

00528
73



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Evaluación bromatológica y determinación
de tóxicos naturales en la almendra de
calabaza (*Cucurbita argyrosperma*)
consumida en Cuetzalán, Puebla"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
NADIA MARGARITA PASCOE HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

A



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. Bernardo Lucas Florentino
Secretario	Prof. Lucía Cornejo Barrera
1º Suplente	Prof. Inés Miranda Martínez
2º Suplente	Prof. Rosa María Argote Espinosa

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto "E",
Facultad de Química, UNAM.



M. en C. Bernardo Lucas Florentino
Asesor



Q.F.B. Leticia Gil Vieyra
Supervisor técnico



Nadia Margarita Pascoe Hernández
Sustentante

B

DEDICADO :

A mis Papás Lidia y Enrique, por toda su paciencia, comprensión, cariño, y apoyo que siempre me han brindado. Por enseñarme todo aquello que se necesita para poder ser lo que hasta hoy soy. Los quiero mucho.

9

AGRADECIMIENTOS

- Al M. en C. Bernardo Lucas F., por brindarme el apoyo y la confianza para la realización de este proyecto.
- A la Q.F.B. Leticia Gil Vieyra, por su paciencia, asesoría y ayuda incondicional.
- A mis Papás, Lidia y Enrique por la inmensa confianza han depositaron en mí a lo largo de toda mí vida.
- A mi hermano, Ivan por apoyarme cuando lo necesite, en las buenas y en las malas.
- A mis amigas, Alicia Braun, Berenice Gaona y Claudia Luis por brindarme su amistad, apoyo incondicional.
- A las personas que forman parte del laboratorio 111, en especial a Rosita Argote y la señora Vicky.
- A Gustavo, por tu paciencia y gran ayuda brindada en los momentos tan importantes para mí.

D

Índice

1.- Resumen	1
2.- Objetivo	4
3.- Antecedentes	5
3.1 <i>Cucurbita argyrosperma</i>	7
3.1.1 Descripción botánica	7
3.1.2 Origen y domesticación	9
3.1.3 Usos y valor nutritivo	10
3.1.4 Aspectos fitogeográficos y Prácticas de cultivo	10
3.1.5 Factores antinutricionales en las semillas de <i>cucurbita</i>	11
3.2 Proteínas	12
3.2.1 Calidad de las proteínas	12
3.2.2 Digestibilidad proteínica	16
3.3 Grasas	17
3.3.1 Ácidos grasos indispensables	17
3.3.2 Aspecto energético y funcional en los alimentos	18
3.3.3 Factores físicos y químicos usados en la caracterización de grasas y aceites	19
3.3.4 Ácidos grasos comunes en los vegetales	22
4.- Metodología	23
4.1 Parámetros físicos	24
4.2 Caracterización bromatológica de la almendra	25
4.3 Desengrasado	27
4.4 Caracterización química	29
4.4.1 Perfil de aminoácidos	29
4.4.2 Determinación de triptofano	37
4.4.3 Calificación química	40
4.5 Digestibilidad <i>in-vitro</i>	40
4.6 Caracterización fisicoquímica del aceite crudo	43
4.6.1 Contenido calórico	51
4.7 Perfil de ácidos grasos	55
4.8 Toxicología analítica	57
5.- Resultados y discusión	91
5.1 Parámetros físicos	91
5.2 Caracterización bromatológica de la almendra	92
5.2.1 Proteína verdadera	93
5.3 Perfil de aminoácidos	93

E

5.3.1 Calificación química	94
5.4 Digestibilidad <i>invitro</i>	95
5.5 Parámetros fisicoquímicos	96
5.5.1 Contenido calórico	97
5.5 Perfil de ácidos grasos	98
5.7 Toxicología analítica	99
6.- Conclusiones	102
7.- Bibliografía	103
8.- Anexos	108

f

CAPITULO 1

♦ RESUMEN

Un factor intimamente relacionado con los alimentos, lo constituye la tasa de crecimiento poblacional. No obstante que ha habido un notorio aumento en la disponibilidad de los alimentos, tal incremento no ha ido aparejado al crecimiento poblacional. Esta escasez se magnifica en la población de menores recursos económicos, como son las comunidades rurales. Esta discrepancia en el suministro de alimentos y crecimiento de la población, se sigue ampliando; por lo cual es urgente realizar acciones tendientes a una solución, una de las cuales consiste es estudiar sistemáticamente aquellos alimentos de restringido consumo, que algunos autores denominan como alimentos "No convencionales".

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuente de nutrimentos para la alimentación humana y animal; sin embargo, estos recursos están subaprovechados. Como ejemplo particular, tenemos el caso de las calabazas que pertenecen al género *Cucurbita*.

En el país, el uso de la semilla de calabaza es común en ciertas regiones, pero en forma reducida, así, tenemos que en Cuetzalán, Puebla acostumbran consumir la almendra de dicha semilla como condimento de algunos preparados tradicionales; por lo tanto si se incrementara su consumo en cierta forma se ayudaría a mejorar la dieta básica de los habitantes de esta región, ya que es sabido que en estas

localidades se presenta una deficiencia proteínica-calórica.

En base a lo anterior, para el caso de la almendra de calabaza, y específicamente aquella que se consume en la comunidad de Cuetzalán, Puebla y que corresponde botánicamente a *Cucurbita argyrosperma* se inició su caracterización bromatológica, para conocer el potencial nutricional, del cual destaca su alto contenido de proteína y grasa; además de la determinación química de tóxicos y factores antinutricionales que con más frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal, como son: inhibidores de proteasas, lectinas, saponinas, entre otros. Referente a lo anterior, ya se han realizado investigaciones sobre algunas semillas de calabaza, sobresaliendo la no presencia de los tóxicos más comunes, o de tenerlos en niveles relativamente bajos, excepto ácido fítico por lo que para contrarrestar su efecto es necesaria una ingesta mayor de minerales en especial de hierro, sin embargo hay la posibilidad de una sobreestimación.

También se realizó la caracterización de ambas fracciones y se determinó que del perfil de aminoácidos, la fracción proteínica es deficiente en aminoácidos azufrados; además la proteína presentó una buena digestibilidad y excelente contenido energético (>6 Kcal/g mtra.); para la fracción lipídica los parámetros fisicoquímicos demostraron que la composición de ácidos grasos del aceite crudo de la calabaza es muy similar a los aceites comestibles del grupo oleico-linoleico, del perfil de ácidos grasos se encontró que el aceite presenta un alto porcentaje de ácidos grasos de cadena corta (ácido palmítico > 20%), así como un aporte calórico

> 9 Kcal/g mtra., todo esto se hizo con el fin de tener información química de este potencial vegetal.

CAPITULO 2

◆ OBJETIVOS

a) Objetivo General

Determinar el contenido de macronutrientes, factores tóxicos y antinutricionales, que permitan considerar a la semilla de calabaza de Cuetzalán, Puebla, como una fuente alternativa de proteína y grasa alimenticia.

b) Objetivos Particulares

- ◆ Caracterizar bromatológicamente a la almendra de calabaza (***C. argyrosperma***) en especial la fracción proteínica y lipídica, tanto en cantidad como en calidad.
- ◆ Predecir la biodisponibilidad de la fracción proteínica con índices químicos y ensayos *in-vitro*.
- ◆ Detectar y cuantificar la presencia de factores tóxicos y antinutricionales intrínsecos más comunes en los alimentos de origen vegetal en la almendra mencionada.

CAPITULO 3

◆ ANTECEDENTES

Desde sus inicios la humanidad ha sustentado una lucha continua por satisfacer sus necesidades primarias dentro de las cuales destaca la alimentación, actividad que seguirá siendo una de las principales del presente y futuro del hombre, y no obstante al gran desarrollo científico y tecnológico del género humano, paradójicamente se sigue presentando el problema del hambre y la desnutrición en una proporción importante de la población mundial (1,2).

En México el hambre y la desnutrición son un problema ancestral y no obstante que en las últimas décadas se ha presentado un aumento en la disponibilidad de los alimentos, gran parte de la población consume una dieta proteínico-calórica inadecuada, en especial en aquellas comunidades rurales marginadas del país. En estas comunidades los sectores más afectados son la población infantil ya que cifras de grave desnutrición escolar son del orden de 32.0 y 38.3 % para niños y niñas respectivamente, lo que se traduce en una alta tasa de mortalidad infantil (1,3,4). La población rural y sobre todo la indígena, debido a la marginación socioeconómica, presentan todavía una mayor deficiencia nutrimental, en términos generales, se puede mencionar que estos habitantes llevan su dieta con un alto porcentaje de alimentos de origen vegetal, por ejemplo niños preescolares basan su dieta al consumo de maíz como único alimento, lo cual ocasiona que en la población infantil, se presente con cierta facilidad la desnutrición (2,3).

En estas comunidades hay un profundo desconocimiento de las condiciones reales de alimentación, ya que se desconoce hasta lo más básico como son los recursos naturales con que cuentan. Aunado a lo anterior en estas comunidades indígenas, sus patrones alimentarios se están transformando hacia el consumo de alimentos de menor valor nutritivo, produciéndose un desequilibrio en su dieta (1). Además, en estos entornos con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema intensivo de monocultivo y extensión ganadera, se destruye vegetación autóctona en forma indiscriminada, lo que pone en peligro el potencial germoplásmico (1,5,6).

La búsqueda de material biológico con potencial proteínico-calórico, no es nuevo ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad, debido al amplio mosaico de ecosistemas (7,8). Con respecto a lo anterior, cabe mencionar que el sur de México, junto con Centroamérica, fue uno de los principales centros de origen de muchos de los recursos de plantas cultivadas y que en la actualidad el género humano disfruta (8,9). Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuente de nutrimentos para la alimentación humana y animal; sin embargo, estos recursos están subaprovechados (5,6,8). Como ejemplo particular, se tiene el caso de las calabazas que pertenecen al género **Cucurbita**.

El consumo de semillas de algunas cucurbitáceas no es exclusivo del país, en el Medio Oriente y África se usan directamente en la alimentación humana; así, se tiene que en Egipto se consumen como nueces y en Nigeria se acostumbra consumir las semillas de calabaza cocidas y secas como "snack", o se pueden destinar a la

alimentación animal. Actualmente, se le está dando importancia tanto en alimentación humana como animal, a la búsqueda de fuentes alternativas de oleaginosas que a la vez tengan un alto contenido de proteína; así se tiene que en Nigeria se está cultivando una calabaza acanalada (*Telfaria occidentalis*), para la obtención de aceite comestible de su semilla y la torta residual con alto contenido de proteína destinarla a la alimentación animal (10,11).

3.1 *Cucurbita argyrosperma*

3.1.1 Descripción botánica

Estas Cucurbitáceas son plantas rastreras o trepadoras, monoicas, de vellosas a pubescentes; raíces fibrosas; tallos ligeramente angulosos, hojas con manchas blancas, en número de 3-5, lobuladas; lóbulos triangulares a elípticos; flores pentámeras, solitarias, axilares; flores femeninas sobre pedúnculos robustos de 2-3,5 cm; ovario globoso, ovoide-elíptico botuliforme o piriforme; cáliz reducido y corola algo más grande que en las masculinas; 3 estigmas. Frutos piriformes cortos o largos y rectos o encorvados en la parte más delgada, de 11-50 cm de largo; cáscara rígida, lisa a levemente costada, blanca con franjas verdes longitudinales reticuladas a totalmente blancas, pulpa blanca, amarilla o anaranjada, semillas elípticas, ligeramente infladas, de 15-30 x 8-16 mm, de testa blanca, lisa y suave (5).

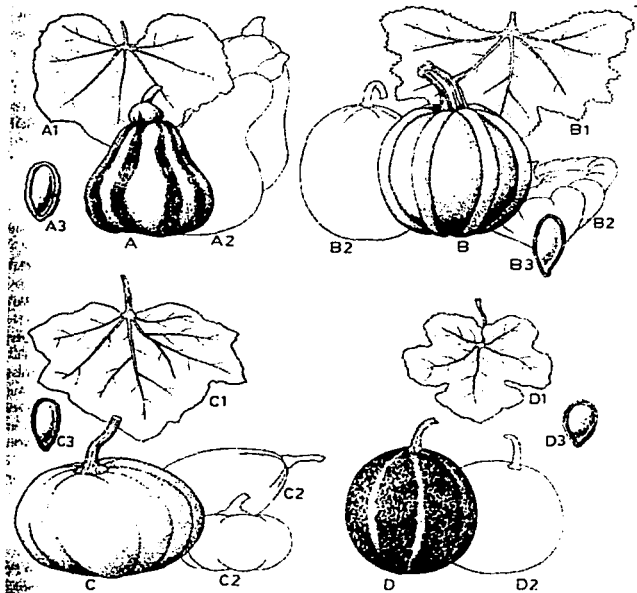


Fig. # 1 Ilustración de cucurbitas mesoamericanas A. *Cucurbita argyrosperma*, A1. hoja; A2. frutos; A3. semilla; B. *Cucurbita pepo*; B1. hoja; B2. frutos; B3. semilla; C. *Cucurbita moschata*; C1. hoja; C2. frutos; C3. semilla; D. *Cucurbita ficifolia*; D1. hoja; D2. frutos; D3. semilla.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.2 Origen y domesticación

Cucurbita argyrosperma es una de las especies cultivadas del género más profundamente estudiada en los últimos años.

De acuerdo con la edad de los restos arqueológicos hasta ahora encontrados se ha sugerido que la domesticación de *Cucurbita argyrosperma*, debió llevarse a cabo en el sur de México hace más de 7000 años. Las características que más se transformaron en el proceso de domesticación de la *ssp. argyrosperma* fueron, principalmente aquellas relacionadas con su manejo y preferencias de uso: por ejemplo, germinación relativamente uniforme, reducción en tamaño y abundancia de tricomas, aumento de tamaño de partes u órganos utilizados, como frutos y semillas, y disminución del sabor amargo de la pulpa.

El tamaño relativamente mayor de las semillas de la var. *argyrosperma* indica que fue seleccionada principalmente para la obtención de semillas, mientras que la mayor diversidad de formas, colores y tamaño de los frutos y semillas de las var. *stenosperma* y *callicarpa* indican que la selección tuvo un doble propósito: la obtención de pulpa y semillas (5).

3.1.3 Usos y valor nutritivo

En toda su área de distribución, las flores, tallos jóvenes, frutos tiernos y frutos maduros se consumen como verdura. Los frutos maduros raramente se emplean para la elaboración de dulces, y más frecuentemente se utilizan como forraje para ganado y aves de corral. Las semillas se consumen enteras, asadas, tostadas o molidas, y constituyen el principal ingrediente de salsas usadas para la elaboración de diferentes guisos (por ejemplo mole verde, etc). Las semillas son el producto más importante, principalmente por su alto contenido de aceite (39%) y proteína (44%), y su consumo en zonas urbanas de México y países de América Central es muy común.

3.1.4 Aspectos fitogeográficos y prácticas de cultivo

Las tres variedades cultivadas de *C. argyrosperma* se encuentran en una gama de altitudes relativamente amplia (0-1800 m), generalmente en zonas de clima cálido y algo seco o con una estación de lluvias bien delimitada.

En México la var. *argyrosperma* se cultiva en la vertiente del Golfo (Tamaulipas, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán).

Las variedades cultivadas de *C. argyrosperma* se manejan en los sistemas de agricultura tradicional de temporal, se siembra al inicio de la época de lluvias, de Mayo-Junio. El periodo de desarrollo de éstas variedades es de 5-7 meses, los frutos tiernos para verduras se cosechan a los 3 meses de haberse sembrado, mientras que los maduros para semilla entre Octubre y Diciembre.

La única forma de propagación es la siembra de semilla, que se realiza junto con algunos de los cultivos tradicionales de este modelo de agricultura (maíz, frijoles y otras especies de *cucurbitas*) (5).

3.1.5 Factores antinutricionales en las semillas de *Cucurbita*.

Henderson et al, realizaron la identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales de las siguientes especies: *C. foetidissima* y *C. digitata* (calabaza xerofíticas) así como *C. moschata* y *C. pepo* (calabazas comunes). Los inhibidores de tripsina activos en *C. foetidissima* y *C. digitata* son cinco veces mayores que los encontrados en otras *cucurbitas*, dichas especies sólo tienen el 17% y 24% respectivamente, comparadas con la semilla de soya la cual fue usada como material de referencia (12).

El tratamiento térmico reduce la actividad de los inhibidores de tripsina a niveles insignificantes (<2UTI/mg proteína). La actividad de lectinas fue muy grande en la semilla de soya, intermedia en *C. digitata*, y muy baja en *C. foetidissima*, así como, en las demás *cucurbitas* domesticas. El tratamiento térmico disminuye sustancialmente la actividad de lectinas excepto en *C. digitata* y semilla de soya. Los niveles de fitatos y oligosacáridos (productores de flatulencia) fueron encontrados en cantidades muy pequeñas en todas las especies estudiadas.

Las especies cultivadas de *cucurbitas* vienen asociadas con civilizaciones por centurias. El melón, la sandía y el pepino son otros ejemplos de cucurbitáceas y están presentes en la dieta humana. Ciertamente las cucurbitáceas xerofíticas están bien identificadas como posibles cosechas alimenticias en las regiones áridas y

semiáridas de todo el mundo. La calabaza búfalo, (*C. foetidissima*) parece prometer más, además de que fue recibida con considerable atención respecto a la domesticación y utilización.

