido tioglicólico.
- Solución de referencia de fitato (a).
- Solución ferrica (b).
- Solución de 2,2'-Bipiridina (c).

(a) Se prepara una solución stock que contenga 150mg de sal sódica de ácido fítico, (type V, 97%, SIGMA No. P-5756), se afora a 100ml con agua destilada. Como la fitasa está ausente esta solución es estable.

(b) Disolver 0.2g de sulfato de amonio fierro (III) . 12 H₂O (Merck Art 3776) en 100ml de HCl 2N y aforar a 1L con agua destilada.

(c) Disolver 10g de 2,2'-bipiridina (Merck Art. 3098) y 10ml de ácido tioglicolico en agua destilada y aforar a 1L.

Estas soluciones son estables por varios meses a temperatura ambiente

PROCEDIMIENTO:

1) Curva patrón:

Se quiere que la curva entre en un rango de 3 a 30 μ g/ml de fósforo de fitato (tabla No. 5)

Tabla No. 5.

Solución de referencia	HCl 0.2N	Concentración (μ g P/ml)
1ml	100ml	3
2ml	100ml	6
4ml	100ml	12
6ml	100ml	18
8ml	100ml	24
10ml	100ml	30

2) Muestras:

Se pesa 1g de la harina desengrasada y se extrae con 100ml de HCl 0.2 N. Se pipetea 0.5 ml de este extracto en un tubo esmerilado. Agregar ml de solución ferrica. Cubrir el tubo con el tapón y enroscar un clip para evitar que se salga.

Calentar el tubo en la parrilla de calentamiento a 95 ± 2 °C por 30min. Tener cuidado los primeros 5min, de que los tubos esten bien tapados. Transcurridos los 30min dejar enfriar un poco y enfriar en agua con hielo por 15min hasta alcanzar la temperatura ambiente, una vez que los tubos han alcanzado la temperatura ambiente se agregan 2ml de solución de 2,2'-bipiridina y se mezcla el contenido. Se mide la absorbancia a 519nm a los 30seg exactos después de haber agregado la 2,2'-bipiridina a cada tubo, ya que la bupiridina reacciona con el fitato de fierro y el color cambia con el tiempo.

CALCULOS:

Se elabora una curva patrón Absorbancia vs Concentración ($\mu\text{g P}$ de fitato/ml), se extrapola el valor obtenido de la muestra en la curva patrón. El rango recomendado para el análisis es de 3 a 30 μg de fofóro de fitato/ml.

Con el dato de absorbancia se extrapola o calcula de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal, el contenido de fitato (μg de P/ml) (X).

$$\text{mgP} / 100\text{g de muestra} = \frac{X * 100}{M}$$

Donde:

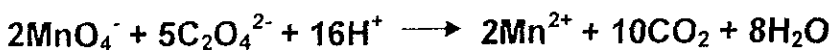
X= μg de P/ml

M=mg de muestra

4.3.6 Oxalatos. (AOAC 1990)

FUNDAMENTO:

La determinación de oxalatos se fundamenta en una determinación permanganimétrica en donde se realiza una titulación del ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) con una solución valorada de KmnO_4 0.01N. El ácido oxálico se oxida hasta CO_2 .



El límite de detección de esta metodología es de 140-700mg de ácido oxálico

MATERIAL Y REACTIVOS:

- Digestor, LABCON CO, No. 30001.
- Matraz digestor de 600ml Bercellius.
- Potenciómetro, CORNING, phmeter 430.
- Bureta 50ml.
- Papel Whatman # 30.
- Tubos cónicos para centrifuga de 50ml.
- Centrifuga, DYNAC.
- HCl 6N
- NH₄OH
- Antiespumante
- H₂SO₄ / H₂O (1:9).
- Reactivo de ácido tungstofosfórico (a).
- Buffer de acetato (b).
- Líquido de lavado (c)
- KmnO₄ 0.001 N (d).

(a) *Disolver 2.5g de Na₂WO₄ · 2H₂O en la mezcla de 4ml de ácido fosfórico y 50ml de agua y aforar a 100ml con agua destilada.*

- (b) Disolver 2.5g de cloruro de calcio anhidro en 50 ml de CH_3COOH / agua (50:50) y añadir a la solución 33g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ diluido a 50ml con agua destilada.
- (c) Diluir 12.5ml de ácido acético concentrado con 250ml de agua destilada y añadir polvo de oxalato de calcio, saturar con ácido oxálico. Enfriar a 4°C . Antes de su uso filtrar y mantenerla fría durante su uso.
- (d) Pesar 0.32g aproximadamente de KMnO_4 y disolver en un litro de agua destilada. Calentar la solución hasta que hierva de 15-20min evitando que la ebullición sea tumultuosa. Dejar enfriar y filtrar en papel de filtración rápida. recibir en frasco ámbar limpio. Después se titula la solución pesando con exactitud 0.02-0.03g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ previamente secado a $100-110^\circ\text{C}$ y colocar en un matraz erlenmeyer de 250-300ml. Disolver en agua (50-70ml) y agregar de 15-20ml de ácido sulfúrico diluido 1:8. La solución se calienta a 70°C y se titula con agitación dejando caer la solución de permanganato de potasio lentamente hasta una coloración rosa permanente.

Ejemplo de cálculo:

Se pesaron 0.0279g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Vol. gastado de $\text{KMnO}_4 = 39.8\text{ml}$

$(0.0279/0.0670) = 0.4164\text{ml normales}$.

39.8ml ——— 0.416417N

1ml ——— X

X = 0.01N.

PROCEDIMIENTO:

A. Preparación de la muestra:

Se pesan de 5 a 10g de harina del material en estudio, se coloca dentro de un vaso Bercelluz graduado (digestor de fibra) de 600ml, se agregan 200ml (en marca del vaso o con probeta) de agua destilada y se agita en la parrilla por 15min. Llevar a 300ml enjuagando las paredes, añadir 55ml de HCl 6N, 2 gotas de antiespumante y llevar a ebullición durante 15min en reflujo, dejar enfriar.

Aforar a 500ml con agua destilada enjuagando las paredes del vaso, agitar y dejar reposar toda la noche. Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 4 y desechar los primeros 100ml (con la finalidad de acondicionar nuestro sistema)

B. Precipitación del ácido oxálico:

Tomar una alícuota de 25ml y añadirle 5ml del reactivo del ácido tungstofosfórico y dejar reposar por un tiempo mínimo de 5 horas. Filtrar a través de papel Whatman No 40. Tomar 20ml del filtrado y depositarlos en un tubo cónico para centrifuga de 50ml. Añadir hidróxido de amonio gota a gota con cuidado hasta un $\text{pH} = 4 - 4.5$ utilizando un potenciómetro. Añadir 5ml de la solución precipitante y amortiguadora (buffer) de acetato y mezclar con una varilla de vidrio, enjuagarla con un pequeño chorro de agua destilada y dejar reposar toda la noche dentro del tubo de centrifuga. Centifugar a 3000g (1700rpm) por 15min para compactar el precipitado. Decantar el sobrenadante con una inversión suave del tubo de centrifuga teniendo cuidado no romper o agitar el precipitado de oxalato. Lavar el precipitado con 20ml del líquido de lavado frío en un chorro fino rompiendo completamente el precipitado, repetir la centrifugación y el drenado del líquido de lavado. Añadir 5ml de H_2SO_4 (1:9) al precipitado, homogeneizar en un matraz de erlenmeyer enjuagar el tubo con 20ml de agua destilada primero y luego otros 2 enjuages con 5ml.

C. Titulación:

Calentar la muestra y el blanco (5ml de H_2SO_4 (1:9)) en un baño de agua hirviendo. Titular las soluciones calientes con KmnO_4 0.001 N hasta que persista una coloración rosa.

CALCULOS

$$\text{mg.ác oxálico / 100g de muestra} = \frac{(V1 - V2)67 * N}{m} \times 100$$

Donde:

V1=Volumen gastado

V2=Volumen del blanco

N= Normalidad del KmnO_4

m= gramos de muestra

4.3.7 Saponinas. ^(Giron 1992)

FUNDAMENTO:

La detección de saponinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de sangre de conejo.

El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad de la aglutinación se mejora considerablemente con este tratamiento.

MATERIAL Y REACTIVOS:

- Extractor de grasa Goldfisch, LABCON CO.
- Cartuchos de celulosa Whatman 22x88mm.
- Rotavapor Büchi, 461, modelo RE-111
- Centrifuga Dynac.
- Incubadora bacteriológica, BLUE M.

- Espectrofotometro COLEMAN, Junior II-A.
- Tubos de centrifuga de 15ml con graduación.
- Jeringa de 5 o 10ml # 22.
- *Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).*
- Filtro de vidrio poroso
- Solución de metanol (R A.) y agua destilada al 85% (v/v).
- Sangre de conejo desfibrinada y lavada.
- Solución anticoagulante (a).
- Solución salina al 1%.
- Solución salina al 0.9%.
- Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b).
- Tripsina de pancreas de porcino (Sigma t-8128).
- Solución estándar de saponinas al 0.5% en solución salina (c)

(a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea *solución de heparina* o *citrate*, las cuales se usan en la siguiente relación.

Sol. Heperina:sangre = 15- 20UI: 1ml sangre

Sol. de citrato:sangre = 0.1 ml. 1ml sangre

Sin embargo, si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1:1 o sea 1ml de solución ELSEVER por 1ml de sangre fresca.

(b) Se usa tripsina de páncreas de porcino (Sigma t-8128).al 0.1% en solución salina al 0.9%, para el proceso de sensibilización;

(c) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroidal) y un extracto de quillaja (saponina tipo triterpenoide).

METODOLOGIA:

a) Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida (y desengrasada si el caso lo amerita) ya desengrasada se pesan 7.5g en el cartucho de celulosa, se colocan en los portadedales y en el extractor Goldfish. La extracción se realiza a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol-agua (85.15) como solución extractora de las saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se concentra a sequedad en el rotavapor, a una temperatura aproximada de 65°C, la muestra se redisuelve con solución salina 0.9% y se filtra con ayuda de vacío para aforar a 100ml con la misma solución. Si no se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar o congelar para evitar contaminación.

b) Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante. (No interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 rpm (50U) durante 10 min. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada mililitro de glóbulos rojos 24ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1ml de solución de tripsina al 0.1% (en solución salina) y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C.

Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5%, por lo cual cada mililitro de paquete de eritrocitos se le adicionan 19ml de solución salina 0.9%.

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario separarlos de esta suspensión, para lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocado dentro de un embudo de cuello corto.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 1ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4ml de solución salina al 0.85%. Se lee el espectrofotómetro a 620nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1cm² de luz y como blanco solución salina al 0.85%.

La lectura que se debe obtener será de 25% \pm 1 de transmitancia, en caso contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "U" del microtiter, colocar, en cada pozo una hilera de 50 μ l de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo. (fig 13 y 14).

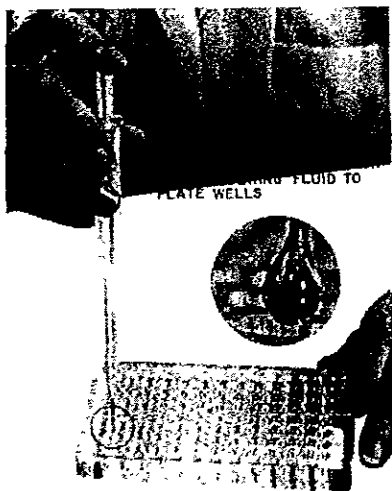


Figura No. 13.

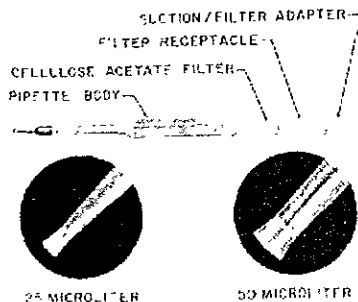


Figura No. 14.

A continuación llenar el microdilutor de 50 μ l (fig. 15) por contacto con la superficie del extracto problema o de estándar de saponinas para proceder a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Se elimina el residuo de la última dilución

NOTA Es recomendable checar que el volumen que esté tomando nuestro microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza con solución salina en una placa de prueba. (fig. 16)

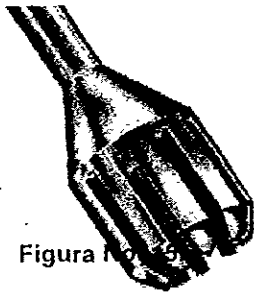


Figura No. 15

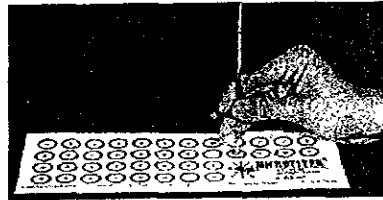


Figura No. 16.

Figura No. 15

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50 μ l de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada teniendo también un control negativo con solución salina 0.9% sin extracto problema y otro positivo con solución salina 0.9% y el estándar de saponinas al 0.5% en solución salina. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C por espacio de 1 hora. (fig. 17).

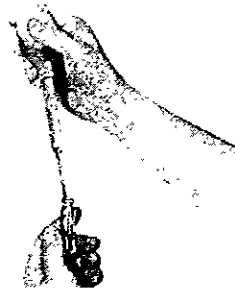


Figura No. 17.

f) Lectura

Una vez transcurrido el tiempo, se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura (fig 18). Se localiza en la placa, el número que corresponde al último pozo donde se aprecia hemólisis y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

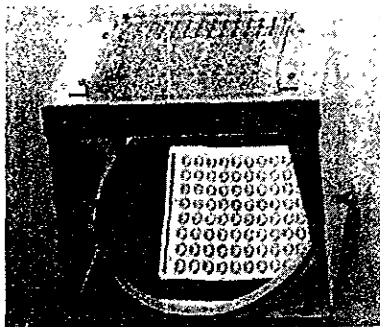


Figura No. 18.

CALCULOS:

Las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H /mg de muestra), lo cual se explica de la siguiente forma.

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar; si en la microtitulación se toman 0.05ml, se tiene entonces una concentración de 0.25mg de saponina en dicho volumen.

En una dilución seriada se tiene la fórmula:

Concentración del extracto

2^t

t= título de hemólisis

Si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el título de hemólisis, entonces en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$\frac{0.25\text{mg}}{2^8} = 0.001\text{mg} = 1\mu\text{g}$$

por definición 1 μg del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.).

El cálculo para las muestras es:

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75mg/ml, en 0.05ml tenemos 3.75mg; para un título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

$$\frac{3.75}{2^1} = 1.875\text{mg de muestra}$$

Por definición se obtienen las Unidades Hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg de muestra).

$$\frac{10 \text{ U.H.}}{1.87 \text{ mg de muestra}} = 5.3 \text{ U.H /mg de muestra}$$

4.3.8 Taninos.

FUNDAMENTO:

Se realiza una extracción de los taninos presentes en la muestra con una agitación con dimetilformamida para después centrifugar y adicionar citrato férrico amoniacal y amoniaco a una alícuota de sobrenadante para desarrollar color y leer absorbancia de la solución obtenida en espectrofotómetro a 525nm. Se determina el contenido de taninos usando una curva patrón preparada con ácido tánico.