3.2 Proteínas

3.2.1 Calidad de las proteínas

La calidad proteínica es la medición de la eficacia con que una proteína se usa para el crecimiento o para conservar funciones, y depende ante todo de los aminoácidos indispensables que la integran (13).

Los aminoácidos dispensables se sintetizan eficazmente en el organismo, ya sea a partir de metabolitos intermedios o de aminoácidos indispensables o también llamados esenciales (cisteína a partir de metionina; tirosina a partir de fenilalanina), el hombre adulto no puede sintetizar los 8 aminoácidos indispensables. Por lo tanto, estos 8 aminoácidos indispensables tienen que ser aportados por los alimentos.

Ocho aminoácidos se clasifican como indispensables porque el organismo no los sintetiza y porque son necesarios para la síntesis en el cuerpo, y en consecuencia, deben proporcionarse como parte de la dieta éstos son: treonina, triptofano, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina y fenilalanina. La ingestión inadecuada o la ausencia de cualquiera de estos aminoácidos origina un equilibrio negativo del nitrógeno, pérdidas de peso, deterioro en el crecimiento y síntomas clínicos. Las necesidades de triptofano y fenilalanina, y en consecuencia, de tirosina, se deben a la incapacidad de los animales para sintetizar anillos aromáticos (14,15).

Está claramente establecido que regímenes deficientes en uno o varios aminoácidos indispensables, impiden conseguir un crecimiento normal y pueden conducir a una enfermedad o a la muerte o pueden producirse daños precoces en el cerebro, que afectan su capacidad.

Aminoácidos indispensables y dispensables

Aminoácidos indispensables	Aminoácidos dispensables
Fenilalanina	Acido aspártico
Isoleucina	Acido glutámico
Leucina	Alanina
Lisina	Prolina
Metionina	Serina
Treonina	Arginina
Triptofano	Cisteína
Valina	Histidina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fuente (16)

El metabolismo de las proteínas corporales, puede expresarse por la diferencia entre el aporte y la eliminación de nitrógeno, diferencia que se llama equilibrio nitrogenado. Si es positiva, como la que se produce durante el crecimiento, convalecencia, cicatrización o gestación, entonces la retención de nitrógeno sirve para depósito tisular y síntesis proteínica. Si fuese negativa, como la que se produce durante una mal nutrición proteínica, heridas, infecciones, etc. entonces se pierde nitrógeno. En el hombre adulto, el equilibrio nitrogenado es igual a cero, pues se mantiene aunque el aporte proteínico exceda mucho las necesidades corporales, ya que, en exceso de proteína se convierte en energía y urea.

Las necesidades proteínicas del adulto pueden calcularse determinando el aporte proteínico mínimo, necesario para mantener el equilibrio nitrogenado; en la lactancia o infancia, se considera como aporte mínimo aquel que permite una tasa de

crecimiento óptima. Los adultos requieren menos proteínas por Kg que los niños, porque la renovación proteínica desciende con la edad y el crecimiento se estabiliza. En la siguiente tabla se indican las necesidades proteínicas para un hombre o una mujer adultos. Estos valores, que están de acuerdo con los resultados de experimentación sobre equilibrio nitrogenado, son los recomendados por la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), de Naciones Unidas (ONU), y la National Academy of Sciences (NAS) de Estados Unidos, como aporte proteico de seguridad para gentes en buenas condiciones (36).

Requerimientos de aminoácidos indispensables para adultos (g/100 g proteína)

Aminoácidos indispensables	Adultos
Isoleucina	1.3
Leucina	1.9
Lisina	1.6
Metionina + Cistina	1.7
Fenilalanina + Tirosina	1.9
Treonina	0.9
Triptofano	0.5
Valina	1.3
Sin incluir histidina	11.1

FAO/OMS/ONU (1984) (15)

El valor proteínico de un alimento corresponde a su capacidad para satisfacer las necesidades del consumidor en nitrógeno y aminoácidos asegurando así un crecimiento y mantenimiento corporal convenientes. Esto depende del contenido de proteína, ya que, muchos alimentos básicos contienen menos del 3.0 % de proteína (papas) no satisfaciendo las necesidades proteínicas del hombre, salvo que se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ingieran en cantidades que sobre pasen las necesidades calóricas.

Por el contrario, un régimen de cereales (con un contenido de 8-10 % en proteína), asegura las necesidades proteínicas de un adulto, al mismo tiempo que cubre sus necesidades calóricas. Esto explica, probablemente, que en los países en vías de desarrollo la mal nutrición mixta proteínica y calórica (marasmo) es más corriente que la mal nutrición debida solamente a una deficiencia proteínica (kwashiorkor).

La calidad de una proteína alimentaria depende de la naturaleza y cantidad de aminoácidos que contiene, lo que representa una medida de la eficiencia de cómo el organismo puede utilizar esa proteína. Una proteína equilibrada o de alta calidad, contiene los aminoácidos indispensables en proporciones correspondientes a las necesidades humanas. En general, las proteínas de origen animal, son de mejor calidad que las de vegetales.

Frecuentemente las proteínas de cereales son pobres en lisina y en algunos casos deficientes en triptofano y treonina. Usualmente los granos, de oleaginosas y las nueces están escasos de metionina y lisina. Las leguminosas suelen ser pobres en metionina. La deficiencia de algún aminoácido indispensable en relación a las necesidades, se llama aminoácido limitante.

Es posible compensar más o menos las deficiencias en aminoácidos mediante un régimen que contenga varias proteínas o proporciones complementarios de aminoácidos; esto puede lograrse aunque la proteína sea de baja calidad. Así, las proteínas de cereales pueden complementarse eficazmente con pequeñas cantidades de proteínas de soya o leche, pero las proteínas de soya se

complementan menos eficazmente por pequeñas cantidades de proteínas animales.

Una suplementación excesiva puede conducir a antagonismos entre aminoácidos e incluso a una toxicidad. El antagonismo proviene de un aumento de necesidades en determinados aminoácidos, debido a aumentar en el régimen el contenido de otro aminoácido (17).

La evaluación de una proteína en relación con su óptima utilización por el organismo se hace a través de dos parámetros:

- El análisis del perfil de aminoácidos o calificación química.
- El análisis del valor biológico de la proteína.

El perfil de aminoácidos, se determina en base a su contenido en aminoácidos indispensables con relación a las necesidades humanas de estos aminoácidos. El aminoácido que esta en menor proporción con relación al patrón se denomina aminoácido limitante y es el que define la calidad (48).

La calificación química de una proteína queda definido así:

$$\text{Calificación química} = \frac{\text{mg de aminoácido limitante primario}}{\text{mg del mismo aminoácido}} \cdot \frac{\text{g proteína estudiada}}{\text{g de proteína de referencia}} \cdot 100$$

3.2.2 Digestibilidad proteínica

Los aminoácidos presentes en las proteínas de la dieta no están siempre disponibles de forma total, porque la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos puede ser incompleta. Generalmente, los aminoácidos de las proteínas animales se digieren y absorben en una proporción del 90 %, mientras que los de algunas proteínas vegetales sólo pueden ser liberadas y absorbidas en 60-70 %.

En circunstancias normales la mayor parte de los residuos indigeribles constan de celulosa, pectinas y otros hidratos de carbono complejos, presentes en alimentos de origen vegetal, que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas del hombre.

Una parte de las proteínas, grasas y hidratos de carbono llegan a las heces. En personas las proporciones medias de los principales nutrimentos digeribles y absorbidos son: 98 % para hidratos de carbono, 95 % para la grasa y 92 % para las proteínas. A menudo se expresa como un coeficiente de digestibilidad que sería de 0.98, 0.95 y 0.92 para hidratos de carbono, grasa y proteínas respectivamente. Varía según los individuos y, especialmente tratándose de proteínas, según la fuente alimenticia. Por ejemplo, las proteínas del huevo, leche y carne poseen un coeficiente de 0.97, en tanto que el de los productos vegetales fluctúa entre 0.89 para la harina y 0.65 para la mayor parte de las verduras (13).

3. 3 Grasas

3.3.1 Ácidos grasos indispensables

Para el crecimiento y el funcionamiento normal de todos los tejidos son indispensables los ácidos linoleico (18:2, n-6), y linolénico (18:3, n-3). Los cuales contienen su primer doble enlace situado, a la distancia de seis átomos de carbono (n-6) y tres átomos de carbono (n-3), respectivamente, del grupo metilo terminal de la molécula.

Los animales, inclusive el hombre, no son capaces de introducir enlaces dobles entre los enlaces dobles originales y el grupo carboxílico; al mismo tiempo, la

longitud de la cadena carbónica aumenta hacia el extremo carboxílico cuando se introducen más dobles enlaces. Este proceso metabólico produce los derivados de cadena larga, de 20 ó 22 átomos de carbono, con 3, 4, 5 y 6 enlaces dobles. El resultado son dos familias (la n-6 y la n-3) de ácidos grasos indispensables requeridos para la formación de estructuras celulares y para la síntesis de prostaglandina.

Los ácidos grasos con cadenas de 20 ó 22 átomos de carbono y dobles enlaces en 3, 4, 5 y 6 derivados de los ácidos linoleico y linolénico, se denominan ácidos grasos indispensables de cadena larga; en la práctica, los dos más importantes son el araquidónico (20:4,n-6) y el decosahexaenoico (22:6,n-3) (21).

3.3.2 Aspecto energético y funcional en los alimentos

Los lípidos son los principales componentes del tejido adiposo, pueden estar separados de su fuente animal o vegetal, o bien ser constituyentes de los alimentos, además, los lípidos juegan un importante papel en la nutrición, aportando las siguientes características:

- Fuente de energía, ya que proporcionan 9 kcal/g, frente a las proteínas y carbohidratos que aportan sólo 4 kcal/g.
- Suministran ácidos grasos indispensables (precursores de hormonas como las prostaglandinas).
- Influyen en la sensación de saciedad tras la comida.
- Transportan vitaminas liposolubles.
- Imparten características organolépticas agradables.

3.3.3 Factores físicos y químicos usados en la caracterización de grasas y aceites.

➤ Densidad

En términos absolutos, densidad es definida como el peso de una sustancia por unidad de volumen; en los líquidos es expresada como g/cm^3 . Para grasas y aceites es común emplear la densidad relativa, que es el cociente entre la masa de la sustancia y la masa de un volumen igual de agua a una temperatura dada. La densidad de los ácidos grasos y los acilglicéridos es mayor mientras menor sea su peso molecular y mayor su grado de insaturación (18).

➤ Índice de refracción

Es una constante física para medir el fenómeno mediante el cual, cuando un rayo de luz monocromática pasa de una sustancia transparente a otra de diferente densidad, éste se desvía o refracta, excepto cuando penetra perpendicularmente a la superficie que separa ambas sustancias. En grasas y aceites es usada con frecuencia para dar idea sobre la identidad y pureza de las muestras, así como para seguir el curso de algunas reacciones.

La relación entre el índice de refracción y la estructura y composición de los ácidos grasos y acilglicéridos puede resumirse en los siguientes puntos:

- ◆ El índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta al crecer la cadena hidrocarbonada.
- ◆ El índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta con el número de dobles enlaces en la molécula y al aumentar el grado de conjugación entre éstos.

- ◆ El índice de refracción de los acilglicéridos simples es más alto que el del ácido graso correspondiente.
- ◆ El índice de refracción de los monoacilglicéridos es considerablemente más alto que el de los correspondientes triglicéridos simples (18,19).

➤ Índice de yodo

Se define como la cantidad de yodo (en gramos) absorbido por 100 gramos de grasa o aceite bajo condiciones estándar. El índice de yodo representa el grado de insaturación real sólo cuando los dobles enlaces no se hallan conjugados y la estructura del ácido graso no impida la entrada del halógeno.

La reacción se puede llevar a cabo mediante el método de Wijs, empleando monocloruro de yodo, o por el método de Hanus, la cual usa monobromuro de yodo en ácido acético (18).

➤ Índice de saponificación

La reacción de hidrólisis de una grasa o aceite con un álcali para dar glicerol y las sales de los ácidos grasos es conocida como saponificación. De tal forma, el índice de saponificación se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos resultantes de hidrolizar 1 gramo de muestra.

Los ésteres de los ácidos grasos de masa molecular baja requieren mayor cantidad de álcali para la saponificación. De tal modo, el índice de saponificación es inversamente proporcional al promedio de las masas moleculares de los ácidos

grasos de los acilglicéridos presentes. Sin embargo, el índice de saponificación no es tan útil para la identificación como el índice de yodo debido a que muchos aceites tienen índices de saponificación semejantes. Sin embargo, es muy usado para detectar la posible adulteración de una grasa en particular con aceite de coco, aceite de nuez y grasa de mantequilla, los cuales contienen una elevada proporción de ácidos grasos de bajo peso molecular. Además, la presencia de hidrocarburos parafínicos se puede detectar por la aparición de turbidez al añadir agua a la solución etanólica del aceite o grasa saponificados (20).

γ Índice de acidez

El índice de acidez se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres de 1 gramo de muestra. El resultado también puede expresarse en términos de porcentaje de ácidos grasos libres, asumiendo que los ácidos grasos presentes tienen un peso molecular equivalente al del ácido oleico y expresado como porciento de ácido oleico.

El índice de acidez es usado comúnmente como un indicador del grado al cual se han descompuesto los acilglicéridos del aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa, tales como calor y la luz. Así mismo, como la rancidez es acompañada usualmente de una presencia relativamente alta de ácidos grasos libres, la determinación es usada como una indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites (20).

3.3.4 Ácidos grasos más comunes en los vegetales

Ácidos grasos más comunes en los vegetales

Nombre sistemático	Nombre común	Símbolo	(%) en peso
Dodecanoico	Laurico	12:0	4
Tetradecanoico	Mirístico	14:0	2
Hexadecanoico	Palmítico	16:0	11
Octadecanoico	Estearico	18:0	4
Octadec-9c-enoico	Oleico	18:1	34
Octadec-9c-dienoico	Linoleico	18:2	34
Octadec-9c-trienoico	Linolénico	18:3	5

La proporción de ácidos grasos en los triglicéridos de distintas procedencias varía, y por tanto el porcentaje de ácidos grasos individuales dentro de un aceite es un dato importante para su identificación.

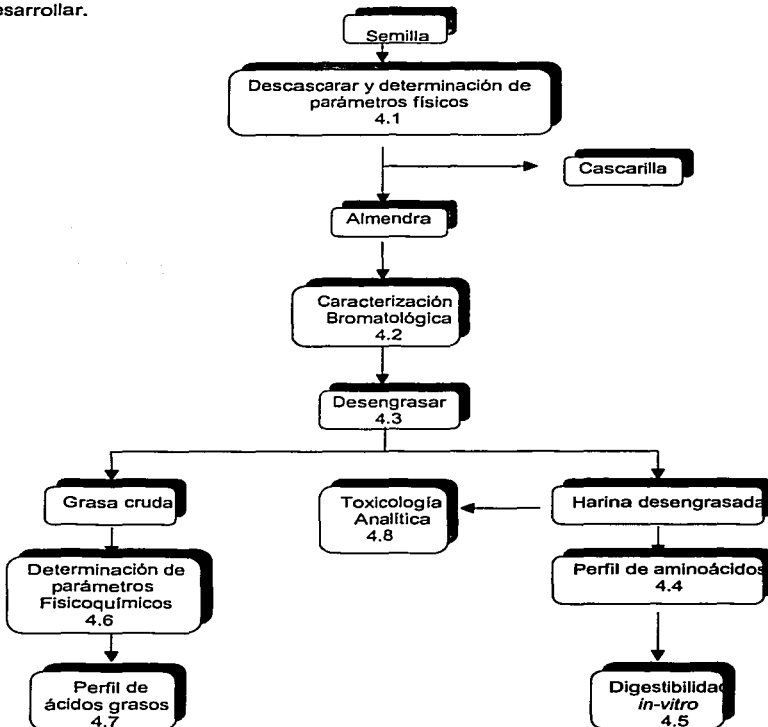
Entre los ácidos monoenoicos, el ácido oleico es el más ampliamente distribuido, y se encuentra en cantidades sustanciales en las grasas animales y en los aceites de semillas (tabla anterior), siendo el ácido graso mayoritario de los triglicéridos del aceite de oliva.

El ácido erúcido puede ser uno de los componentes mayoritarios (30-50%) de los ácidos grasos de los triglicéridos del aceite de colza, aunque actualmente existen variedades con menor contenido en este ácido. Las especies de **Brassica** pueden contener hasta un 10% de ácido eicosa-11-cis-enoico (20:1, n-9) (21).

CAPITULO 4

♦ METODOLOGÍA

A continuación se presenta el diagrama de flujo de los bloques del trabajo a desarrollar.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación, se describe en forma breve cada uno de los bloques, indicando los puntos más relevantes y las metodologías a usar.

*** Materia prima**

Semillas de calabaza *Cucurbita argyrosperma*, la cual fue recolectada en el municipio de Cuetzalán, Puebla.