MATERIAL Y REACTIVOS.

- Centrifuga, DYNAC.
- Tubos para centrifuga de 50ml con tapón
- Agitador magnetico.
- Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer.
- Baño de agua, GRANT, mod. SE-10.
- Espectrofotometro, SEQUOIA-TURNER, mod 340
- Solución de referencia de ácido tánico (a).
- Amoniac (b).
- Dimetilformamida (c).
- Citrato férrico de amonio (d).

(a) Se prepara una solución estándar de referencia en la cual se pesan 0,2g de ácido tánico y se afora a 100ml con agua desionizada.

(b) Se pesan 0.232 g de hidróxido de amonio (NH_3) y se aforan en 100ml de agua desionizada

(c) Se debe preparar una solución al 75% (v/v), para lo cual se vierten 75ml de dimetilformamida en un matraz volumétrico de 100ml. Diluir con agua desionizada, dejar enfriar y llevar a la marca de aforo.

(d) Se requiere un contenido de fierro de entre 17 – 20 %, por lo cual se pesan 0.35g de citrato férrico de amonio (Sigma # F-5879) y se afora a 100ml con agua desionizada. Preparar 24 horas antes de usarse.

PROCEDIMIENTO

A Preparación de curva patrón

- 1 Preparar 7 matraces volumétricos de 25ml y usando micropipetas añadir 1,2,3,4,5,6 y 7 ml respectivamente de la solución estándar de ácido tánico, llevando a la marca de aforo con la solución de dimetilformamida. La escala así obtenida corresponde a 2,4,6,8,10,12 y 14 mg de ácido tánico respectivamente.
2. Rotular 8 tubos de ensayo correspondiendo el No.1 al blanco de la curva, al cual se le adiciona 1ml de la solución de dimetilformamida. Los restantes corresponden a los puntos de la curva a los cuales se les adiciona respectivamente 1ml de las soluciones de ácido tánico preparadas anteriormente. El intervalo obtenido es de 80 a 560 μg de ácido tánico.
- 3 Añadir 5ml de agua a cada tubo y mezclar unos segundos. Después añadir 1ml de solución de citrato férrico amoniacal, mezclar y posteriormente añadir 1ml de solución de amoniaco. (tabla No. 6).

Tabla No. 6.

Tubo	Sol. ácido tánico (2-14mg) (ml)	Agua (ml)	Citrato férrico amoniacal (ml)	Amoniaco (ml)
1 (Blanco)	----*	5	1	1
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1
4	1	5	1	1
5	1	5	1	1
6	1	5	1	1
7	1	5	1	1
8	1	5	1	1

*En vez de sol. de ácido tánico se agrega 1ml de dimetilformamida al 75%

4. Después de la última adición, agitar en baño a temperatura controlada y mantener $10\text{min} \pm 1\text{min}$ a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo de color
5. Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 525nm
6. Trazar la gráfica de absorbancia vs concentración de ácido tánico expresada como μg de ácido tánico.

B. Obtención del extracto.

1. Pesar de 0.3 a 1g de muestra y pasar a un vaso de precipitado de 50ml
2. *Disolver con 20ml de dimetilformamida medidos con probeta y agitar moderadamente en agitador magnético durante $60 \pm 3\text{min}$.*
3. Transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25ml, enjugando el vaso y magneto 3 veces con porciones de 1ml cada una, de la solución de dimetilformamida. Llevar a la marca de aforo con el mismo reactivo, homogeneizar y transferir a un tubo de centrifuga de 50ml, tapar el tubo y centrifugar a 2700rpm (correspondientes a 100 U en la centrifuga Dynac) por $10\text{min} \pm 1$.
4. Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitado y homogeneizarlo

C. Determinación:

Una vez obtenido el extracto de la muestra problema, rotular como mínimo 3 tubos de ensayo (uno correspondiente al blanco y los restantes al problema, llevandose a cabo la lectura por duplicado como mínimo).

Añadir los diferentes reactivos, de acuerdo al orden propuesto en la tabla No.

7. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

Tabla No.7

Tubo	Muestra (ml)	Agua (ml)	Citrato férrico amoniacal (ml)	Amoniaco (ml)
1 (Blanco)	1	6	1	---
2	1	5	1	1
3	1	5	1	1

Después de la última adición, agitar e introducir en baño de temperatura controlada y mantener 10 ± 1 min a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para permitir el desarrollo óptimo de color.

Transferir a celdas de medición y leer en espectrofotómetro a 525nm.

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón determinar el contenido de taninos y reportar como % de ácido tánico

4.4 Tratamiento térmico.

En base a la información obtenida en el paso previo, de encontrarse un contenido significativo de tóxicos termolabiles, se procedió a someter las almendras a un proceso térmico, de preferencia similar al que se realiza en los lugares donde se consumen; pero si no se cuenta con esta información, se expuso a un tratamiento con calor húmedo. Para observar como funcionó este proceso, será necesario volver a determinar el contenido de estos tóxicos en el material procesado. (Jaffé et all 1972, Leopold et all 1974)

4.4.1 Tratamiento térmico a la almendra de capulín.

4.4.1.1 Tratamiento con calor húmedo (en autoclave)

Se pesaron aproximadamente 15g de semilla de capulín, las cuales se pusieron en un vaso de precipitado y se pusieron en el autoclave a 15 libras de presión por 30 minutos, después se extrajo la almendra se molió y se desengraso.

Debido a que se conoce que en ciertas regiones se consume la almendra de capulín asada se realizó este tratamiento

4.4.1.2 Tratamiento de tostado.

Se pesaron aproximadamente 15g de semilla de capulín, estas se tostaron en un comal que aproximadamente alcanza 200°C, durante 5 minutos. Este tratamiento se lleva a cabo ya que se sabe que en ciertas regiones la almendra del capulín es consumida de esta manera, bajo condiciones similares. Después del asado se extrajo la almendra, se molió y se desengraso.

4.4.2 Tratamiento térmico a la almendra de mamey.

4.4.2.1 Tratamiento con calor húmedo (en autoclave)

Se pesaron aproximadamente 15g de semilla de mamey, las cuales se pusieron en un vaso de precipitado y se pusieron en el autoclave a 15 libras de presión por 30 minutos, se molió y se desengraso.

4.5 Digestibilidad “in vitro”. (AOAC 1990)

FUNDAMENTO:

Durante la proteólisis, protones son liberados por la ruptura de enlaces peptídicos, resultando en un decremento del pH en una suspensión. Asumiendo una correlación entre la liberación peptídica y la digestibilidad de la proteína, esta última puede ser evaluada por el registro de la disminución del pH.

MATERIAL Y REACTIVOS:

- Baño GRANT, mod SE 10
- Potenciómetro, CORNING, phmeter 430.
- Parrilla de agitación CORNING, mod PC-351.
- HCl
- NaOH
- Caseinato de Sodio.
- Solución A (a).
- Solución B (b).

(a) Pesar 13.645mg de tripsina (tipo IX), 36.47mg de α -quimotripsina y 5.098mg de peptidasa. Aforar a 10ml con agua destilada y llevar a un pH 8 ± 0.03 .

(b) Pesar 11.818mg de proteasa (pronasa E). Aforar a 10ml con agua destilada y llevar a pH 8 ± 0.03 .

PROCEDIMIENTO:

Conociendo la cantidad de proteína en la muestra analizar, pesar una muestra o control con un contenido de 10mg de nitrógeno.

Aplicar la cantidad apropiada de proteína control, caseinato de sodio o muestra en un vial etiquetado con una barra magnética. Adicionar 10ml de agua y dejar por una hora.

Usando un potenciómetro en un baño a 37°C y agitando, equilibrar la muestra y el control a $\text{pH } 8 \pm 0.03$ a 37°C con adiciones de HCl y NaOH. En este tiempo también equilibrar las soluciones enzimáticas a $\text{pH } 8 \pm 0.03$ a 37°C y luego pasarlas a hielo. Mantener la muestra a 37°C.

Una vez equilibrado el vial, adicionar 1ml de solución A mientras se agita. Exactamente 10min después, agregar 1ml de solución B y llevar el baño a 55°C. Exactamente a los 19min de haber agregado la solución A regresar el vial al baño de 37°C. Leer el pH a los 20 minutos exactamente el pH de la caseína debe ser de 6.42 ± 0.05 , por tanto dando un valor de digestibilidad de 90%.

CALCULOS:

Para calcular la digestibilidad se usa la siguiente fórmula.

$$\% \text{Digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (\text{pH})$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En todos los resultados se considera la cantidad de grasa de cada muestra que se observa en la Tabla No.1

Las determinaciones se realizaron por triplicado y algunas por duplicado reportando el promedio de éstas.

5.1 Factores termolabiles

5.1.1 Inhibidores de Tripsina.

UT = El incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410nm. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (UTI)

5 1 1 1 Almendra de capulín.

Tabla No. 8. CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN CAPULÍN

UTI /mg de muestra		
Sin tratamiento térmico	Tratamiento en autoclave (15lb 30min)	Tratamiento de asado (200°C 5min.)
11.713	3.659	3.348

Aunque la almendra de capulín presento inhibidores de tripsina, su contenido no es alto, si lo comparamos con granos donde este tipo de factor tóxico es relevante, como se observa en la figura No 19. Con el tratamiento térmico se obtuvo un 70% de reducción como se observa en la tabla No. 8 y gráficamente en la figura No 20.

5.1.1.2 Almendra de mamey.

Tabla No. 9. CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN MAMEY.

UTI /mg de muestra	
Sin tratamiento térmico	Tratamiento en autoclave (15lb 30min)
4.25	2.675

En la tabla No. 9 se muestran los valores del contenido de inhibidores de tripsina en el mamey, en la figura No. 19, vemos la comparación del contenido de este factor con el de la soya, que da la idea del bajo contenido de este antinutricional en el mamey. En la figura No. 20 se observa el efecto del tratamiento térmico en el contenido de inhibidores, resultando estos sin significancia toxicológica.

5.1.1.3 Almendra de napahuite.

Tabla No. 10. CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN NAPAHITE.

UTI /mg de muestra
Sin tratamiento térmico
1.654

En la tabla No. 10 tenemos el valor del contenido de inhibidores de tripsina en el napahuite, en donde se ve que es la muestra con menor cantidad de este factor, no se realizó ningún tratamiento térmico ya que se observa un valor muy bajo de inhibidores

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA EN VARIAS MUESTRAS

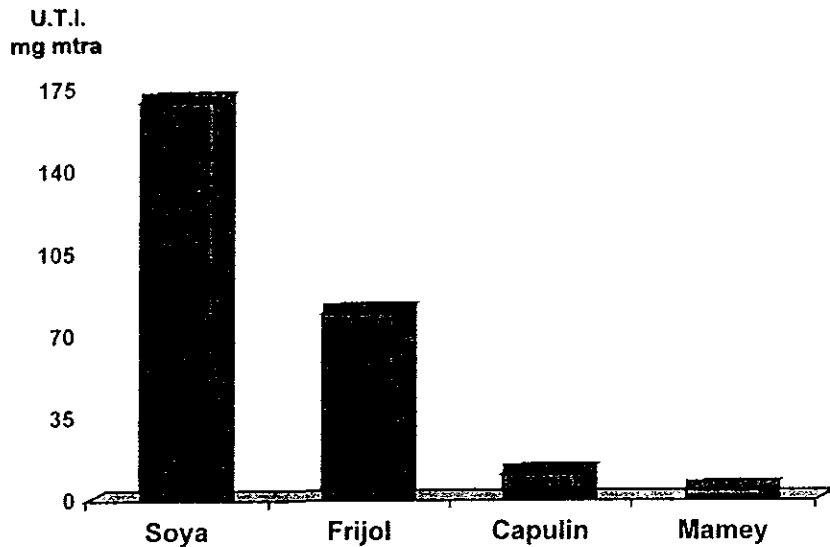


Figura No. 19.

COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE INHIBIDORES DE TRIPSINA A DIFERENTES TRATAMIENTOS TERMICOS.

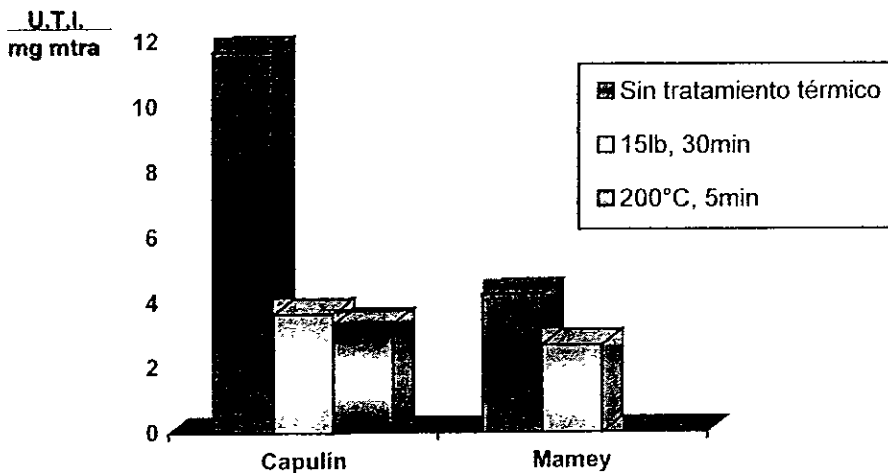


Figura No. 20.

5.1.2 Lectinas.

Se reporta el titulo que es la máxima dilución que presenta aglutinación.

5.1.2.1 Almendra de capulín.

Tabla No. 11. CONTENIDO DE LECTINAS EN CAPULÍN

Titulo		
Sin tratamiento térmico	Tratamiento en autoclave (15lb 30min)	Tratamiento de asado (200°C 5min.)
6	1	2

Se considera un contenido alto de lectinas, aquellas muestras con un titulo igual o mayor a 10. De la tabla No 11, se observa que la almendra de capulín aún sin tratamiento térmico presenta un valor menor por lo cual no representa un riesgo a la salud. En la figura No. 21 se observa que con el tratamiento térmico en autoclave se logra disminuir significativamente el contenido de este factor tóxico.

5.1.2.2 Almendra de mamey.

Tabla No. 12. CONTENIDO DE LECTINAS EN MAMEY

Titulo	
Sin tratamiento térmico	Tratamiento en autoclave (15lb 30min)
4	1

En la tabla No. 12 se puede observar que el titulo en la muestra de almendra de mamey es bajo por lo que no hay riesgo a la salud y en la figura

No 21 se ve que con un tratamiento térmico casi se eliminan las lectinas de esta muestra

5 1.2.3Almendra de napahuite.

Tabla No. 13. CONTENIDO DE LECTINAS EN NAPAHUITE.

Titulo
Sin tratamiento térmico
2

En la tabla No. 13 vemos que el titulo de la muestra de napahuite es muy bajo por lo que no se realizó ningún tratamiento térmico ya que casi no hay presencia de lectinas en esta muestra

COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE LECTINAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS TÉRMICOS.