4.1 Descascarado y determinación de parámetros físicos

Se separó la cascarilla de la semilla de calabaza manualmente, se tomaron muestras representativas, y se determinaron algunos parámetros físicos como peso hectolítrico, peso unitario, tamaño de semillas y almendra (22). Esta caracterización tiene la finalidad de poder hacer una rápida comparación de posibles adquisiciones posteriores del material biológico.

4.1.1 Peso hectolítrico

El peso hectolítrico se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote que ocupa un volumen estandarizado.

◆ **Materiales y reactivos**

- ◆ Probeta graduada de 100 ml, Kimax, No. 20024
- ◆ Balanza granataria, Sauter

- ◆ **Procedimiento**

Se taró la probeta en la balanza granataria y se agregó una muestra representativa de semilla correspondiente a 100 ml. Esta operación se repitió 4 veces con el fin de obtener valores promedio y su desviación estándar.

El resultado de la prueba se reportó en g/100 ml.

4.1.2 Determinación de peso y tamaño de semilla y almendra.

- ◆ **Materiales y reactivos**

- ◆ Balanza analítica Sartorius
- ◆ Vernier

- ◆ **Procedimiento**

Se tomó una muestra representativa de 10 semillas y se pesó cada una por separado en la balanza analítica; a ésta misma se le midió el largo y el ancho usando el vernier. El anterior procedimiento se repitió para otro lote representativo de almendra. El resultado se obtuvo como el promedio y su desviación estándar.

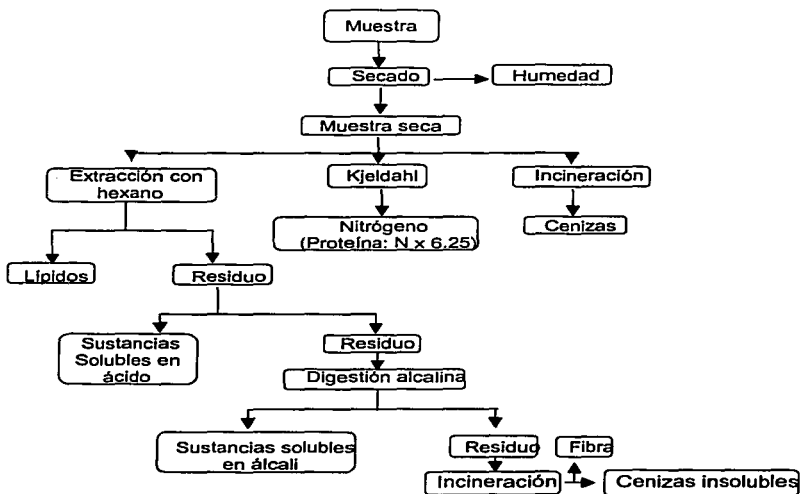
4.2 Caracterización bromatológica de la almendra.

Para llevar a cabo esta fase del trabajo, fue necesario tener el material en forma de harina; sin embargo, como la almendra tiene un alto contenido de grasa, sólo se fraccionó y se obtuvo una harina con tamaño de partícula de 3.0 mm de diámetro. A la harina se le realizó el análisis proximal de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC con ligeras modificaciones (23,24). Con la finalidad de discriminar el nitrógeno proteínico del no proteínico se determinó la proteína verdadera (25).

4.2.1. Análisis proximal

Fundamento

El análisis proximal o sistema analítico Weende se desarrollo en Alemania hace más de 100 años, en la estación experimental que lleva su nombre. Este sistema se ha criticado mucho, pero hasta la fecha nadie ha desarrollado otro mejor que sea tan practicado y aceptable. El análisis proximal se realizó de acuerdo al esquema de Weende con algunas modificaciones en el material recomendado por dicha metodología.



Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a lo establecido en el AOAC, con las siguientes modificaciones:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- En la determinación gravimétrica de humedad se utilizó una estufa de presión reducida LAB-LINE DUO-VAC a 15 in/Hg y una temperatura de 60°C, hasta peso constante.
- En la determinación analítica del contenido de grasa se utiliza como disolvente hexano R.A.
- En la determinación de fibra se utilizaron filtros California de polietileno Labconco, 200-mesh stainless steel 5214-A10.
- En la determinación de proteína se utiliza el Digestor Tecator Model a/b 20/40 (serie 254) y el Autoanalizador KJELTEC 1030 (serie 13417).
- En la determinación de cenizas se utilizaron crisoles a peso constante.
- El valor de carbohidratos se obtiene de sumar los porcentajes de los constituyentes anteriores y el total se resta de 100.

4.2.2. Proteína verdadera

Fundamento

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl. Con éste método la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración ésta es incluida junto con la proteína soluble precipitada.

4.3 Desengrasado

Debido a que las almendras tienen un alto nivel de grasa (> 40%), solamente se fraccionará como se describió en el paso anterior y la extracción se realizará en un dispositivo tipo soxhlet, que pueda procesar aproximadamente 1 a 2 kg de material, usando hexano como disolvente de extracción y una vez que se tenga la miscela (grasa-disolvente), se separará el disolvente de la grasa, de tal forma que se obtenga tanto la grasa cruda como la harina desengrasada (26,27).

4.3.1. Determinación de grasa

Fundamento

La determinación del extracto etéreo, incluye la grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides; al escoger el solvente de extracción (éter de petróleo, hexano, entre otros) se deben tomar sus ventajas y desventajas para una buena elección, así como el tratamiento previo que se le debe dar a la muestra, ya que el éter húmedo disuelve el azúcar y algunos otros hidratos de carbono, por lo cual es indispensable que la muestra se encuentre seca.

La primera razón por la cual es importante determinar el dato de grasa o extracto etéreo, es poder aislar la fracción alta en contenido calórico.

4.3.1.1 Extracción del aceite

La semilla íntegra fue molida en un molino Thomas–Wiley Model 4, usando una malla con aberturas de 3 mm. de diámetro. La harina obtenida fue entonces insertada en el dispositivo tipo Soxhlet para llevar a cabo la extracción de aproximadamente 200 g de muestra la cual fue envuelta en papel filtro de tal manera que se evitaran las pérdidas por el flujo del disolvente. El disolvente usado fue hexano grado Q.P. y se usó un sistema de extracción continua durante 23 horas. El disolvente fue eliminado de la fracción lipídica mediante rotavapor, seguido de un secado en estufa a 60°C.

A la grasa extraída se le insufló nitrógeno y se guardó en congelador para su conservación y posterior uso.

4.4 Caracterización química

4.4.1 Perfil de aminoácidos

A la harina desengrasada de calabaza, se le determinó la composición de aminoácidos, previa hidrólisis ácida y alcalina de dicha proteína (29,30).

Una vez contando con la composición de aminoácidos en especial de los indispensables se estará en posibilidad de calcular los índices químicos de predicción biológica como son: calificación química (CQ) e índice de aminoácidos esenciales (IAAE) (31,32,33).

Determinación de aminoácidos de una muestra proteínica en un autoanalizador de aminoácidos

Fundamento

La determinación cuantitativa de los aminoácidos de una proteína guarda una estrecha comparación a lo que se realiza en el análisis químico elemental de una simple molécula orgánica; o sea que una característica primaria cuando se tiene una proteína es determinar su composición de aminoácidos.

La exactitud de dicho análisis es de suma importancia; y es conveniente realizarlo con rapidez y facilidad. Las anteriores características han sido posible integrarlas, con el desarrollo de equipos automatizados en los últimos años.

En la actualidad el uso de la cromatografía de intercambio iónico con resinas específicas (resina de poliestireno sulfonada), acoplada a bombas especiales que mantienen un flujo constante de las soluciones eluyentes y aparatos de registro electrónico automático, han permitido el desarrollo de los llamados autoanalizadores

de aminoácidos, que realizan el análisis de una proteína con increíble rapidez y una adecuada precisión.

La naturaleza de las condiciones de hidrólisis ácida completa, juega un papel de gran importancia en el análisis de aminoácidos de una muestra proteínica con el fin de obtener su composición. El método particular de hidrólisis de proteínas previo al análisis de aminoácidos, es de considerable interés debido a que ciertos aminoácidos son destruidos y la liberación de otros es incompleta; lo anterior se acentúa más con las técnicas modernas de alta precisión que se utilizan hoy en día como son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Referente a la hidrólisis química hay que mencionar que la hidrólisis ácida es el procedimiento generalizado disponible para la gran variedad de proteínas; y es costumbre tratar la proteína con 2.5 a 5000 veces su peso con HCl 6 N y mantener la solución bajo reflujo por espacio de 18 a 24 horas. En la actualidad el método propuesto por Moore y Stein es el recomendado y es la técnica clásica de hidrólisis ácida de una proteína para la cuantificación de aminoácidos; sin embargo en el procedimiento que a continuación se describe, se usó la modificación del tiempo y temperatura propuesta en el laboratorio, de la cual hay una publicación para su justificación (30).

- ◆ Material/Reactivos
 - ◆ Autoanalizador de aminoácidos marca TECHNICON, mod. NC-2P
 - ◆ Digestor marca TECATOR, mod. Ab 20/40.
 - ◆ Potenciómetro marca CORNING, mod. 10

- ◆ Rotavapor marca BUCHI, mod. R.
- ◆ Vortex marca LAB-LINE INSTRUMENTS, mod. Super-mixer No. 1290
- ◆ Adaptador para filtración en jeringa Millipore XX30.012.00
- ◆ Membrana Millipore tipo HATF-02500 (tamaño poro 0.45 μ M).
- ◆ Micro-jeringa marca HAMILTON, mod. 1001-LTN
- ◆ Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PYREX No. 9826
- ◆ Ácido clorhídrico 6 N
- ◆ Metil-celolve al 50%
- ◆ Amortiguador de acetato de sodio 4 N (a)
- ◆ Sulfato de hidracina (b)
- ◆ Ninhidrina ©
- ◆ Solución lavadora (d)
- ◆ Amortiguador de dilución (e)
- ◆ Amortiguadores de acetatos para regeneración y elución (f)
- ◆ Hidróxido de sodio 0.1 N (g)

a) Colocar aproximadamente 3 litros de agua destilada en un dispositivo de agitación, adicionar lentamente 1312 g de acetato de sodio anhidro para prevenir la cristalización, si se requiere se puede calentar para la completa solubilización de la sal. Una vez fría la solución se le añade 400 ml de ácido acético glacial lentamente y se deja enfriar. Por último se lleva a un aforo de 4 litros.

Nota: El pH de este amortiguador debe ser de 5.51 ± 0.02 ; si se requiere ajustar se debe de usar álcali o ácido concentrado ya que 4 g de NaOH apenas

incrementan dicho amortiguador en 0.04 unidades de pH.

- b) 1049 g de sulfato de hidracina se disuelven en agua destilada, a continuación se adiciona 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado (R.A.) y 30 ml de solución BRIJ-35 al 20%, se lleva esta solución a un volumen de 4 litros; para su conservación se requiere adicionar 0.8 ml de ácido caprílico como conservador.
- c) Disolver 40 g de ninhidrina en 2 litros de metilcelosolve, a continuación adicionar lentamente 1 litro del amortiguador de acetato de sodio 4 N. Por último se lleva a un volumen de 4 litros.
- d) Solución lavadora: agua-etanol (3:1 v/v) con hidroquinona al 0.01 % como agente antioxidante.
- e) Se prepara una solución de ácido clorhídrico 0.2 N (A) y una solución de cloruro de sodio 0.2 M (11.69 g/l) (B). Se toma 50 ml de (A) y 33.3 ml de (B), se lleva a 200 ml con agua y adicionando hidroquinona al 0.01 %. El pH de este amortiguador debe ser de 1.50 ± 0.05 .
- f) Amortiguadores para la corrida del hidrolizado ácido de una proteína. Columna de 470 nm x 5 mm (Feb. 1989).

Reactivo (grado analítico)	Buffer # 1 Regeneración de la resina	Buffer # 2 Elución de a.a. ácidos y neutros	Buffer # 3 Elución de a.a. básicos	NaOH 2 N Lavar la resina
Acetato de sodio (anhidro) CH ₃ COONa PM 82.03	4.1 g	5.0 g	87.0 g	—
Acido acético glacial CH ₃ - COOH PM 60.05	20.0 ml	15.0 ml	20.0 ml	—
Solución de acetato de zinc (CH ₃ COO) ₂ Zn.2H ₂ O 0.5 M (110 g/l)	—	1.0 ml	2.0 ml	—
Alcohol etílico (absoluto) CH ₃ -CH ₂ -OH PM 46.02	78.0 ml	78.0 ml	—	—
Alcohol benzílico PM 108.14	—	—	11.0 ml	—
Hidroquinona (antioxidante) PM 110.1	0.11 g	0.11 g	—	—
Solución BRIJ-35 al 20% (MERCCK # 1962)	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml	—
EDTA (sal disódica) PM 372.24	0.1 g	—	—	1.0 g
Hidróxido de sodio (lentejas) NaOH PM 40.0	—	—	—	8.0 g
Acido caprílico (Conservador) C ₈ H ₁₆ O ₂ PM 144.22	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	—
Agua destilada y desionizada (1 ppm como Na ⁺) c.b.p.	1.0 L	1.0 L	1.0 L	1.0 L
pH (ajuste en el potenciómetro en escala espancida)	4.00 ± 0.02	4.01 ± 0.02	5.30 ± 0.02	—
Concentración de Na ⁺ (M)	0.05 M	0.06 M	1.06 M	0.20 M
Concentración de Zn ⁺⁺ (M)	0.05 M	3.0 * 10 ⁻⁴ M	1.0 * 10 ⁻³ M	0.00 M

Forma de preparar las soluciones amortiguadoras:

1.- En un recipiente con agitación se pone la mitad del volumen de agua (0.5 L) y se disuelven todos los componentes sólidos (sales).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 2.- Después se adicionan los reactivos líquidos o las soluciones correspondientes a excepción del ácido caprílico, el cual se adiciona hasta después de ajustar el pH.
- 3.- Una vez disueltos todos los reactivos en la mitad del volumen, se procede a adicionar más cantidad de agua hasta llevar a un volumen aproximado de 900 ml con el fin de tener margen para poder proceder a ajustar el pH.
- 4.- Se ajusta el pH del amortiguador al pH deseado con la ayuda de un potenciómetro de escala expandida; el cual previamente se calibró con exactitud con un buffer de referencia (de preferencia de pH = 4.00).
- 5.- Una vez ajustado el volumen se afora en un matraz volumétrico de 1 L y con ayuda de unas gotitas de ácido caprílico para romper la espuma formada.
- 6.- Al amortiguador ya ajustado y aforado se procede a filtrarlo por medio de papel filtro y con ayuda de vacío, con la finalidad de eliminar cualquier partícula extraña, ya que estas soluciones pasarán a través de la resina de intercambio iónico.
- 7.- En el recipiente final del amortiguador se adiciona la cantidad especificada de ácido caprílico (como conservador) y a continuación se vacía el amortiguador ya aforado y filtrado a dicho recipiente.

El procedimiento se llevó a cabo como sigue:

Se pesa dentro de un tubo de hidrólisis ácida la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A = \frac{0,05 * 100}{\% P}$$

Donde:

A = cantidad de muestra (g)

%P = porcentaje de proteína de la muestra

A continuación se adiciona la cantidad de ácido clorhídrico requerido, tratando de que la muestra se humedezca con el reactivo de hidrólisis, para conocer la cantidad de ácido se calcula:

$$B = \frac{4 * 100}{\%P}$$

Donde :

B = ml de HCl 6 N

%P = porcentaje de proteína de la muestra

Se le insufla nitrógeno, cerrando perfectamente con un tapón rosca de cubierta de teflón, y se somete a las condiciones de hidrólisis en el digestor Tecator a una temperatura de 145 ± 1 °C durante 4 horas.

Transcurrido el tiempo se deja enfriar, se vacía el contenido del tubo en un matraz bola 50 ml, se adiciona con exactitud 10 ml de Norleucina 5 m M (estándar interno) y se concentra en el rotavapor Buchi, se adiciona 15 ml de solución lavadora, limpiando lo mejor posible el matraz, posteriormente se filtra con papel Whatman # 542; el filtrado se neutraliza a pH 6.8 ± 0.2 con NaOH 5N y se afora a 25 ml con agua desionizada, en caso de no utilizar en ese momento se le insufla nitrógeno y se introduce en el congelador.

Se descongela el hidrolizado fluido a temperatura ambiente, se filtra nuevamente con papel Whatman #542, del cual se toman 1 ml mezclando con 1 ml de buffer de pH 1.5, los cuales son filtrados en milipor desechando las primeras 5 gotas, del filtrado se toman 100 µl ó 200 µl para inyectar en el autoanalizador. Previamente hay que correr una solución estándar de aminoácidos que contenga 0.025 µM de cada uno, para de este aminograma poder obtener el área de cada uno de los

aminoácidos. Además tanto en el estándar como en cada corrida de un hidrolizado se debe de inyectar una cantidad constante y conocida del aminoácido sintético norleucina, para poder hacer los cálculos en base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

$$EN_{aa} = \frac{AN_{std}}{AA_{std}}$$

Donde:

EN_{aa} = Equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente

AN_{std} = Área de norleucina del estándar.

AA_{std} = Área del aminoácido correspondiente en el estándar.

Del aminograma del hidrolizado de la muestra, se calcula el área bajo la curva de cada uno de los aminoácidos (A_{aa}), para lo anterior es conveniente trabajar con la mitad superior de cada uno de los picos, para evitar trabajar con la línea base que en ocasiones es demasiado irregular:

$$A_{aa} = B_{aa} * h_{aa}$$

Donde :

A_{aa} = Área del aminoácido en el aminograma de la muestra.

B_{aa} = Base a la mitad del pico.

h_{aa} = Altura del pico desde la línea base.

A continuación se tienen los cálculos que se deben desarrollar para cada uno de los aminoácidos, en donde se expresa su contenido en mg del aminoácido por gramo de nitrógeno de la muestra:

$$mg_{aa} / g N = \frac{A_{aa} * EN_{aa} * M_{std} * PM_{aa} * A}{AN_m * a * MGN_m}$$

Donde:

A_{aa} = Área del aminoácido en el aminograma de la muestra.

EN_{aa} = Equivalente de norleucina del aminoácido correspondiente.

PM_{aa} = Peso molecular del aminoácido.

A = Aforo al que se llevo el hidrolizado en ml.

AN_m = Área de norleucina en el aminograma de la muestra
 a = Alícuota inyectada en ml.
 MGN_m = Miligramos de nitrógeno de la muestra hidrolizada.

4.4.2 Determinación de Triptofano (38)

Fundamento

Después del anuncio por Hopkins y Cole en 1902 del aislamiento del triptofano, por digestión enzimática de la caseína, una gran cantidad de métodos fueron propuestos para la estimación de dicho aminoácido, ya fuera en la proteína intacta o en su hidrolizado. Los métodos aprovechan la gran reactividad del anillo de indol de los residuos de triptofano como son:

1. Tratamiento con agentes oxidantes como cloruro férrico, bromuro, sulfato cúprico, nitrito de sodio en solución ácida.
2. Con KNO_3 y un aldehído alifático en HCl ó H_2SO_4 concentrado.
3. Con ciertos aldehídos aromáticos como p-dimetil-amino-benzaldehído en medio fuertemente ácido.

Sin embargo un factor importante en la cuantificación del triptofano en materiales biológicos complejos, lo constituye las condiciones de hidrólisis y aunque la hidrólisis alcalina fue usada desde 1839 por Mulder, esta ha quedado restringida en la actualidad para el caso particular de triptofano y tirosina.

◆ Reactivos

- ◆ Solución estándar de triptofano: (0.05 mg/ml). Pesar 12.5 mg y aforar a 250 ml
- ◆ Solución de p-DMAB al 0.5%: Pesar 0.5 g de p-DMAB y disolverlos con HCl concentrado, aforar a 100 ml con HCl concentrado.

- ◆ Nitrito de sodio al 0.2%: Pesar 200 mg de nitrito de sodio y aforar a 100 ml con agua.
- ◆ Hidróxido de litio 4 N
- ◆ Solución lavadora (EtOH 3:1 v/v) con 0.01 % de hidroquinona como antioxidante.

◆ Procedimiento

1.- Pesar la cantidad de muestra finamente molida y desengrasada dentro del tubo de hidrólisis.

2.- Adicionar con cuidado la cantidad de álcali requerida y se debe de tratar que toda la muestra se humedezca con dicho reactivo y de ser necesario se puede ayudar con un vortex.

$$A = \frac{0.1 \times 100}{\% P}$$

$$B = \frac{4 \times 100}{\% P}$$

Donde:

A = Cantidad de muestra (g)

B = ml de álcali (LiOH 4N)

% P = % de Proteína en la muestra

3.- Se le inyecta nitrógeno y se procede a cerrar perfectamente con el tapón de rosca y cubierta de teflón. La hidrólisis se realiza a 145°C y para el caso del tiempo, este se fija de acuerdo al contenido de proteína en la muestra, el cual fue de 8 horas.

4.- Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis se deja enfriar el tubo y se transvasa cuantitativamente el contenido de él a un vaso de precipitado, dándole algunas lavadas al tubo con agua caliente y solución lavadora.

5.- A continuación se procede a ajustar pH del hidrolizado cerca de la neutralidad con ác. orto-fosfórico concentrado ($\text{pH} = 6.8 \pm 0.2$).

6.- Se procede a eliminar el precipitado por filtración con vacío sobre papel Wathman doble No. 542, aconsejándose dar algunas lavadas con agua caliente y solución lavadora al vaso para que a su vez se lave el residuo del papel filtro.

7.- El hidrolizado filtrado se pasa a un matraz de bola y con ayuda de un rotavapor eliminar el exceso de disolvente para poder llevar el volumen del hidrolizado a menos de 25 ml.

8.- Cuando no se va a trabajar enseguida el hidrolizado, se debe de volver a checar el pH en el potenciómetro y ajustar a un $\text{pH} = 7.0 \pm 0.1$ y enseguida guardar en el congelador hasta su uso.

9.- Curva estándar

Hacer una curva estándar de 0 a 100 μg de triptofano. Tomar 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ml de la solución estándar de triptofano. Llevar a 2.0 ml cada uno de los tubos con agua y adicionar 7.5 ml de p-DMAB. Agitar y dejar 15 minutos en la oscuridad, agregar 0.5 ml de nitrito de sodio, agitar y dejar en reposo 15 minutos. Leer absorbancias a 590 nm.

10.- Para la muestra tomar tres alícuotas de 2 ml cada una, un tubo será el blanco de la muestra y a este se le adicionan 7.5 ml de HCl concentrado, en tanto que a los otros dos se les agregan 7.5 ml de p-DMAB, se agitan y se dejan 15 minutos en reposo en la oscuridad, después de este tiempo se les agrega a los 3 tubos 0.5 ml de nitrito de sodio, se agitan y se dejan otros 15 minutos en reposo. Leer absorbancia a 590 nm. Se usa como blanco el cero de la curva estándar.

- **Cálculos**

A la absorbancia del blanco se le resta la absorbancia de la muestra y el resultado se interpola en la curva estándar, se toman en cuenta el aforo y alícuota usados.

Para poder reportar en g de triptofano/100 g de proteína es necesario conocer el porcentaje de proteína ó nitrógeno en la muestra.

4.4.3 Calificación química (CQ)

Fundamento

Se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que esta en mayor deficiencia en la proteína en estudio, al compararla con el nivel presente en una proteína de referencia. El aminoácido que se encuentra en menor cantidad con respecto a la referencia, es el aminoácido limitante, puesto que determina la utilidad de la proteína (31).

La calificación química de una proteína queda definida así:

Calificación química = $\frac{\text{mg de aminoácido limitante primario} + \text{g proteína estudiada}}{\text{mg del mismo aminoácido} + \text{g de proteína de referencia}} * 100$

4.5 Digestibilidad *in vitro*

Si bien con la información previa se puede visualizar la calidad nutritiva de la fracción proteínica, un parámetro que nos indica la biodisponibilidad de éste nutrimento, es dado por su grado de digestibilidad; por lo tanto, se realizará la determinación de éste índice nutritivo de acuerdo al método oficial establecido por la AOAC (24,36).

4.5.1 Digestibilidad *in vitro* (A.O.A.C) (39)

Fundamento

En la actualidad se han desarrollado y tratado de establecer procedimientos *in vitro* capaces de sustituir a los procedimientos *in vivo*, los cuales, tratan de igualar las condiciones de digestión para determinar la biodisponibilidad de las proteínas (24,36).

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

◆ Reactivos

- ◆ Solución A = Disolver 13.59 mg de tripsina (tipo IX) (SIGMA # T-0134) + 34.44 mg de α -quimotripsina (tipo II) (SIGMA # C-4129) + 5.09 mg de peptidasa L-Leucina- β -naftilamina (SIGMA # P-7500) en 10 ml de H₂O.
- ◆ Solución B = Disolver 11.81 mg de proteasa bacteriana (SIGMA # P-5147) en 10 ml de H₂O.

A continuación se muestran los cálculos realizados para la preparación de la solución A y B, respectivamente:

Solución A

- Tripsina (tipo IX) contiene 100% de proteína y 16,700 BAEE unidades/mg proteína.

$$\frac{1 \text{ mg proteína}}{16,700 \text{ unidades BAEE}} * 227,040 \text{ unidades BAEE} = 13.5952 \text{ mg de proteína}$$

$$\frac{100 \text{ mg tripsina (tipo IX)}}{100 \text{ mg proteína}} * 13.5952 \text{ mg proteína} = 13.5952 \text{ mg de tripsina (tipo IX)}$$

- α -quimiotripsina (tipo II) contiene 54 BAEE unidades/mg sólido.

$$\frac{1 \text{ mg sólido}}{54 \text{ unidades BAEE}} * 1860 \text{ unidades BAEE} = 34.4444 \text{ mg de } \alpha\text{-quimiotripsina.}$$

- Peptidasa L-leucina β - nafilamina contiene 102 unidades/g sólido.

$$\frac{1000 \text{ mg sólido}}{102 \text{ unidades}} * 0.520 \text{ unidades} = 5.0980 \text{ mg de peptidasa.}$$

Solución B

- Caseína de proteasa bacteriana contiene 5.5 unidades/mg sólido

$$\frac{1 \text{ mg sólido}}{5.5 \text{ unidades}} * 65 \text{ unidades} = 11.8181 \text{ mg de proteasa.}$$

◆ Procedimiento

- 1.- Se peso 76.12 mg de caseína que corresponden a 10 mg de nitrógeno de la proteína de referencia (caseína) o muestra a la cual se le añaden 10 ml de agua destilada y se agita a una temperatura de 37°C por 1 hora.
- 2.- Se mide el pH el cual se ajusta a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1 N.
- 3.- Se le adicionan 1.0 ml de solución A (la cual esta a 37°C), y se debe permanecer 10 min. exactamente con agitación a una temperatura de 37°C, transcurrido el tiempo se añade 1.0 ml de solución B (la cual esta a 55°C), permaneciendo en agitación 9

min. a una temperatura de 55°C; una vez transcurrido el tiempo se coloca la muestra a 37°C por 1 min. y a los 20 min. exactamente de haber adicionado la solución A se mide el pH.

4.- El pH de la caseína control o de referencia deberá ser de 6.42 ± 0.05 , solo hasta que se obtiene el pH de la caseína de referencia, se estará en condiciones de realizar la determinación de las muestras a ensayar.

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

4.6 Parámetros fisicoquímicos

Con la finalidad de predecir las propiedades funcionales de la grasa cruda de la almendra de calabaza, se determinaron los parámetros físicos y químicos más comunes en la caracterización de una grasa vegetal, como son: punto de fusión, gravedad específica, índice de acidez, de saponificación por mencionar algunos; además, se le determino su densidad calórica en una bomba calorimétrica (49).

4.6.1.- Gravedad específica (aparente). Método 920.212, AOAC (40)

- ◆ Materiales y reactivos
 - ◆ Picnómetro de 50 ml
 - ◆ Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE10
 - ◆ Balanza analítica
 - ◆ Éter etílico
 - ◆ Etanol

- ◆ **Determinación**

Limpiar cuidadosamente el picnómetro con mezcla crómica. Enjuagar y secar completamente. Llenar el picnómetro con agua recientemente hervida y enfriada a 20°C y colocar en el baño de temperatura controlada a 25°C. Después de 30 minutos, ajustar el nivel de agua en el picnómetro y su capilar, retirar del baño, secar cuidadosamente y pesar. Enjuagar repetidamente con etanol y después con éter. Secar, dejar evaporar cualquier residuo de éter y secar. Determinar por diferencia el peso de agua contenida en el picnómetro a 25°C.

Limpiar y secar el picnómetro cuidadosamente. Llenar con muestra de aceite a 20°C y colocar en el baño a 25°C. Después de 30 minutos ajustar el nivel de aceite en el picnómetro y su capilar, retirar del baño, secar cuidadosamente y pesar. Obtener el peso de la muestra por diferencia entre el picnómetro lleno con la muestra y el picnómetro vacío.

Obtener la gravedad específica aparente de la muestra dividiendo el peso del aceite entre el peso del agua (ambos medidos en el mismo picnómetro).

4.6.2.- Índice de yodo (Método de Hanus). Método 920.150, AOAC (40)

Fundamento

Los acilglicérols de los ácidos grasos insaturados presentes en la grasa (principalmente los de la serie del ácido oleico) se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad definida de monobromuro de yodo (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso en la determinación. La cantidad de halógeno restante es titulada con solución valorada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y por diferencia con un blanco se obtiene la

cantidad de monobromuro de yodo adsorbido por la muestra (20).

- ◆ **Material y reactivos**
 - ◆ Matracas de Yodo de 500 ml.
 - ◆ Probeta de vidrio de 10 ml.
 - ◆ Buretas graduadas de vidrio de 50 ml.
 - ◆ Balanza analítica.
 - ◆ Ácido acético glacial.
 - ◆ Yodo.
 - ◆ Tiosulfato de sodio
 - ◆ Bromo.
 - ◆ Solución de yoduro de potasio al 15% w/v.
 - ◆ Solución de almidón al 1% w/v.
 - ◆ Cloroformo.
 - ◆ Ácido clorhídrico 1N.
 - ◆ Dicromato de potasio.
 - ◆ Solución de Hanus

* **Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1N**

Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición moderada y mantener durante 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco contenedor (de preferencia de color ámbar) previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada hervida. Guardar en la oscuridad en un lugar templado. No regresar residuos de reactivo al frasco.

Pesar en balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de $K_2Cr_2O_7$ (secado a $100^\circ C$ durante 2 horas) en matraz Erlenmeyer. Disolver en 80 ml de agua destilada junto con 2 g de KI. Añadir 20 ml de HCl 1N y guardar inmediatamente en la oscuridad durante 10 minutos. Titular con la solución de $Na_2S_2O_3$, añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración (25), siendo el vire color azul. Calcular la normalidad de la solución de $Na_2S_2O_3$ mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{g \text{ } K_2Cr_2O_7 \times 1000}{ml \text{ } Na_2S_2O_3 \times 49.032}$$

Donde:

49,032 = miliequivalentes de $Na_2S_2O_3$

◆ Determinación

Pesar 0.2 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio y disolver en 10 ml de cloroformo ($CHCl_3$). Con bureta graduada, añadir 25 ml de solución de Hanus y dejar reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación ocasional. Para resultados más precisos, es conveniente cumplir con los mismos tiempo de drenado de bureta y estancia en la oscuridad en todas las determinaciones.

Añadir 10 ml de la solución al 15% de KI, agitar vigorosamente y añadir 100 ml de agua destilada recientemente hervida y enfriada, cuidando de lavar cualquier residuo que quede en el tapón de vidrio. Titular con solución de $Na_2S_2O_3$ 0.1 N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca. Añadir unas cuantas gotas de solución de almidón al 1% y continuar titulado hasta que el color naranja de la solución desaparezca completamente. Hacia el final de la titulación, tapar matraz y

agitar vigorosamente para que el yodo remanente en solución en CHCl_3 sea también titulado.

Llevar a cabo 2 blancos bajo las mismas condiciones.

◆ Cálculos

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(B-S) \times N \times 12.69}{\text{g muestra}}$$

Donde:

B= ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en blanco.

S= ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en muestra.

N= normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

12.69 = miliequivalentes de yodo

4.6.3.- Índice de saponificación. Método 920.160, AOAC (40)

Fundamento

Los ácidos grasos de los acilglicéridos de la grasa son liberados con una solución de KOH en etanol (la cual se añade en exceso), obteniéndose glicerol y las sales respectivas de los ácidos grasos. El KOH sin reaccionar se titula con HCl 0.5N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de KOH empleado para saponificar la muestra.

◆ Materiales y reactivos

- ◆ Balanza analítica
- ◆ Matraces de bola de fondo plano de 250 ml
- ◆ Matraz de fondo plano con cuello largo de 1 litro
- ◆ Refrigerante de aire
- ◆ Buretas graduadas de 50 ml

- ◆ Canastilla de calentamiento
- ◆ Mortero
- ◆ Hidróxido de potasio
- ◆ Óxido de calcio granulado
- ◆ Etanol
- ◆ Ácido clorhídrico 0.5N
- ◆ Solución indicadora de fenolftaleína al 1% w/v en metanol

* Preparación de la solución etanólica de KOH 0.5 N

Triturar 13.75 g de KOH en un mortero, de 500 ml de etanol, añadir 100 ml al mortero y transferir a un matraz con cuello largo. Transferir cuantitativamente el contenido del mortero con ayuda de varias porciones de etanol. Añadir el etanol restante al matraz, agitar vigorosamente durante 5 minutos y posteriormente se deja reposar la solución. Guardar en un frasco con tapón de vidrio.

◆ Determinación

Pesar en balanza analítica 1 g de la grasa en un matraz de bola, añadir con la bureta 50 ml de la solución de KOH. Conectar el matraz en reflujo y llevar hasta ebullición con canastilla, manteniendo ésta hasta que la muestra esté totalmente saponificada (aproximadamente 30 minutos). Enfriar y titular en frío con HCl 0.5N usando fenolftaleína al 1% como indicador. Llevar a cabo un blanco bajo las mismas condiciones que la muestra.