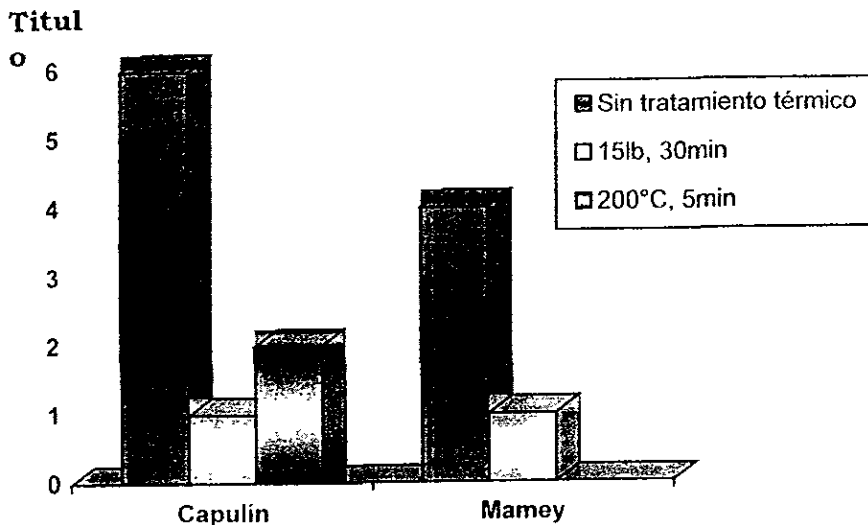


Figura No. 21.

5.2 Factores termoestables.

5.2.1 Alcaloides.

Por tratarse de una técnica cualitativa únicamente se reporta presencia o no de alcaloides en las muestras.

Tabla No. 14. PRUEBA DE ALCALOIDES

	Presencia de Alcaloides
Capulín	Negativa
Mamey	Negativa
Napahuite	Negativa

Según la metodología aplicada, no se encontraron alcaloides libres en ninguna de las tres muestras

5.2.2 Glucósidos cianogénicos.

Tabla No. 15. CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS

	Glucósidos cianogénicos (mg HCN/ 100g mtra.)
Capulín	198.17
Mamey	61.718
Napahuite	-----

En la tabla No. 15 observamos los valores de la cantidad de glucósidos cianogénicos en las tres muestras, para el caso del napahuite se sabe que la sensibilidad de esta metodología es de 1mg de HCN/100g de muestra, por lo que

podría tener una cantidad menor al límite de detección de la metodología, pero lo anterior nos indicaría que la muestra no tiene riesgo en el contenido de este tóxico

En la figura No. 26 se marca el límite permitido de HCN/ 100g de muestra, observando que el capulín y el mamey sobrepasan por mucho este límite, por lo que este tóxico sí representa un riesgo para la salud en las almendras de capulín y mamey

COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS DE VARIAS MUESTRAS, ASÍ COMO EL LÍMITE PERMITIDO^{9 1}

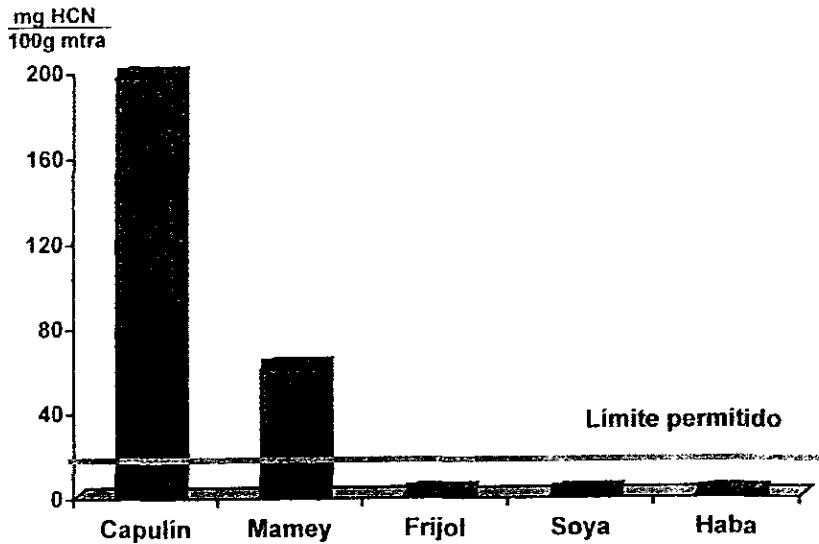


Figura No. 26.

5.2.3 Fitatos.

Tabla No. 16. CONTENIDO DE FITATOS

	Fitatos (mg de P de Fitato/100g de muestra)
Capulín	227.58
Mamey	19.236
Napahuite	222.24

En la tabla No. 16 se observan los valores del contenido de fitatos en las tres muestras, siendo el capulín y el napahuite los valores más altos. Se sabe que a valores arriba de 400mg de ácido fitico/100g (Derache 1990) se aumenta la pérdida fecal de calcio y además puede quedar fuertemente reducida la utilización digestiva de oligoelementos (Cu, Zn, Mg, Fe), en la figura No. 27 se observa que en el caso del capulín y napahuite se recomienda no exceder la cantidad de 200g para no llegar a este valor, por debajo de esta cantidad de ácido fitico no hay riesgo a la salud. También se observa en esta figura la comparación con otros alimentos que su contenidos de fitatos en 100 gramos de muestra, rebasan los 400mg de ácido fitico considerándose alimentos desmineralizantes.

Para el caso del mamey el contenido de ácido fitico presente es muy bajo por lo que se considera que los fitatos no representan un problema en esta muestra.

COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ACIDO FITICO EN VARIAS MUESTRAS

mg de P de Fitato
100g de muestra

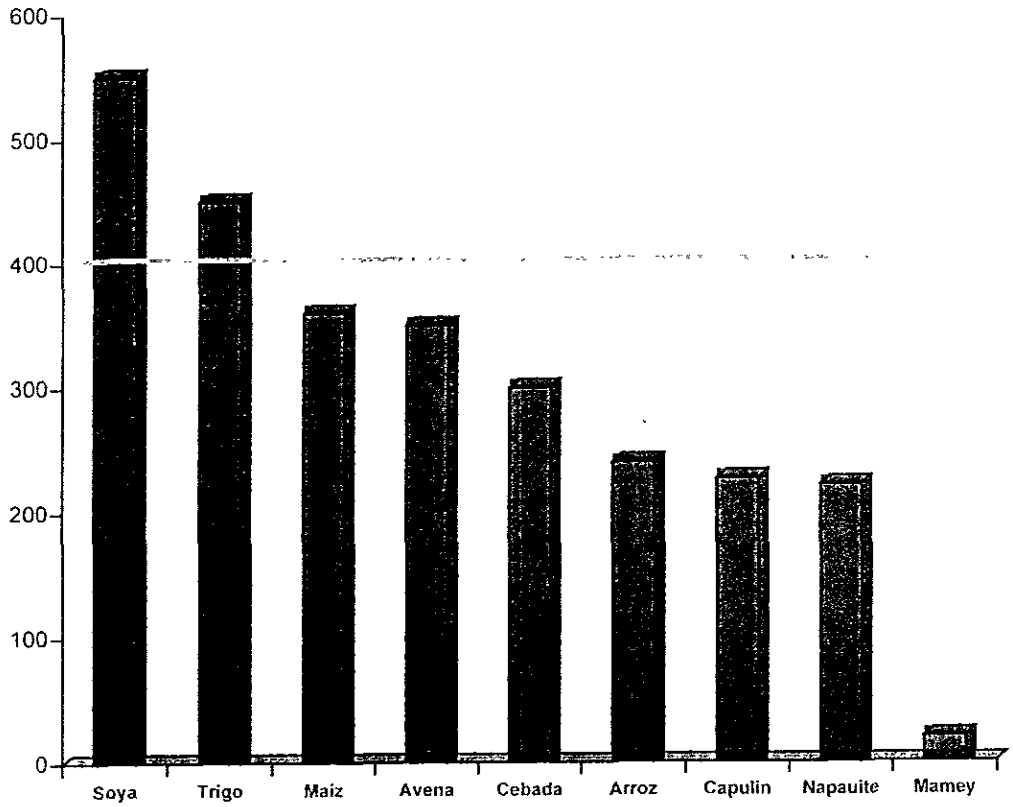


Figura No. 27.