- ◆ Cálculos

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{28.05 \times (B - S)}{\text{g de muestra}}$$

Donde:

B = ml de HCl 0,5N gastados en blanco.

S = ml de HCl 0,5N gastados en muestra.

28.05 = PM KOH x 0.5 N

4.6.4.- Índice de refracción. Método 921.08, AOAC (40)

- ◆ Materiales

- ◆ Refractómetro de Abbé OPL No. 2154

- ◆ Determinación

Determinar el índice de refracción del aceite a 20 o 25°C, haciendo circular agua a dicha temperatura a través del prisma del aparato. Colocar el refractómetro de tal manera que reciba la luz difusa del día o de alguna fuente artificial (lámpara de sodio) de frente al analista.

Abrir el prisma girando el tornillo que lo mantiene cerrado, añadir unas cuantas gotas del aceite y con una varilla de vidrio expandir la muestra en toda la superficie del prisma. Girar el tornillo para cerrar el prisma y dejar la muestra unos minutos a que se atempere a la temperatura del agua circulante.

La medición se basa en la posición de la llamada frontera o borde de reflejo total en relación a las caras del prisma. Llevar este borde al punto de intersección indicado a través del ocular con ayuda del tornillo correspondiente, de tal manera que el campo de visión se halle dividido en una mitad luminosa y otra oscura. En el otro

ocular leer directamente en la escala el índice de refracción.

El refractómetro puede calibrarse con agua destilada siguiendo el procedimiento previamente descrito. El cero de la escala de la derecha vista a través del ocular debe coincidir con el cero de la escala móvil. En caso contrario, hacer la corrección correspondiente en las lecturas.

4.6.5.- Índice de acidez. Método 942.18, AOAC (40)

- ◆ **Materiales y reactivos**
 - ◆ Matraces Erlenmeyer de 250 ml
 - ◆ Bureta graduada de 50 ml
 - ◆ Etanol
 - ◆ Solución indicadora de fenolftaleína al 1%
 - ◆ Hidróxido de sodio 0.1 N

- ◆ **Determinación**

Neutralizar 50 ml de etanol con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador, hasta obtener una coloración levemente rosada. Pesar de 1 a 10 g de aceite o grasa fundida en el matraz Erlenmeyer y añadir el etanol neutralizado. Titular con NaOH 0.1 N agitando constantemente hasta que el color rosa permanezca durante 15 segundos. Preferentemente, la titulación no debe consumir más de 10 ml, de otra forma se pueden separar las 2 fases. Esto no ocurre si se usa alcohol neutro caliente como disolvente.

- Cálculos

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g muestra)} = \frac{m_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 56.1}{\text{g muestra}}$$

Donde:

56.1 = Peso molecular del KOH

En el caso de querer expresar el índice de acidez como % de ácido oleico se usa la siguiente expresión:

$$\% \text{ ácido oleico} = \frac{m_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 0.282}{\text{g muestra}} \times 100$$

Donde :

0.282 = meq ác. Oleico (PM ác. Oleico/1000)

Ambas expresiones se relacionan aproximadamente de la siguiente forma:

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g muestra)} = 2 \times \% \text{ ácido oleico}$$

4.6.1.1 Energía gruesa (EG)

Es la cantidad de calor resultante de la oxidación de un alimento, dieta o cualquier otra sustancia. La determinación de ésta se hace en una bomba calorimétrica. Los valores de EG de los diferentes nutrimentos varían, pero generalizando son: 4.10 kcal/g para carbohidratos, 5.65 kcal/g para proteínas y 9.45 kcal/g para grasas (28).

Fundamento

La EG o densidad calórica de un alimento o dieta es la cantidad de energía que proporciona un gramo del mismo alimento o dieta. Para obtener la energía gruesa de una muestra, ésta se somete a una combustión total dentro de un recipiente cerrado en presencia de un exceso de oxígeno, lo cual nos brinda la confianza de una completa combustión.

- ◆ **Material y reactivos**

- ◆ **Ácido benzoico (valor calórico certificado)**
- ◆ **Desecador de vidrio**
- ◆ **Balanza analítica**
- ◆ **Estufa de secado a presión reducida**
- ◆ **Mecha de algodón de 75 mm de longitud**
- ◆ **Crisol de acero inoxidable de 254 mm de diámetro**
- ◆ **Mango metálico compactador**
- ◆ **Bomba calorimétrica ballística GALLENKAMP, mod. CBB-330-010.**

- ◆ **Procedimiento**

La muestra debe ser lo más fiel representativa del total, para lo cual se recomienda que esté finamente molida. La cantidad de muestra depende del contenido calórico esperado, ya que se recomienda que la cantidad pesada libere aproximadamente 16 kJ (4.0 kcal), para que entre en el rango de detección del instrumento. Así tenemos que materiales con alta densidad calórica como grasas con 0.4 g de muestra será suficiente; mientras que para muestras con baja densidad como la urea se requerirá hasta de 1.5 g de material.

La muestra en forma de harina se coloca en un crisol tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que el hilo quede introducido dentro de la muestra, y se procede a pesar en una balanza analítica lo que corresponde al peso preliminar (Pp), recomendándose pesar un exceso aproximado 10 % del peso deseado. Se compacta la muestra con el mango metálico de tal forma que quede lo mas uniforme posible y

la mecha quede introducida dentro de la muestra, sobrando un tramo que servirá para contactar con el alambre de ignición de la bomba. Se debe eliminar con mucho cuidado el material que no se halla compactado y el crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso final (Pf).

El crisol se coloca en la base superior del pilar central de la bomba y con mucho cuidado se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición. A continuación se procede a realizar la combustión, para lo cual se debe revisar que el "O-RING" se encuentre en perfectas condiciones, ya que debe obtener un cierre hermético. El cierre se realiza colocando el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico y se gire éste hasta que coincida la rosca con el del capuchón, el sellado se debe hacer con la fuerza de la mano, no utilizar herramienta alguna. En seguida se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

Teniendo suministro de oxígeno a presión (mínima de 30 bars), se procede a abrir la válvula de paso girando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ la perilla y se debe obtener una presión dentro de la bomba ballística de 25 bars (1 bar = 0.987 atmósferas) en aproximadamente 20 a 30 segundos. Una vez alcanzada la presión, se cierra la válvula de paso y se procede a ajustar el galvanómetro a cero con ayuda primero del ajuste grueso y posteriormente con el dispositivo de ajuste fino. Si las condiciones anteriores se mantienen por aproximadamente 10 segundos, se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro. Se debe observar con atención el movimiento del indicador en el galvanómetro, ya que una vez alcanzado el valor máximo empieza a decaer

rápidamente. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.

Una vez tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba del lado opuesto a entrada del oxígeno; a la vez, se desconecta el sensor del termopar y una vez liberados los gases de combustión, se procede a abrir la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, cierre la válvula de liberación de gases y enfrie el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente, para poder realizar una nueva determinación.

◆ Cálculos

Para poder calcular la densidad calórica de la muestra, es necesario contar con una curva estándar, para lo cual se debe realizar la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico y anotar la respectiva lectura de la escala del galvanómetro. Se recomienda pesar entre 0.1 a 0.7 g de ácido benzoico (valor calórico certificado); además, será necesario llevar a cabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, ya que el valor obtenido se deberá restar, o la escala del galvanómetro se puede ajustar para obtener la lectura en forma directa.

Es necesario realizar la determinación mínimo por triplicado, y una vez obtenida la lectura, se debe convertir a unidades energéticas, para lo cual tenemos las siguientes conversiones:

$$1 \text{ g de ácido benzoico} = 26454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ Kj} = 6.3175 \text{ Kcal}$$

$$4.1868 \text{ Kj} = 1 \text{ Kcal}$$

Una vez que se cuente con la curva estándar de contenido calórico (abcisas) vs. Lectura del galvanómetro (ordenadas), se podrá obtener por interpolación la densidad calórica de la muestra.

4.7 Perfil de ácidos grasos (40)

A la fracción lipídica se le determinó el perfil de ácidos grasos, para poder predecir su posible utilización como aceite comestible y además visualizar su calidad nutritiva (40).

4.7.1 Método de Cromatografía de gases

- ◆ **Materiales y reactivos**
 - ◆ Tubo de ensaye con tapón de rosca
 - ◆ Baño maría eléctrico
 - ◆ Cromatógrafo de gases Marca Perkin Elmer AutoSistem con detector de ionización de flama
 - ◆ Columna capilar de 30 m de longitud, Heliflex AT-Silar (50% cianopropil – 50 metil polixiloxano).
 - ◆ Temperatura del inyector 250°C
 - ◆ Temperatura del detector 300°C
 - ◆ Temperatura inicial de la columna: 50°C por 1 min. Va subiendo 10°C cada minuto hasta llegar a 180°C y se mantiene por 2 minutos, posteriormente sube 5°C cada minuto hasta llegar a los 240°C y se mantiene por 2 minutos.
 - ◆ Gas acarreador: Helio

- ◆ Estándares de referencia (Poli Science, USA)
- ◆ Solución de KOH al 5% en MeOH
- ◆ Solución de HCl al 10% en MeOH
- ◆ Hexano grado cromatográfico
- ◆ Trifloruro de boro en Metanol
- ◆ Determinación

En un tubo de ensaye con tapón de rosca se colocan 30 mg del aceite a evaluar, cuidando de haber eliminado la mayor parte del disolvente empleado en la extracción previa. Se añaden 1.5 ml de solución de KOH al 5% en metanol. Se tapa el tubo y se calienta a 80°C por 30 minutos, terminado el tiempo se deja enfriar. Posteriormente se agregan 2.0 ml de la solución de HCl al 10% en metanol junto con 200 µl de BF₃ en metanol y 1.0 ml de hexano, se tapa y se calienta nuevamente a 80°C por 30 minutos. Con la muestra fría se agrega 8 ml de agua y 3 ml de hexano y se agita por 1 minuto. Posteriormente se extrae la fase superior de hexano y se coloca en un matraz de 5 ml, se hacen dos extracciones mas y se afora a 5 ml con hexano. Tomar 1.0 µl e inyectar en el cromatógrafo de gases.

Los ácidos grasos en las muestras fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de estándares (25).

- ◆ Cálculos

En los cromatogramas del aceite de la almendra de calabaza, se obtienen además de los tiempos de retención, las áreas de los diferentes ácidos grasos y con ellos se puede obtener el porcentaje correspondiente a cada ácido graso que se encuentra en el aceite de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de " x " ácido graso} = \frac{\text{área parcial}}{\text{área total}} \times 100$$

4.8 Toxicología analítica

Se utilizaron métodos químicos e incluso ensayos *in vitro*, en la cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales que con mayor frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal como son: inhibidores de tripsina, lectinas, glucosidos cianogénicos, alcaloides, taninos, ácido fítico, nitratos y saponinas (33,34,35,41,42,44,46). Si bien la aplicación de esta fase será principalmente sobre la harina desengrasada, no se descarta la detección y cuantificación de algunos factores tóxicos en la fracción lipídica como son ácidos grasos indeseables (ácido erúxico por ejemplo) y la presencia de alcaloides en su forma libre ó básica.

4.8.1 Determinación semicuantitativa de hemaglutininas. Método de Jaffé (42)

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 / Reactivos**

- ◆ Agitador magnético con tacómetro marca Thermolyne mod. SP-13025
- ◆ Centrifuga para tubos marca Dynac CL mod. No. 0101 con cabezal para tubos de 15 ml.
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 ml con graduación.
- ◆ Jeringa de 5 ml con agua # 22.
- ◆ Incubadora marca BLUE-M mod. 200A
- ◆ Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340.
- ◆ Adaptador para celdas de 12 * 80 mm.
- ◆ Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- ◆ Filtro de vidrio poroso (poro grueso).
- ◆ Sangre desfibrinada y lavada.
- ◆ Solución anticoagulante (a).
- ◆ Solución salina al 1%
- ◆ Solución salina al 0.9%
- ◆ Solución de proteasa al 0.2% en solución salina (b).
- ◆ Tripsina de páncreas porcino (SIGMAT-8128)
- ◆ Pronasa de *S. griseus* (SIGMA P-5005).
- ◆ Solución Elsever (c).

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

Solución de heparina: dependiendo de su actividad (expresada en UI) se usa en la proporción de 15 a 20 UI por 1ml. de sangre

Solución de citrato de sodio (3.8%): por cada 1ml. de sangre se adiciona 0.1ml. de solución anticoagulante.

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, hámster, etc.), es conveniente trabajar con proteasa al 0.2% en solución salina.

c) Composición de la solución Elsever: glucosa 0.6833 g, citrato de sodio 0.8080 g, ácido cítrico 0.0550 g, cloruro de sodio 0.4200 g, llevar a 100 ml con agua destilada.

◆ Procedimiento

a) Preparación del extracto

Una vez que se tuvo la muestra finamente molida y desengrasada, se suspendió 1 gr. en 10 ml de solución salina al 1%, se efectuó una extracción con agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se centrifugó el extracto a 1,400 r.p.m. durante 15

minutos para eliminar el residuo insoluble, el sobrenadante se filtró 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 de 10 ml.

b) Preparación de la sangre

Se sangró a un hámster y la sangre se colocó en un matraz pequeño que contuviera solución anticoagulante, se agitó suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución anticoagulante y se trasvasó a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5. Se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se midió en el tubo, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyeron al 4% para lo cual se agregaron por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% se les agregó 1 ml de solución de pronasa al 0.2% y se colocó en la incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. Se centrifugó para eliminar la enzima sobrenadante, se lavó 3 veces con solución salina al 0.9%, después del último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos al 3% (por cada 1ml de paquete de eritrocitos se adicionó 32 ml de solución salina al 0.9%).

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario filtrar esta suspensión, 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 tomó 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizada y se agregaron 4.9 ml de solución salina al 0.9%. Se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permitiera el paso de solo 1 cm² de luz y como blanco solución salina al 0.9%.

La lectura que se obtuvo estuvo en el rango de 26.5 ± 2.5 (24% a 29%) de transmitancia, en caso contrario se tendría que realizar la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quedara dentro de dicho rango.

e) Microtitulación

En las placas tipo "V" del microtiter, se colocó en cada pozo de una hilera 50 µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo.

Se llenó el microdilutor de 50 µl por contacto con la superficie del extracto problema y se introdujo en el primer pozo girándolo sin excesiva presión, posteriormente se pasa el microdilutor al siguiente pozo se gira y así sucesivamente, es decir se realiza una microdilución seriada.

Cuando se trabaja con sangre de alta sensibilidad (como la de hámster o ratón) o un extracto de alta actividad hemaglutinante, es conveniente realizar un mayor número de diluciones, recomendándose tomar hasta tres hileras, realizando la microdilución en forma de culebra (zig – zag)

Con un pipetero de gota se colocó en cada pozo 50 μ l de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada. Luego se rotó la placa en forma circular y se llevó a la incubadora a 37°C por 1 hora.

f) Detección

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se coloca la placa de plástico sobre el dispositivo de lectura. Se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la máxima dilución que presente prueba positiva de aglutinación de manera visual.

g) Interpretación

Cuando se utiliza sangre de hámster, si el título obtenido es ≤ 10 trabajando con el extracto directo se puede considerar un bajo nivel de lectinas en el material, se puede usar como referencia un frijol (*Ph. vulgaris*) con alto título de aglutinación para comparar el título obtenido contra este (aproximadamente 24-36). En el caso de obtener un título ≥ 12 es conveniente hacer la determinación cuantitativa.

4.8.2 Determinación de glucósidos cianogénicos. (35)

Fundamento

El presente método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual, consiste en hacer reaccionar picrato de sodio con el HCN para producir isopurpurina (compuesto colorido). Para poder cuantificar el HCN total que se libera se hace uso de una hidrólisis enzimática con una β -glucosidasa del correspondiente

glucósido cianogénico. Este método puede detectar hasta 5.0 µg de HCN.

◆ **Materiales / Reactivos**

- ◆ Incubadora marca BLUE-M
- ◆ Congelador comercial
- ◆ Espectrofotómetro Sequoia – Turner mod 340
- ◆ Baño de agua con agitación marca LAB-LINE INSTRUMENT
- ◆ Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX #9825 y 9826
- ◆ Micromolino marca TECATOR mod. CYCLO-TEC
- ◆ Papel indicador de HCN
- ◆ Solución de β-glucosidasa con activador
- ◆ Solución de KCN equivalente a 100 (g HCN/ml (24.1 mg/100ml)
- ◆ HCl 0.5 N
- ◆ Buffer de fosfatos pH = 7.0
- ◆ Solución de picrato de sodio alcalinizada
- ◆ Fécula de maíz comercial

◆ **Procedimiento**

a) **Curva estándar**

Para la elaboración de la curva estándar de referencia, se usó una solución de cianuro de potasio con una concentración de 100 µg HCN/ml. Además con el fin de simular la interacción muestra –HCN liberada, se introdujo en la curva estándar la

llamada matriz alimenticia, que en este caso fue fécula de maíz comercial.

* Tubos para la curva estándar

ml solución estándar	Matriz alimenticia	Buffer pH = 7	40°C / 4 hrs.	HCl 0.5 N (en frío)	Concentración de HCN (g)
0.00	500 mg	5.0 ml			1.0 ml
0.05	"	"		"	5.00
0.20	"	"		"	20.00
0.40	"	"		"	40.00
0.60	"	"		"	60.00

La curva estándar va de 5-60 μg de HCN, ya que fue el intervalo 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 trabajaron en la misma forma que para la liberación de HCN en la muestra.

b) Preparación de la muestra

Cuando se quiere determinar con suma precisión el contenido de HCN en una muestra fresca, es necesario partir del material íntegro; para lo cual, el material se sometió a una molienda fina e inmediatamente se pasó a un frasco que cerraba perfectamente.

c) Procedimiento de análisis.

Para la liberación del HCN de la muestra, se colocó en un tubo de cultivo Pyrex # 9826 500 mg de muestra, a continuación se le adicionaron 5.0 ml de solución de β -glucosidasa (fría), se homogeneizó y se procedió a colocar la tira de papel indicador de 2x10cm (la cual previamente tuvo que estar impregnada con solución de ácido picrico alcalinizado y secada en una estufa 30 min. a 60°C) humedecida (aproximadamente con ocho gotas de agua) en la boca del tubo y se cerró herméticamente con un tapón de rosca.

Una vez que se tuvo el anterior dispositivo se colocó en el baño María que estaba a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1$, con el control de velocidad de agitación ajustado a 3.5 oscilaciones/minuto, durante 4 horas. Al final de dicho tiempo se sacó el tubo y se colocó en el congelador por 30 minutos.

Transcurrido el anterior tiempo se sacó el tubo y se destapó para adicionarle 1.0 ml de HCl 0.5 N (frío); es importante que se usen los tapones adecuados, de esta forma la tira de papel indicador queda adherida a dicho tapón y se evitarán problemas de manipulación en este paso.

Una vez adicionado el HCl, se vuelve a cerrar nuevamente, se homogeneizó teniendo la precaución de que el líquido no tocara el papel indicador y se colocó en la incubadora por espacio de 15 minutos a la temperatura de 60°C . Transcurrido ese tiempo, se sacó de la incubadora y en ese momento se procedió a realizar visualmente la detección cualitativa, aquellos tubos que no muestren ni siquiera ligera coloración café-rojiza en el papel indicador, se consideran negativos; en tanto aquellos que si la muestren, se consideraran positivos y se procede a su detección cuantitativa.

d) Determinación cuantitativa

Con cuidado se procede a recuperar el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo Pyrex # 9895, se le adicionan 20 ml 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 (aprox. de 2-5 minutos) se recupera el disolvente (agua), eliminando los residuos por una simple filtración con papel de filtración rápida. El filtrado se coloca en la fotocelda para su lectura con

el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm; previamente ajustado a 100% T con el blanco correspondiente (todos los reactivos, excepto la muestra).

e) Cálculos

Trazar la curva patrón usando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y las correspondientes concentraciones de HCN en μg en el eje de las abscisas. Interpolar el valor de absorbancia de la muestra en la gráfica para obtener el contenido de HCN liberado en μg . Para obtener el contenido de HCN en la muestra:

$$X * 100/M = \text{mg HCN}/100 \text{ g de muestra.}$$

Donde:

X = μg de HCN.

M = mg de muestra.

$$\mu\text{g HCN} * \text{mg muestra} * 1 \text{ mg HCN}/1000 \mu\text{g HCN} * 1000 \text{ mg muestra}/1 \text{ g muestra} = \frac{\text{mg HCN}}{\text{g muestra}}$$

$$\begin{array}{l} \text{mg HCN} \text{ --- g muestra} \\ x \quad \text{--- } 100 \text{ g muestra} \end{array}$$

$$\text{mg HCN/g muestra} * 100 = \text{mg HCN}/100 \text{ g muestra.}$$

4.8.3 Determinación de Inhibidores de Tripsina. Método de Kakade (44)

Fundamento

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N) de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$), y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl también llamado BAPNA), el cual producirá una coloración que se

lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Dicha coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm., por 10 ml de mezcla de reacción descritas por Kakade y colaboradores. La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.).

◆ **Material/ Reactivos**

- ◆ Potenciometro CORNING, mod 10
- ◆ Parrilla con agitación magnética THERMOLINE, mod SP-13025
- ◆ Baño maría GRANT, mod SE 10
- ◆ Espectrofotómetro COLEMAN, mod. Junior II-A
- ◆ Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Super-mixer
- ◆ Solución buffer TRIS (hidroximetil-amino-metano) 50 mM + 10 mM de CaCl_2 dihidratado con pH de 8.2
- ◆ Solución BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl)
- ◆ Acido acético al 30%
- ◆ Solución stock de tripsina bovina (SIGMA # T-8253)
- ◆ Solución de HCL 0.001 N
- ◆ Dimetilsulfoxido

Preparación de soluciones

1.- Para la preparación del Buffer Tris se pesaron 6.05 g de Tris y se disolvieron en 1000 ml de agua destilada, junto con 2.94 g de CaCl_2 dihidratado, finalmente se llevó a pH 8.2.

2.- 100 mg de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) se disuelven en 2.5 ml de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 ml 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.

3.- Para la preparación de la solución stock de tripsina bovina (SIGMA # T-8253), se disolvieron 4 mg de ésta en 200 ml de la solución de HCl 0.001 N, y se deja en el baño a 37°C. Esta solución contiene 20 µg de tripsina/ml y debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

◆ Procedimiento

a) Preparación del extracto

Se pesó 1 g de muestra finamente molida y desengrasada en un vaso de precipitado y se le adicionaron 45 ml de NaOH 0.01 N, se ajusta el pH de esta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora a 50 ml con NaOH 0.01 N, a continuación mediante la ayuda de un magneto, se agitó la suspensión mecánicamente en la parrilla de agitación por espacio de 2 ½ horas a 300 r.p.m. Después de dicho tiempo se quitó el magneto y se deja ½ hora en reposo, y por simple decantación se obtiene el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 ml produzca una inhibición de 40-60%; este requisito es indispensable para reducir nuestra desviación estándar relativa.

b) Determinación de la actividad

Se hizo una dilución 6:10 del extracto y la determinación se realizó por triplicado,

se rotularon tubos de ensaye de la siguiente manera:

Clave	ml de extracto	ml H ₂ O	ml estándar de tripsina	10 min.	ml. BAPNA a 37°C	10 min.	ácido acético al 30% (AA)
B ₁	1.8	0.2	2.0 + 1 ml AA		5.0		
1	1.8	0.2	2.0		5.0		1.0
B ₂	1.4	0.6	2.0 + 1 ml AA		5.0		
2	1.4	0.6	2.0		5.0		1.0
B ₃	1.0	1.0	2.0 + 1 ml AA		5.0		
3	1.0	1.0	2.0		5.0		1.0
B ₄	0.6	1.4	2.0 + 1 ml AA		5.0		
4	0.60.0	1.4	2.0		5.0		1.0
B _{ref}	0.0	2.0	2.0 + 1 ml AA		5.0		
Ref	0.0	2.0	2.0		5.0		1.0

c) Cálculos

La lectura de absorbancia (A), directamente se puede pasar a unidades de tripsina:

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

Ya que ponemos una serie de alícuotas del extracto, tendremos a su vez una serie de valores de U.T., los cuales al restar este valor al dato de referencia, obtendremos los respectivos valores de unidades de tripsina inhibida (U.T.I.) y por consiguiente se puede calcular el valor de U.T.I./ml de cada una de las alícuotas.

Cuando se pone en una gráfica la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./ml) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se puede obtener el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria. Este dato extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera o real.

Es conveniente reportar las unidades de inhibición por mg de proteína de la

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

muestra, para lo cual es necesario determinar el contenido de proteína en el extracto directo, también se puede reportar las unidades de inhibición con respecto a 1 mg de muestra:

$$\% \text{ inhibición} = [(UT_{\text{referencia}} - UT_{\text{muestra}}) / UT_{\text{referencia}}] \times 100$$

$$UTI/\text{mg de muestra} = B \times F \times (50/1000)$$

Donde:

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

F = Factor de dilución, el cual depende de la dilución realizada.

50 = Aforo

4.8.4. Determinación semicuantitativa de alcaloides en muestra desengrasada (33)

Fundamento

El material seco y desengrasado se extrae con metanol. Una solución acuosa de la porción soluble en ácido del extracto con metanol fue hecho básico con amoniaco y sujeto a extracción diferencial con cloroformo-etanol. Los dos extractos se ensayan 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 Sonnenschein (ácido fosfomolibdénico)
5. Reactivo Hager (ácido pícrico)
6. Reactivo Scheibler (ácido fosfotungsticio)
7. Reactivo de ácido silicotungstenico

El precipitado formado con los reactivos para alcaloides varían en cantidades con los diferentes alcaloides; en consecuencia, una estimación de la concentración

de 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 siete diferentes reactivos de alcaloides, comparando con los precipitados obtenidos con una solución de estricnina de concentración conocida.

◆ **Material/Reactivos**

- ◆ Embudo de separación de 125 ml.
- ◆ Parrilla de agitación CORNING Mod. PC-351
- ◆ Estufa de vacío marca LAB-LINE INSTRUMENTS.
- ◆ Papel filtro Whatman No. 1
- ◆ Rotavapor marca BUCHI Mod. R.
- ◆ Acido nítrico (30%)
- ◆ Acido sulfúrico (1%)
- ◆ Acido silicotugstico
- ◆ Metanol (R.A.)
- ◆ Amoniac concentrado (aprox. 25%)
- ◆ Cloroformo (R.A.)
- ◆ Etanol (R.A.)
- ◆ Sulfato de sodio anhidro (R.A.)
- ◆ Estrictina (U.S.P.)
- ◆ Reactivo de MAYER (1)
- ◆ Reactivo de WAGNER (2)
- ◆ Reactivo de DRAGENDORFF (3)

- ◆ Reactivo de SONNENSCHNEIDER (4)
- ◆ Reactivo de HAGER (5)
- ◆ Reactivo de SCHEIBLER (6)
- ◆ Reactivo de ACIDO SILICOTUNGSTENICO (7)

1. Se disolvieron 1.36 g de $HgCl_2$ en 60 ml de agua y 5.0 g de KI en 10 ml de agua. Se juntaron las dos soluciones y se aforaron a 100 ml con agua destilada.
2. Se disolvieron 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua; la solución se aforó a 100 ml con agua destilada.
3. Se disolvieron 8.0 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico (densidad 1.18 o sea el 30%) y 27.2 g de KI en 50 ml de agua. Se mezclaron las 2 soluciones y se dejaron reposar 24 horas. Se decantó la solución y se aforó con agua a 100 ml.
4. A 100 ml de una solución caliente de molibdato de amonio (43 g/100ml), se adicionó 100 ml de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g/100ml); a esta solución clara se adicionó 10 ml de ácido nítrico concentrado; al precipitado amarillo que se formó se dejó reposar durante una hora. Se decantó el líquido sobrenadante y se desechó, se suspendió el precipitado amarillo en 50 ml de agua destilada y se calentó. A la suspensión caliente se adicionó 100 ml de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g/100ml). Una solución clara debió formarse, y esta solución es evaporada en cápsula a sequedad; se flameó la superficie del polvo con un mechero Bunsen hasta encenderse para evaporarse las sales de amonio. Se pesó el polvo que debió ser de aprox. 30 g. Se disuelve el polvo con 200 ml de agua destilada caliente, se calentó y se

adicionó a ésta solución 50 ml de ácido nítrico concentrado. A ésta solución se le adicionó agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 ml; resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

5. Se preparó una solución acuosa saturada de ácido pícrico, (2g/100ml).
6. Se disolvieron en 50 ml de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se aciduló con ácido nítrico.
7. Se disuelven 5 g de ácido silicotúngstico en el ácido sulfúrico (6N) necesario para formar 100 ml de solución.

◆ Procedimiento

Aproximadamente 3 g de muestra seca, molida y desengrasada, se mantuvo toda la noche con 40 ml de metanol; a continuación se calentó durante 4 horas a 50°C en la campana (agitando sin interrupción).

La mezcla fue filtrada en papel Whatman No. 1, y el residuo fue lavado con 20 ml de metanol, los extractos se combinaron y se evaporó el metanol en un rotavapor. El residuo fue resuspendido con 2 ml de metanol y 12 ml de HCl al 1%; la mezcla fue agitada y filtrada; para lavar el residuo se usaron 8 ml de HCl al 1%, se combinaron los extractos filtrados y se hizo básico con amoniaco concentrado (aprox. 25%). Se extrajo con tres porciones de 20 ml de cloroformo cada una, dando la FRACCION "A".

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

Las fases orgánicas fueron lavadas con 5 ml de solución saturada de sulfato de sodio y secada con sulfato de sodio anhidro. Las dos fracciones A y B, fueron evaporadas en un rotavapor por separado; y el residuo fue resuspendido con 1.5 ml de HCl al 1% y 1.5 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción fue pipeteada y filtrada a través de algodón y dividida en 7 porciones; éstas alcuotas son ensayadas con los 7 reactivos de alcaloides:

1. Reactivo de MAYER: El reactivo sólo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o ácido sulfúrico diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse una 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 obtiene un precipitado anaranjado-marrón.
4. Reactivo de SONNENCHEIN: Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos.
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 blanco-grisáceo.
7. Reactivo de ACIDO SILICOTUGSTENICO: La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.

- ◆ Interpretación de 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 selección de plantas, cuando cualquiera de las dos fracciones (A y B) dan reacción positiva con los 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.

4.8.4.1 Determinación semicuantitativa de alcaloides en aceite crudo. (33)

- ◆ Material/Reactivos

- ◆ Embudo de separación de 125 ml.
- ◆ Rotavapor marca BUCHI Mod. R.
- ◆ Acido sulfúrico (2 N)
- ◆ Acido clorhídrico al 1%
- ◆ Amoniaco concentrado (aprox. 25%)
- ◆ Cloroformo (R.A.)
- ◆ Etanol (R.A.)
- ◆ Sulfato de sodio anhidro (R.A.)

- ◆ Brucina (estándar)
 - ◆ Reactivo de MAYER (1)
 - ◆ Reactivo de WAGNER (2)
 - ◆ Reactivo de DRAGENDORFF (3)
 - ◆ Reactivo de SONNENSCHNEIDER (4)
 - ◆ Reactivo de HAGER (5)
 - ◆ Reactivo de SCHEIBLER (6)
 - ◆ Reactivo de ACIDO SILICOTUNGSTENICO (7)
-
- ◆ Procedimiento

Aproximadamente 5 ml del aceite se colocan en un embudo de separación para ser lavados 4 veces con 5 ml de H_2SO_4 .

Posteriormente se combinaron los extractos de la separación anterior y se hizo básico con amoníaco concentrado (aprox. 25%) y nuevamente se extrae con tres porciones de 20 ml de cloroformo cada una, dando la FRACCION "A".

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

Las fases orgánicas fueron lavadas con 5 ml de solución saturada de sulfato de sodio y secada con sulfato de sodio anhidro. Las dos fracciones A y B, fueron evaporadas en un rotavapor por separado; y el residuo fue resuspendido con 1.5 ml de H_2SO_4 2N y 1.5 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción fue pipeteada y filtrada a través de algodón y dividida en 7 porciones;

éstas alícuotas son ensayadas con los 7 reactivos de alcaloides.

- ◆ Interpretación de 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 selección de plantas, cuando cualquiera de las dos fracciones (A y B) dan reacción positiva con los siete reactivos anteriormente enumerados.

4.8.5 Determinación de Taninos. Método ISO 9648:1988 (45)

Fundamento

El método ISO 9648:1988 (Método para fenoles totales complejos ión metal-fenol), se basa en la reducción del ión férrico debida a los polifenoles con la posterior formación de un compuesto colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 525 nm .

- ◆ Material/Reactivos

- ◆ Probeta de 50 ml
- ◆ Matraz Erlenmeyer de 125ml
- ◆ Matraz aforado de 25 ml
- ◆ Embudo de tallo corto
- ◆ Tubos de ensaye de 16x150
- ◆ Pipetas de 1 ml
- ◆ Pipetas de 5 ml
- ◆ Pipetas de 10 ml

- ◆ Vasos de precipitados de 50 ml
- ◆ Solución de Dimetilformamida al 75% (1)
- ◆ Solución estándar de ácido tánico (2)
- ◆ Solución de citrato férrico de amonio (3)
- ◆ Amoniaco (4)

1.- Se midieron en una probeta 75 ml de dimetilformamida y se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml para aforarse con agua destilada.

2.- Se preparó una solución que tuviera 0.2 g/100ml

3.- Se pesó 0.35 g de citrato férrico de amonio y se aforo a 100 ml con agua destilada la cual se preparó 24 horas antes de su uso.

4.- Se preparó una solución que tuviera 0.8 g de NH_3 /100ml de hidróxido de amonio, para lo cual se midió 3.1 ml de hidróxido de amonio y se aforo a 100 ml con agua destilada.