5.2.4 Oxalatos.

Tabla No. 17. CONTENIDO DE OXALATOS

	Oxalatos (mg de ác. Oxálico/100g de mtra)	Relación: ác. Oxálico/Calcio (mg/100g/mg/100g)
Capulín	-----	-----
Mamey	191.84	1.33
Napahuite	-----	-----

El mínimo de detección de la metodología es de 140mg de ácido oxálico, por lo que las muestras de capulín y napahuite que, como se muestra en la tabla No 17 dieron esta prueba negativa, pudieran tener una cantidad menor a esta sin poderse observar.

Para el caso del mamey observamos en esta tabla que el contenido encontrado es muy bajo además conociendo su relación de ácido oxálico/calcio podemos ver que no es riesgosa dicha cantidad, ya que observamos en la figura No 28 que, se consideran alimentos descalcificantes aquellos que tienen una relación superior a 2.25 (Derache 1990), observando que el mamey a diferencia del riubarbo, espinaca o cacao no alcanza dicho valor, por lo que no hay peligro de descalcificación por la presencia de oxalatos en el mamey.

COMPARACIÓN DE LA RELACIÓN ÁCIDO OXÁLICO/CALCIO EN VARIAS MUESTRAS

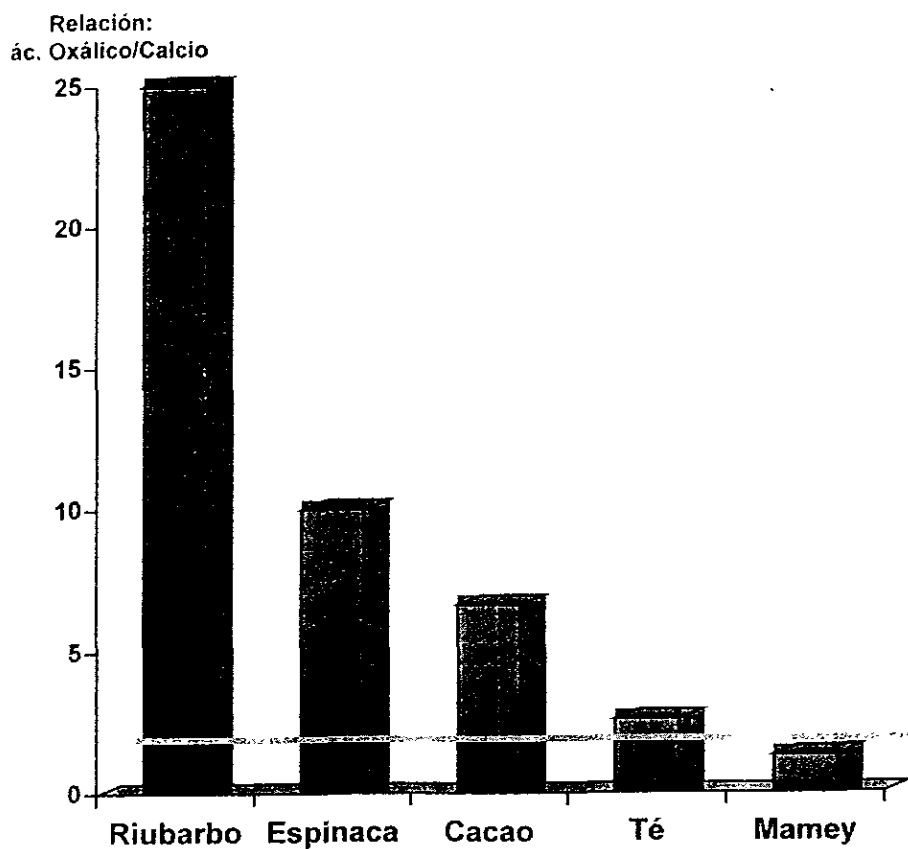


Figura No. 28.

5.2.5 Saponinas.

U.H.= 10Unidades Hemolíticas = 1 μ g de estandar de saponinas

Tabla No. 18. CONTENIDO DE SAPONINAS

	Saponinas (U.H./mg de muestra)
Capulín	-----
Mamey	21.3
Napahuite	5.3

La tabla No. 18 nos muestra los valores de la cantidad de saponinas presentes en las muestras, para el caso del capulín no se observó hemólisis de la sangre por lo que se consideran ausentes las saponinas en esta muestra.

En la figura No. 29 se observan que aunque la cantidad de saponinas en el mamey es considerable, existen alimentos con mayor contenidos de este factor antinutricional, como es el caso del haba, aún así no se considera una muestra riesgosa ya que la toxicidad de las saponinas es discutida. El napahuite es una muestra con bajo contenido de saponinas

COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE SAPONINAS EN VARIAS MUESTRAS

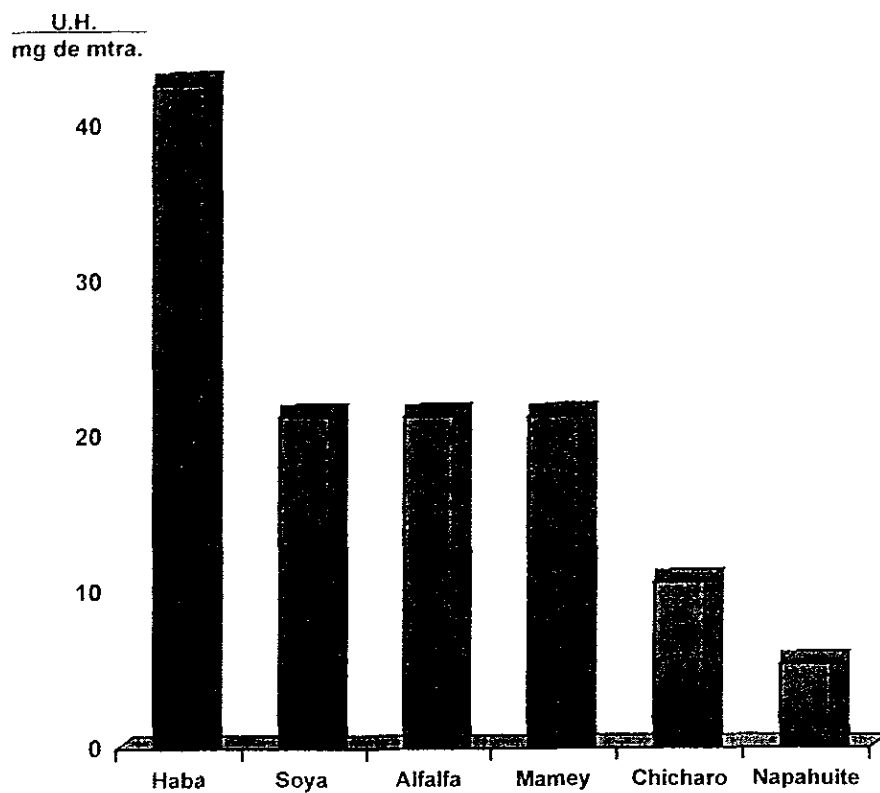


Figura No. 29.

5.2.6 Taninos

Tabla No. 19. CONTENIDO DE TANINOS.