◆ Procedimiento

a) Preparación del extracto

Se pesó en un vaso de precipitados de 50 ml aproximadamente 0.5 g de muestra finamente molida y desengrasada y se adicionó 18 ml de dimetilformamida al 75% y se agitó a 500 r.p.m. durante 1 hr, una vez pasado este tiempo se paso cuantitativamente el contenido del vaso a un tubo para centrifugarse a 3000 r.p.m. durante 10 min. para finalmente aforarse a 25 ml con dimetilformamida.

b) Cuantificación de taninos

Se rotularon 3 tubos de ensaye (uno fue el blanco y dos el problema), y se agregaron los reactivos de la siguiente manera:

Tubo	Blanco	Problema 1	Problema 2
Extracto (ml)	1.00	1.00	1.00
Agua destilada (ml)	6.00	5.00	5.00
Citrato férrico amoniacal (ml)		1.00	1.00
Amoniaco (ml)	1.00	1.00	1.00

Nota: En cada adición se agitó.

Introducir los tubos en un baño a temperatura controlada de 30°C durante 10 min.

Leer absorbancia a 525 nm. Ajustar el espectrofotómetro con un blanco de agua

c) Curva estándar

Se rotularon 6 tubos de ensaye y se agregaron 0,40,80,160,240 y 280 µl de solución estándar de ácido tánico respectivamente a cada tubo, y se les adicionó 1000,960,920,840,760 y 720 µl de dimetilformamida al 75%, posteriormente se adicionó 5 ml de agua destilada a cada uno de los tubos y se agitaron. Se añadió 1 ml de la solución de citrato férrico amoniacal a todos los tubos y se volvieron a agitar, por último se les agregó 1 ml de la solución de amoniaco y se homogeneizaron. Se introdujeron los tubos en un baño con temperatura controlada a 30°C durante 10 min. y se procedió a leer la absorbancia a 525 nm, usando un blanco de agua para ajustar el espectrofotómetro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO PERTENECE
DE LA BIBLIOTECA

d) Cálculos

Se trazó una gráfica de absorbancia vs microgramos de ácido tánico y se interpolaron los valores obtenidos para cada uno de los extractos. El intervalo de concentración de ácido tánico de la curva patrón va de 80 a 560 μg . Se reportó el % de taninos presentes en la muestra.

4.8.6 Determinación de Nitratos. Método de Cataldo (46)

Fundamento

Se basa en la extracción con agua de nitratos en tejidos vegetales. Posteriormente centrifugar y desarrollar color en sobrenadante por nitración de ácido salicílico y leer absorbancia de la solución obtenida en espectrofotómetro a 410 nm. Se determina el contenido de nitratos usando una curva patrón preparada con nitrato de potasio. En caso de trabajar con muestras cuyo extracto esté muy pigmentado, se empleará carbón activado tanto en la curva patrón como en la obtención del extracto.

◆ Material/Reactivos

- ◆ Molino Marca Thomas-Wiley Mod. 4
- ◆ Centrifuga para tubos Marca DINAC CL.
- ◆ Tubos de centrifuga con capacidad aproximada de 50 ml con tapas herméticas.
- ◆ Adaptador para filtración en jeringa Millipore
- ◆ Membrana Millipore, tipo HATF-02500 (tamaño poro 0.45 μm)
- ◆ Agitadores mecánicos tipo Vortex

- ◆ Baño maría GRANT, Mod. SE10
- ◆ Espectrofotómetro COLEMAN, Mod. Junior II-A
- ◆ Micropipetas de 50,200 y 1000 μ l
- ◆ Pipeta volumétrica de 10 ml
- ◆ Tubos de ensayo de 140x14 mm
- ◆ Mortero con pistilo
- ◆ Embudos Buchner
- ◆ Matraces Kitasato
- ◆ Solución de nitrato de potasio (1)
- ◆ Solución de ácido salicílico (2)
- ◆ Solución de hidróxido de sodio (R.A.) 2 M
- ◆ Carbón activado

1. La solución patrón de nitrato de potasio debe tener una concentración de 10mg/ml para lo cual se pesa 0.1g de nitrato de potasio y se lleva a 10 ml con agua destilada.
2. Se preparó una solución al 5% (m/v) en ácido sulfúrico concentrado.

a) Obtención del extracto

- 1.- Obtener como mínimo tres extractos, para ello se pesó aproximadamente 0.7 g de muestra.
- 2.- Se trituro en mortero con 25 ml de agua y 0.45 g de carbón activado, hasta obtener una papilla homogénea, debido a que la muestra presento un poco de pigmentación.

3.- Se transfirió cuantitativamente a un tubo de centrifuga de 50 ml, enjuagando el mortero con 5 ml de agua para llegar a un volumen final de 30 ml, se procedió a centrifugar durante 1 hora de 2700 – 3000 r.p.m.

4.- Se decanto el sobrenadante, se filtró con ayuda de vacío sobre papel Whatman del No. 542 y se homogeneizó para efectuar la determinación.

Nota: El filtrado debe quedar perfectamente traslucido, si se observan partículas en suspensión, se sugiere filtrar una vez más o bien filtrar con dispositivo Millipore.

b) Preparación de la Curva patrón

1.- Se preparó una curva patrón con escala de concentraciones de 6-60 µg de nitrato, para lo cual en un tubo de centrifuga de 50 ml se adicionó 3 ml de la solución patrón de nitrato de 10 mg/ml, 0.45 g de carbón activado y 27 ml de agua para tener un volumen final de 30 ml, se homogeneizó y centrifugó 1 hr de 2700 – 3000 r.p.m.

2.- Se decantó el sobrenadante, se filtró con ayuda de vacío y se homogeneizó. La solución así obtenida tiene una concentración de nitrato de 1 mg / ml. El filtrado debe quedar perfectamente traslúcido, si se observan partículas en suspensión filtrar con dispositivo Millipore.

3.- Se rotularon 6 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la curva, los restantes corresponden a los puntos de la curva. Se adicionaron diferentes volúmenes de la solución patrón de nitrato de acuerdo con el cuadro siguiente.

tubo	solución patrón de nitrato 1mg/ml (μl)	H ₂ O (μl)	solución de ácido salicílico (ml)	Incubación 20 min 30°C	solución de NaOH (ml)	Incubación 15 min 30°C
1		100	0.40		9.50	
2	6	94	0.40		9.50	
3	10	90	0.40		9.50	
4	30	70	0.40		9.50	
5	40	60	0.40		9.50	
6	60	40	0.40		9.50	

c) Determinación (realizar por triplicado)

- 1.- Se rotularon 4 tubos de ensayo, correspondiendo el No. 1 al blanco de la muestra.
- 2.- Se adicionó una alícuota de 100 μl de sobrenadante a cada tubo.
- 3.- Se añadió 0.4 ml de la solución de ácido salicílico, excepto al blanco, al cual se le adicionó 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcló por 15 segundos en vortex y se introdujo en baño regulador de temperatura a 30°C por 20 min. ± 1.
- 4.- Transcurridos los 20 min, se adicionó 9.5 ml de solución de NaOH, se mezcló por 15 segundos en vortex y se introdujeron en baño de temperatura a 30°C por 15 min.
- 5.- Se transfirieron a celdas de medición y se leyeron en espectrofotómetro a 410 nm.

d) Cálculos

Mediante la ecuación de la línea recta obtenida con los datos de la curva patrón se determinó el contenido de nitratos y se reportó como % de nitratos.

$$\% \text{ NO}_3 = (\text{mg NO}_3 \text{ de la muestra}/\mu\text{l del extracto}) (\text{ml de vol. total}/\text{peso de la muestra en mg}) \times 100$$

4.8.7 Determinación de Fitatos. Método de Haug and Lantzsch (41)

Fundamento

El método Haug and Lantzsch (1983) se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo del fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de concentración conocida de Fe^{3+} en exceso, el cual forma un complejo con el fitato, se cuantifica el hierro reducido al que el ácido fítico no alcanza a acomplejar mediante la reacción colorida que se produce con la 2,2-dipiridina y que es fácilmente medible espectrofotométricamente .

- ◆ Material/Reactivos
 - ◆ Magnetos agitadores
 - ◆ Probetas de 30 y 50 ml
 - ◆ Pipeta graduada de 1 y 10 ml
 - ◆ Matraces aforados de 25, 50, 100 y 1000 ml
 - ◆ Micropipetas automáticas 1-5 ml y 100 – 1000 μl (Finnpipette, Labsystems)
 - ◆ Agitador de vidrio
 - ◆ Vasos de precipitado de 50 y 100 ml
 - ◆ Espátula
 - ◆ Tubos de centrifuga
 - ◆ Celdas de cuarzo para espectrofotómetro (Sequoia Turner)
 - ◆ Tubos de ensaye
 - ◆ Gradillas
 - ◆ HCl 0.2 N
 - ◆ Acido tioglicólico (Merck, Co., No. 700)

- 2,2-Bipiridina (Merck, Co., No. 3098)
- Sulfato férrico de amonio-12 H₂O (Merck, Co., No. 3776)
- Agua desionizada
- Fitato de sodio (sigma P-3168) (1)

1.- Para la preparación de esta se utiliza la sal sódica del ácido fítico, la cual tiene una pureza del 94% y una humedad del 8.3%. La solución de referencia (patrón) se prepara de tal manera que contenga 1.5 mg/ml de fitato en agua desionizada. Por lo que hay que pesar 0.1714 g de fitato de sodio y aforar hasta 100 ml con agua desionizada.

◆ Procedimiento

Se pesan aproximadamente 40 mg de muestra y se colocan en un vaso de precipitado de 50 ml, se le adicionan 20 ml de HCl 0.2 N y se somete a agitación mecánica a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga el extracto a 1200 r.p.m. durante 15 min. a temperatura ambiente, se colecta el sobrenadante y se toma una alícuota de 0.5 ml y esta se coloca en un tubo de ensayo, se le adiciona 1 ml de la solución férrica y se tapa con una canica. Posteriormente se colocan los tubos a baño maría 30 min., una vez pasado el tiempo se sacan y se espera a que se enfríen para agregarle a cada tubo 2 ml de 2,2-bipiridina y se mezcla el contenido en un vortex, se mide la absorbancia a 519 nm a los 30 seg. exactos después de haber agregado la bipiridina a los tubos.

a) Curva patrón

Las soluciones para la curva patrón se preparan diluyendo la solución de referencia de fitato con HCl 0.2 N en un rango de 3 a 30 μg de fósforo fítico/ml (1.2 a 11.7 ml de la solución patrón y aforando hasta 100 ml de HCl 0.2 N).

La curva patrón se prepara según la siguiente tabla:

tubo	ml solución estándar	aforo (ml)	Concentración final ($\mu\text{gP/ml}$)
1	1	100	3.0172
2	2	100	6.0344
3	4	100	12.0688
4	6	100	18.1032
5	8	100	24.1376
6	10	100	30.1720

4.8.8 Determinación de Saponinas. Método de Hemólisis (47)

Fundamento

En el método una suspensión de glóbulos rojos se hemoliza por acción de las saponinas disueltas en un extracto salino de la muestra. La hemoglobina pasa de los glóbulos rojos a la solución, transformándola de una suspensión turbia a una solución roja translúcida, luego de dejarla en reposo, la parte no hemolizada sedimenta, y después de una hemólisis total, se encontrará en el fondo del recipiente una capa tenue compuesta de los estromas de glóbulos rojos.

La forma de acción de las saponinas sobre el glóbulo rojo es que las saponinas forman productos de interacción de diferente estabilidad con el colesterol, proteínas y fosfolípidos de la membrana, lo que afecta su actividad surgiendo entonces el rompimiento de la estructura y provocando hemólisis.

- ◆ Material y reactivos
 - ◆ Extractor de grasa Goldfish-Labconco
 - ◆ Cartuchos de celulosa – Whatman, dimensiones 22 x 80 mm
 - ◆ Balanza analítica – Sartorius
 - ◆ Rotavapor – Büchi, modelo R
 - ◆ Centrífuga – Clay Adams, modelo DINAC
 - ◆ Incubadora bacteriológica – Electric Company, modelo Blue M de convección gravitacional
 - ◆ Espectrofotómetro – Coleman Junior, modelo 61A20, con celdas de vidrio – Perkin Elmer (dimensiones 10 x 75 mm) y adaptador de celdas que permiten el paso de 1 cm² de luz.
 - ◆ Incubadora con agitación – Labline
 - ◆ Micropipetas de gota – Cook Microtiter System, Dynatech Laboratories, inc., de 0.050 ml
 - ◆ Microdilutores – Cook Microtiter System, Dynatech Laboratories, inc., de 0.050 ml
 - ◆ Placas de microtitulación reutilizables - Cook Microtiter System, Dynatech Laboratories, inc., tipo "U"
 - ◆ Espejo adaptado para lectura de hemólisis en las placas de microtitulación.
 - ◆ Papel filtro Whatman No. 1
 - ◆ Solución de MeOH (R.A.) y agua destilada al 85 % (v/v)
 - ◆ Eter de petróleo
 - ◆ Solución de NaCl al 0.9 % (m/v)

- ◆ Heparina como anticoagulante de 5000 UI/ml
- ◆ Solución de proteasa (tripsina de páncreas porcino (SIGMA # T-8128) al 0.1 % en solución salina (0.9 %) (m/v)
- ◆ Solución estándar de saponinas al 0.5 % en solución salina 0.9 %, el estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina de tipo esteroidal) de la casa Sigma y un extracto de quillaja (saponina de tipo triterpenoide) de la casa BDH.
- ◆ Sangre de conejo

a) Sensibilización de sangre de conejo

- 1.- La sangre con anticoagulante (0.1 ml de heparina de 5000 UI/ml para 5 ml de sangre) se transvasa a tubos de centrifuga para lavaria (3 veces) con solución salina 0.9 % en una proporción de sangre:solución salina de 1:5.
- 2.- Centrifugar aproximadamente a 1500 r.p.m. por 15 min. y por decantación eliminar el sobrenadante.
- 3.- Después del tercer lavado, diluir el paquete al 4 %, por lo que por cada ml. añadir 24 ml. de solución salina 0.9 % y filtrar a través de gasa.
- 4.- Para la sensibilización por cada 10 ml. de glóbulos al 4 % agregar 1 ml. de solución de proteasa.
- 5.- Incubar por 1 hora a 37°C
- 6.- Lavar nuevamente (3 veces), centrifugando para eliminar la enzima a 1500 r.p.m. por 15 min. con solución salina 0.9 %.
- 7.- Medir el paquete y resuspender al 5 %, para lo cual por cada ml. de glóbulos

añadir 19 ml. de solución salina 0.9 %.

8.- Colocar la suspensión de eritrocitos en un matraz, filtrando con gasa.

9.- Ajustar la suspensión de eritrocitos tomando 0.5 ml., agitando para homogeneizar la solución y adicionar 2 ml. de solución salina 0.9 %, en celdas ajustando a 100 % de transmitancia con solución salina 0.9 %, se mantiene

$\lambda = 620 \text{ nm}$ hasta una lectura de 26 % \pm 0.5 % de transmitancia.

b) Extracción de saponinas

1.- Pesar 1.25 g de muestra desengrasada previamente con éter de petróleo.

2.- Colocar la muestra en los cartuchos de celulosa, ponerlos en los portadedales del extractor Goldfish.

3.- Extraer con mezcla MeOH-H₂O (85:15) por 2 horas para extraer las saponinas a la máxima temperatura.

4.- Concentrar la solución a sequedad en el rotavapor a temperatura de 65°C

5.- Resuspender en solución salina 0.9 % y filtrar con vacío, pasando el filtrado a un matraz y aforar a 25 ml.

6.- Hacer una microtitulación en placas de tipo "U", colocando en cada pozo 50 μl de solución salina 0.9 %, con el pipeteador de gota.

7.- Con el microdilutor poner 50 μl del extracto o del estándar y hacer diluciones sucesivas desde el primer pozo (siguiendo la hilera horizontal hasta donde se desee) y se elimina el residuo de la última dilución.

8.- Una vez hechas las diluciones se colocan con el pipeteador de gota 50 μl de la suspensión de glóbulos ya sensibilizados y ajustados, teniendo un control negativo

con solución salina 0.9 % sin extracto problema y otro positivo con solución salina 0.9 % y el estándar de saponina al 0.5 % en solución salina 0.9 %.

9.- Rotar la placa e incubar 1 hora a 37°C.

10.- Una vez transcurrido el tiempo de incubación se pone la placa con todo cuidado en el dispositivo especial para poder realizar la lectura. Para obtener el título de hemólisis se observó a través del espejo adaptado al dispositivo y se localizó en la hilera horizontal de la placa el número que correspondió al último pozo donde se apreció la hemólisis, y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

c) Cálculos

Las unidades asignadas en este método se definieron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg mtra.), por definición 1 microgramo del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.).

CAPITULO 5

◆ Resultados y discusión

5.1 Parámetros físicos

En la tabla # 1 se muestran los valores obtenidos de los parámetros físicos de la semilla de calabaza (*C. argyrosperma*), se destaca la porción comestible que es elevada (> 65%), lo cual nos permite conocer el rendimiento aproximado de la semilla a trabajar.

Tabla # 1
Parámetros físicos de la semilla de calabaza (*C. argyrosperma*)

	almendra	cáscara
peso (g)	2.12 ± 0.13	1.07 ± 0.05
porcentaje (%)	66.4 ± 0.67	33.59 ± 0.67

* El valor reportado corresponde al promedio de 5 lotes de 10 semillas cada uno.