	Taninos (mg de ácido tánico/100g de muestra)
Capulín	56.25
Mamey	3460.51
Napahuite	191.38

En la tabla No 19 se observan los valores del contenido de taninos en las muestras estudiadas, destacando notablemente el valor de la almendra de mamey siendo un valor mucho más alto que los otros dos, aun así este alimento no es tóxico con algunas limitantes ya que se sabe de la bibliografía que la dosis diaria admitida (DDA) del ácido tánico es de 500mg / día ^(Derache 1990) esto implica que para una persona de 70kg considerando una ingesta del 30% de la DDA solo podría consumir 10.5g de ácido tánico diarios por lo que se debe restringir el consumo de la almendra de mamey a máximo 300g / día para una persona adulta de 70kg ya que de lo contrario el ácido tánico puede disminuir la absorción de proteínas ocasionando problemas de digestibilidad. En el caso de los niños (aproximadamente hasta los 10kg) esto se limita a 43g/día máximo.

En el caso del napahuite dado a la baja cantidad que presenta se puede consumir sin causar ningún riesgo a la salud.

El contenido de ácido tánico en el capulín es casi inocuo para este factor tóxico.

5.3 Digestibilidad "in vitro".

Se observan en la figura No 30 los valores de digestibilidad de las tres muestras Sin tratamiento térmico las tres muestras presentan un nivel alto de digestibilidad siendo el menor valor el del mamey.

A las muestras de capulín y mamey que fueron sometidas a un tratamiento térmico también se les evaluó la digestibilidad, no teniendo una diferencia significativa.

PORCIENTO DE DIGESTIBILIDAD EN LAS TRES MUESTRAS ANTES Y DESPUÉS DE UN TRATAMIENTO TERMICO Y COMPARACIÓN CON OTRAS MUESTRAS

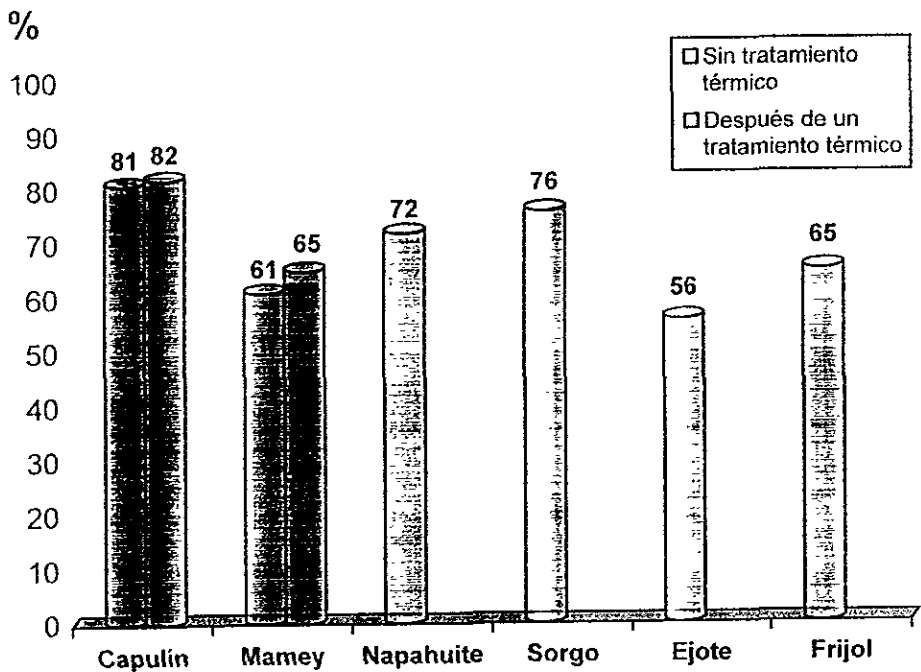


Figura No. 30.

6. CONCLUSIONES

6.1 Almendra de capulín.

- ⊗ Esta muestra aunque fue la que contenía mayor cantidad de inhibidores de tripsina y tuvo el título más alto en la prueba de lectinas, no alcanzan niveles riesgosos en estos factores; además de comprobar la disminución de estos factores al realizar un tratamiento térmico con calor húmedo y otro de asado ya que se sabe que así es consumido en ciertas regiones de nuestro país.
- ⊗ En el aspecto de los factores termoestables, presentó un nivel muy alto de glucósidos cianogénicos lo cual implica estudiar un proceso de destoxificación ya que, representa un riesgo a la salud.
- ⊗ Con respecto al contenido de fitatos, se recomienda no ingerir más de 200g de almendra ya que arriba de esta cantidad, por la cantidad de ácido fitico presente se convertiría en un alimento desmineralizante, solo considerando este factor tóxico.
- ⊗ Los demás factores tóxicos o antinutricionales no representan riesgo alguno.
- ⊗ La digestibilidad fue la más alta y no aumentó significativamente después del tratamiento térmico.
- ⊗ De estudios previos sabemos que la proteína de capulín es deficiente en aminoácidos azufrados por lo cual debe ser complementada.
- ⊗ Para esta almendra podemos concluir, que es necesario eliminar los glucósidos cianogénicos ya que por su alta digestibilidad puede ser considerado un alimento alterno después de destoxificarlo; también se debe contemplar la eliminación o disminución del contenido de fitatos
- ⊗ Cuando la almendra es consumida como botana, no representa riesgo toxicológico ya que la proporción consumida es mínima y no de riesgo.

6.2 Almendra de mamey.

- ⊗ Lo más importante de esta semilla es su alto contenido de grasa, por lo que es utilizada ampliamente en cosméticos.
- ⊗ Esta muestra no presenta gran cantidad de factores termolábiles, por lo que no representa riesgo en este aspecto, además de que al realizar un tratamiento térmico estos disminuyen notablemente.
- ⊗ Al igual que en la almendra de capulín, la de mamey tiene gran cantidad de glucósidos cianogénicos, por lo que es necesario detoxificarla para evitar un daño a la salud.
- ⊗ También esta almendra presenta gran cantidad de taninos. por lo cual se recomienda estudiar la eliminación de este factor o no ingerir más de 300g para no rebasar la dosis diaria admitida de ácido tánico en el caso de un adulto y 43g en el caso de niños.
- ⊗ La digestibilidad de esta muestra fue la menor, pero aun así puede considerarse aceptable.
- ⊗ De estudios previos sabemos que la proteína de mamey es deficiente en triptofano y aminoácidos azufrados, por lo cual debe ser complementada.
- ⊗ Para considerar esta almendra como alimento alternativo es necesario eliminar o disminuir los glucósidos cianogénicos y tener en cuenta las recomendaciones, debido a la alta cantidad de ácido tánico

6.3 Almendra de napahuite.

- ⊗ La cantidad de factores termolábiles encontrados en esta muestra fueron muy pequeñas por lo que no representan riesgo alguno.
- ⊗ La digestibilidad de esta muestra es buena.
- ⊗ De estudios previos sabemos que la proteína es deficiente en triptofano, por lo que se debe complementar.
- ⊗ Únicamente siguiendo la recomendación, debido a la cantidad de ácido fítico presente en la muestra, esta almendra no tiene ningún impedimento para considerarse una fuente alternativa de proteína y grasa.

7. BIBLIOGRAFIA:

- 1. Abisch, E. and Reichstein, T. (1960). Alkaloid screening (micromethod). *Helv. Chem. Acta* 43, 1884-1861
- 2. Akbson, W.B. and Stahman, M (1964). A pepsin-pancreating digested of protein quality. *J. Nutr* 83, 257-261.
- 3. AOAC Official methods of analysis (1990). *Association of Official Analytical Chemists, Inc.* 15th edition, Vol II, pp. 1095-1098 , Arlington.
- 4. Bermejo, J.E. y León J. (1992). Cultivos marginados (otra perspectiva de 1492). *FAO, colección de producción y protección vegetal No. 26*, pág. XIX-XXII, 3-33, 40, 41 y 61-69, Roma.
- 5. Boisen, S. and Eggum, B. O., (1991). Critical evaluation of "in vitro" methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutr. Res. Rev.* 4: 141- 162.
- 6. Bostid, F. R. (1989) *Lost crops of the Incas*. National Academy Press, pp 162-189. Washington D.C.
- 7. Campbell.C.W. (1967) *The Mamey Sapote In Southern Florida*. Fla State Hort. Soc. Proc 80: 318-320
- 8. Castillo, J.C. (1997). Caracterización bromatológica de varias semillas de frutos con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D F
- 9. Clavert, M.A , Dinole, J.T. and Lucy, J.A., (1967) Action of saponins on biological cell membranes *Nature* 196, 952-955.
- 10. Conn, E E. (1980). Cyanogenetic glycosides In: *Toxicans occurring naturally in foods*. Comité on food protection National Academy of Science. 2nd. Edition pp-299-308. Washington D.C.
- 11. Contreras S., Araya H., Pak N. y Tagle A. M , (1972) Factores tóxicos de leguminosas cultivadas en Chile. *Arch Lat. de Nutr.* pp. 251-259.
- 12. Comisión Nacional de Alimentación. (1990). Encuesta nacional de alimentación en el medio rural, 1989. Publicación de la División de Nutrición del INNSZ L-86, México D.F.

1. Derache R , (1990) Toxicología y seguridad de los alimentos, Ed. Omega, pag. 111- 121 Zaragoza
2. Escalante, O (1989). Cinética de deshidratación de mamey (*Calocarpum sapota*) Tesis de licenciatura. Escuela de Química Universidad Motolinia, A.C: México D.F.
3. Espinosa, M. (1994) Desarrollo de un método general para determinar el contenido total de glucosinolatos en crucíferas.. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
4. Esquinas, J.A. (1983). Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid.
5. Fabre, R y Truhant ,R (1976). Tratado de toxicología. Paraninfo S.A. Madrid vol, 1, pp.48-60, 311-332.
6. FAO. (1980). Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO, colección Alimentación y Nutrición No. 2, pág. 30-35, Roma.
7. FAO (1993). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. FAO, colección de agricultura No. 26, pág. 122-144, Roma
8. Fassett, D. W., (1973) Oxalates In: Toxicants occurring naturally in food, (ed) National Academy of Science, pp 346-362, Washington D.C.
9. Feeney, R.E., Means, G :E. and Bigler, J . C. (1969). Inhibition of human trypsin plasmin and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes, J. Biol. Chem. 244, pp 1957-1960
10. Ferrando, F (1980). Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO, colección de alimentación y nutrición No. 2, pág. IX-XI y 83-130, Roma.
11. Girón, M. (1992). Determinación semicuantitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis, Facultad de Química, UNAM, México, D. F.
12. George, A.J., (1965) Legal status and toxicity of saponins. Food Cosmet Toxicol. 38, 85-91.
13. Goodwin, T.W. & Mercer, E.I., (1974) Introduction to Plant Biochemistry, Pergamon Press, pp293-308, N.Y..

- 103 Haborne, B., Bouter, D. and Turner, B, I, (1971), Chemotaxonomy of the leguminosae. Academic press, pp.125. London.
- 104 Hughes D.W. & Genest K., (1973) Phytochemistry (Alkaloids), Miller, L.P. (Editor) Van Nostrand Reynold Co. Vol II, pp 118-170, N.Y..
- 105 Jaffé, W. G. (1968). Factores tóxicos en leguminosas. Arch. Lat. de Nutr, 18, 205-218.
- 106 Jaffé, W G. ; Brucker, (1972). Toxicidad y especificidad de las diferentes fitohemaglutininas de frijoles- Arch. Lat. de Nutr.22 : 267-281.
- 107 Jaffé, W G. (1973) Toxic proteins and peptides in toxicants occurring naturally in foods. Comité on food protection National Academy of Science. 2nd. edition pp. 108-123 Washington D C.
- 108 Jenkins, G., Dumez, A., Hager, (1951).G., Química Farmacéutica Cuantitativa, Ed. Atlante S.A. pp 396-447, México, D.F
- 109 Kakade, M, Rackis, J., McGhee, J. and Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a colaborative analysis of the improved procedure. Cereal Chem. 51, 518-526.
- 110 Leopold, A.C. and Andrey, R. (1974). Toxic substances in plant and the food habits of early man. Science 176, 512-514.
- 111 Liener. I. E. (1975). Effects of antinutritional and toxic factors ion utilization of legume proteins, in protein nutritional quality of foods and feeds. Friedman, M. Editorial Marcer Dekker . Inc. Vol. 2, pp. 523-550, N.Y.
- 112 Liener, I.E. (1980). Toxic constituents of plant foodstuffs Academic Press, pp 1-5, 7-102 and 143-263, N.Y.
- 113 Lindner, E. (1980). Toxicología de los alimentos. Acribia. España. pp. 1-39. Zaragoza.
- 114 Liu, K. And Markakis, P. (1989). An improved colorimetric method for determination antitryptic activity in soybena products. Cereal Chem. 66, 415-422.

- Lucas, B. and Sotelo, A. (1993). A useful modification of the hemagglutination method for the screening of lectins in legume seeds. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Pres. EAAP publication 70, pp 71-74, Wageningen.
- Lucas, B. and Sotelo, A. (1984). A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. Nutr. Rep. Int. 29, 711-719.
- Martínez, M., (1979) Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, pag. 71, 79, 157, 589. México.
- Martínez, M., (1979) Plantas útiles de la flora mexicana., Fondo de cultura económica, pag. 421, 422. México D.F.
- Muñoz, R.M. (1979). Determinación, taninos y acción antibiótica en algunas plantas silvestres. Tesis. Fac, Química. U.N.A.M., México, D.F.
- Melcion, J.P. and van der Poel, A.F.B.. (1993). Process technology and antinutritional factors: principles, adequacy and process optimization. In: Recent advances of research in ANFs in legume seeds. Van der Poel, A.F.B., Huisman, J. and Saini, H.S. (Editors). Wageningen Pers, EAAP publication # 70, pp. 419-434, Wageningen.
- Murphy D.J. (1994) Designer oil crops. Ed. VCH Publishers Inc., pp. 253-281, N.Y.
- Oberleas D., (1975) Phytates In: Toxicants occurring naturally in food. (ed) National Academy of Science pp. 363-371. Washington, D.C.
- Pelletier, S.W., (1982) Alkaloids: Chemical and biological perspectives, John Wiley & sons, pp 1-7, N.Y.
- Swaigood, H. E. and Catignani, G. L., (1991). Protein digestibility: "In Vitro" methods of assessment, Ad in Food and Nutr. Res., 35, 185-236
- Trápaga, Y y Torres, F. (Coordinadores). (1994). El mercado internacional de la agricultura orgánica. Instituto de investigaciones Económicas de la UNAM, pág. 11-44, México, D.F.
- Whitman, W. F. (1965) The green sapote, a new fruit for south FLA. Fla. State Hort Soc. Proc 78: 330-336.

- 13 Wolfgang H and Hans-Joachim L (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. J Sci. Food Agric. 34.1423-1426
- 14 Wu, W. Williams, W.P., Kunkel, M.E., Acton, J.C., Wardlaw, F.B., Huang, Y. and Grimes, L.W. (1994). Thermal Effects on in vitro protein quality of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). J Food Sci. 59, 1187-1191