Tabla # 2

	almendra	semilla
Largo (cm)	2.21 ± 0.14	2.94 ± 0.20
Ancho (cm)	0.81 ± 0.08	1.59 ± 0.13
Peso volumétrico ^a	47 g ± 1.4	21 g ± 0.50
Número volumétrico ^a	235 ± 1.8	73 ± 2.4
Peso unitario (g)	0.19 ± 0.005	0.29 ± 0.004

a = Peso y número de almendras o semillas contenidas en un volumen de 100 ml con una probeta marca Kimax # 20024.

Se hizo la caracterización de la semilla y la relación existente entre la almendra y la cubierta de la semilla (cáscara). Físicamente la semilla presentó un aspecto ovalado de color apertado blanquesino con borde verdoso, la almendra presentó un color verde seco, destacándose el tamaño relativamente grande de esta especie de calabaza en comparación con otras cucurbitas.

La determinación de algunos parámetros físicos en la almendra de calabaza, fue

con la finalidad de poder hacer una rápida comparación de posibles adquisiciones posteriores del material biológico.

5.2 Caracterización bromatológica de la harina integral

A continuación se muestra la composición bromatológica de la almendra de calabaza, donde se destaca el porcentaje de proteína y grasa.

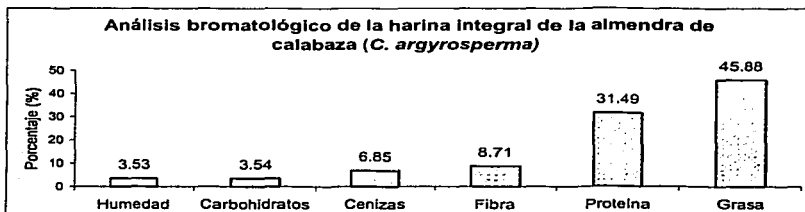


Fig. # 2

Nota: Las determinaciones se hicieron por triplicado, el valor de carbohidratos se calculó por diferencia.

Tabla #3
Comparación del análisis bromatológico de algunas leguminosas y cereales

	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	CHO'S (%)
<i>C. argyrosperma</i>	3.56 ± 0.07	6.85 ± 0.11	31.49 ± 0.82	45.88 ± 0.07	8.71 ± 0.35	3.54
maíz (<i>Zea mays</i>)	10.4	1.4	9.9	4.4	1.97	71.93
trigo (<i>Triticum sativum</i>)	10.6	4.4	27.4	12.3	3.6	41.7
soya (<i>Glicine</i>)	4.0	4.6	43.6	24	2.6	21.2
frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	10.0	5.0	23.7	1.47	4.39	55.44

Fuente (43)

De acuerdo a la tabla anterior, se resalta el hecho de que la almendra de esta cucurbita presenta altos niveles de proteína (31.49%) y grasa (45.88%), lo cual lleva

a pensar que podría utilizarse para mejorar la dieta básica de los habitantes de la región de Cuetzalán, los cuales presentan una deficiencia proteico-calórica.

5.2.1 Proteína Verdadera

En la tabla # 4 se reportan los valores de proteína verdadera en comparación con la proteína cruda, tanto para la harina integral como para la harina desengrasada, alcanzando un valor de 98.54 % de Nitrógeno proteínico para el primer caso y 87.91% para el segundo.

Tabla # 4
Proteína Verdadera de la harina integral y desengrasada
de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

	% Proteína cruda	% Proteína verdadera
Harina integral	31.50 ± 0.62	31.04 ± 0.43
Harina desengrasada	63.59 ± 0.50	55.90 ± 0.63

Como se puede observar de estos resultados, con extraer la fracción grasa de la almendra, se obtiene una harina desengrasada que se puede considerar como un auténtico concentrado proteínico (>50% de Proteína).

5.3 Aminoácidos de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

En la tabla # 5 se presenta la composición de aminoácidos de la harina desengrasada de calabaza, en la cual el porcentaje de recuperación indica que la hidrólisis estuvo bien realizada al estar dentro del intervalo 86-105 %. El aminograma se muestra en el anexo 1.

Tabla # 5
Composición de aminoácidos de la harina desengrasada de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

aminoácidos	g aa/100 g proteína	% de recuperación
ácido aspártico	7.87	5.17
ácido glutámico	19.84	11.79
Arginina	16.79	33.73
Cisteína	1.21	0.44
fenilalanina	5.01	2.65
glicina-alanina	19.38	10.34
Histidina	2.58	4.36
Isoleucina	3.14	2.09
Leucina	6.29	4.19
Lisina	4.74	5.67
Metionina	2.19	1.28
Prolina	3.13	2.38
Serina	3.25	2.70
Tirosina	3.39	1.63
Treonina	2.71	1.99
Triptofano	1.23	1.05
Valina	4.35	3.25

Σ 94.71

*Determinación por hidrólisis alcalina

5.3.1 Calificación química de la harina desengrasada de calabaza (*C. argyrosperma*).

Para predecir la calidad nutritiva de una proteína alimenticia, se calcula la calificación química a partir de la composición de aminoácidos, en particular de los indispensables al comparar la relación porcentual, con una proteína denominada patrón que representa los requerimientos de una proteína ideal. En la tabla # 6 se presentan los datos de la comparación, hacia los requerimientos necesarios de aminoácidos indispensables para lactantes y adultos, donde se observa que para los adultos, las necesidades de aminoácidos indispensables son bajas, porque son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

capaces de reciclar eficazmente los aminoácidos, por lo que el aporte de histidina en el régimen alimenticio no es necesario.

Tabla # 6
Requerimientos de aminoácidos indispensables para lactantes y adultos de la semilla de calabaza (*C. argyrosperma*).

Aminoácidos	Lactantes	Adultos	Requerimientos FAO (g/100g proteína)	
			Lactantes	Adultos
Metionina + Cistina	>100	68.98	4.2	1.7
Triptofano	90.50	84.77	1.7	0.5
Lisina	89.93	>100	6.6	1.6
Isoleucina	85.20	83.20	4.6	1.3
Leucina	84.50	>100	9.3	1.9
Histidina	>100	—	2.6	1.6
Fenilalanina + Tirosina	>100	>100	7.2	1.9
Valina	99.24	>100	5.5	1.3
Treonina	79.13	>100	4.3	0.9

La calificación química, nos indica un valor predictivo de la calidad de la proteína, de acuerdo a la tabla anterior se encontró que el aminoácido limitante para el caso de adultos es el total de azufrados (metionina + cistina), con lo que se puede complementar esta proteína con cereales ya que son fuente importante de aminoácidos azufrados, por otro lado el aminoácido limitante para los requerimientos del lactante es la treonina, pero muestra una adecuada calificación química (>75).

5.4 Determinación de Digestibilidad *in-vitro* de la harina integral de la almendra de calabaza *Cucurbita argyrosperma*.

En la tabla # 7 se presenta el valor de digestibilidad *in vitro* de la harina integral de la cucurbita, se observa que ésta tiene una digestibilidad elevada (aprox. 80 %), lo que la hace altamente aprovechable en comparación a algunas proteínas

vegetales, ya que estas se absorben en un 60-70 % como las leguminosas.

Tabla # 7
Digestibilidad de la harina integral de la almendra
de calabaza (*C. argyrosperma*).

Muestra	Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)
<i>Cucurbita argyrosperma</i>	79.33 ± 2.71

5.5 Parámetros fisicoquímicos

En la tabla # 8 se presentan los valores del aceite crudo de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) los cuales entran en los rangos del grupo oleico-linoleico.

Tabla# 8
Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo de la almendra
de calabaza (*Cucurbita argyrosperma*).

Parámetro	<i>Cucurbita argyrosperma</i>	Grupo Oleico-linoleico ^b
Punto de fusión (°C)	0 a 5	-5 a 29
Gravedad específica (25/25°C)	0.8855 ± 0.001	0.909-0.920
Índice de yodo (Hanus) (g I /100 g aceite)	91.095 ± 1.08	77-117
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	180.22 ± 4.38	187-200
Índice de refracción (25°C)	1.466 ± 0.0014	1.436-1.474
Índice de acidez (% ác. Oleico)	0.5430 ± 0.02	≤0.50

^b Fuente (18)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En relación al Índice de refracción, el aceite de calabaza presenta valores que entran en el intervalo del grupo oleico-linoleico, por lo que podemos predecir que este aceite es muy similar en cuanto a su composición de ácidos grasos insaturados a los aceites comestibles. En Índice de yodo el cual da una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos para el caso del aceite de calabaza, su valor cae dentro del grupo oleico-linoleico, por lo que este dato lo hace aparentemente un aceite comestible.

El Índice de saponificación de la calabaza es ligeramente menor que para el grupo oleico-linoleico, lo que nos indica que la grasa cruda de la almendra de calabaza tiene un contenido mayor de ácidos grasos de cadena larga, esto se confirma con el cromatograma (anexo 2), ya que no se identificaron picos de ácidos grasos de cadena corta.

5.5.1 Contenido calórico

En la tabla # 9 se presentan los valores del contenido calórico en aceite y en harina integral de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*), observándose un aporte calórico mayor al de la soya, dicha comparación se hizo tomando como base el amplio uso que se le da al grano de soya para la alimentación humana y animal.

Tabla # 9
Contenido calórico en aceite crudo y harina integral de
la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

	Kcal/g mtra.
Aceite crudo	9.96
Aceite soya	8.99
Harina integral	6.66
Harina integral de soya	4.47

5.6 Perfil de ácidos grasos

En la tabla # 10 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite crudo de calabaza, destacándose el contenido de ácido oleico y linoleico por lo que se puede incluir dentro del grupo oleico-linoleico, cabe mencionar que dicho aceite presenta un valor de índice de saponificación relativamente inferior al grupo antes mencionado, esto debido al alto porcentaje de ácidos grasos de cadena larga, además tiene un contenido de ácido linolenico (C_{18:3}) muy bajo, menor al 1% lo que lo hace atractivo desde el punto de vista de su estabilidad, aunque nutricionalmente es limitante en este tipo de ác. graso esencial. Ver anexo 2

Tabla # 10

Perfil de ácidos grasos del extracto lipídico crudo de la almendra de calabaza *C. argyrosperma*

Ácido graso	Nombre del ácido graso	Aceite crudo de <i>C. argyrosperma</i> (% relativo)
C _{16:0}	Palmitico	20.81
C _{18:0}	Estearico	10.96
C _{18:1}	Oleico	38.07
C _{18:2}	Linoleico	28.37
C _{18:3}	Linolenico	0.31
	total de saturados	31.77
	total de insaturados	66.75
	total de no identificados	1.47

Los parámetros fisicoquímicos del aceite crudo de la almendra de calabaza presenta valores de sus parámetros fisicoquímicos que están en el intervalo de los valores para aceites comestibles por lo que aparentemente se puede destinar para su consumo directo; además, en los cromatogramas del perfil de ácidos grasos no se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presentó ningún pico desconocido que nos pudiera hacer pensar en la presencia de algún ácido graso no común con posibles características de toxicidad, por el contrario presenta porcentajes altos en los ácidos grasos indispensables como linoleico, por lo que este aceite resulta ser atractivo para incluirse en la dieta de los habitantes de la región de Cuetzalán Puebla, sin embargo su refinamiento se hace necesario para eliminar las impurezas propias de un aceite crudo y mejorar su apariencia para así hacerlo más agradable al consumidor.

5.7 Toxicología analítica de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).

En la tabla #11 se presenta el contenido de los factores tóxicos y antinutricionales que se determinaron en la harina desengrasada de la almendra de *C. argyrosperma*.

Tabla # 11
Factores tóxicos y antinutricionales en la almendra de
Calabaza (*C. argyrosperma*).

Factor tóxico o Antinutricional	Valor
Hemaglutininas	Negativo
Glucósidos cianogénicos	Negativo
Inhibidores de tripsina	4.08 UTI/mg \pm 0.73
Taninos	1.12% \pm 0.06
Alcaloides en mtra. desengrasada	Negativo
Alcaloides en aceite crudo	Negativo
Ácido fítico	7.97% \pm 0.34
Nitratos	0.09% \pm 0.02
Saponinas	Negativo

En la determinación semicuantitativa de Hemaglutininas las muestras no presentaron prueba positiva de aglutinación para eritrocitos de hámster, por lo que la muestra de harina desengrasada de la semilla de calabaza no contiene este tipo de enterotoxinas de naturaleza proteínica, ya que los eritrocitos de hámster son muy sensibles a este tipo de fitohemaglutininas; en la determinación de glucósidos cianogénicos al realizar visualmente la detección cualitativa, ésta fue negativa ya que los tubos que contenían la muestra no presentaron ninguna coloración café-rojizo en el papel indicador, lo que indica que la harina desengrasada de la cucurbita no presenta cantidades significativas de glucósidos cianogénicos; en la determinación de Inhibidores de Tripsina, el valor promedio de las tres determinaciones es menor a 10 UTI/mg de muestra, lo que hace que la harina de la semilla de calabaza no representa un riesgo por causa de este factor antinutricional, además ésta antienzima se podría eliminar con un tratamiento térmico; para la determinación de taninos hay que recordar que son compuestos orgánicos no nitrogenados que pueden interaccionar con las proteínas y enzimas digestivas disminuyendo el valor nutritivo del alimento ingerido y por lo tanto impiden la digestión de las proteínas afectando su biodisponibilidad para que sean absorbidas, además de formar complejos con los iones metálicos divalentes como Fe^{2+} , disminuyendo con esto su biodisponibilidad, sin embargo, el valor de taninos en la harina de la semilla no representa riesgo por este factor antinutricional; en la determinación semicuantitativa de alcaloides tanto en la harina desengrasada como en el aceite de la semilla de calabaza, no hay la presencia de alcaloides, debido a que las fracciones de las muestras no presentaron reacción positiva con los 7 reactivos que se utilizan para

hacer la detección de este tipo de neurotoxinas.

En relación al valor de ácido fítico hay que tomar en cuenta que es un eficiente agente quelante, que forma complejos con cationes minerales y proteínas disminuyendo su biodisponibilidad, el valor reportado para este factor antinutricional se debe posiblemente a que el método de Haugh and Lantzsch sobreestima el valor, cuantificándose junto con el ácido fítico otros compuestos de fosfato que no tienen actividad quelante, además de que pudiera también cuantificar fracciones menores de inositol producto de la hidrólisis del ácido fítico, por lo que se recomienda utilizar otro método para confirmar el valor tal alto que se encontró.

De acuerdo a la tabla anterior el valor de nitratos presentes en la harina de la semilla de calabaza no es significativo.

El concentrado proteínico de la almendra de calabaza, no presentó prueba positiva de hemólisis para eritrocitos de conejo, por lo que no hay la presencia de este tipo de tóxico en cantidad significativa.

CAPITULO 6

• Conclusiones

- La almendra de calabaza (*C. argyrosperma*) planta que se cultiva y cosecha en el Mpo. de Cuetzalán, Pue., presenta niveles significativos de proteína (31.49 %) y grasa (45.88%) por lo que es una buena fuente de proteína y energía .
- De acuerdo al perfil de aminoácidos y a la calificación química la harina desengrasada de la almendra de calabaza es deficiente en aminoácidos azufrados, pero de fácil suplementación.
- La harina integral de la almendra de calabaza presentó una buena biodisponibilidad de las proteínas que contiene.
- La fracción lípida de la almendra de calabaza es una fuente rica en ácidos linoleico y oleico, de los cuales el primero es considerado como un ácido graso indispensable.
- El aceite crudo de la almendra de calabaza aparentemente puede consumirse directamente sin un refinamiento previo.
- La almendra de calabaza presenta ausencia o valores muy bajos de factores antinutricionales y tóxicos naturales excepto ácido fítico por lo que para contrarrestar su efecto es necesaria una ingesta mayor de minerales en especial de hierro, sin embargo hay la posibilidad de una sobreestimación.

• Recomendaciones

- Confirmar el alto contenido de fitatos con un método más específico.
- Siguiendo con la continuidad de este trabajo, se debe llevar a cabo estudios de toxicidad aguda y subaguda con el fin de determinar la inocuidad de la almendra de esta cucurbitácea.
- Se propone realizar un ensayo biológico de Relación de Eficiencia Proteínica, con el fin de evaluar nutricionalmente esta cucurbitácea.

CAPITULO 7

• Bibliografía

1. Flores, N. (Editor) ¿Producir para la desnutrición? Centro de Ecodesarrollo, México, D.F. pp. 13-34, 243-266, 1988.
2. Doode, M. Y Pérez, E. Sociedad, economía y cultura alimentaria, CIAD, S.A., Hermosillo, Son., pp. 9-20, 273-302, 1994.
3. Comisión Nacional de Alimentación. Encuesta nacional de alimentación en el medio rural, 1989, Publicación del INNS2 L-86, México, D.F., pp. 92-93, 1990.
4. Ramos, G.R. Alimentación normal en niños y adolescentes (teoría y práctica), Ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F., pp. 155-205, 1985.
5. Hernández, J. y León, C. Cultivos marginados (otra perspectiva de 1492). FAO: colección de alimentación y nutrición No. 2, Roma, pp. ix-xi, 83-130, 1992.
6. Bostid, F.R. (Editor) Lost crops of the incas: little known plants of the andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press., Washington, D.C., pp 203-209, 1989.
7. Villela, O. Y Gerez, P. Biodiversidad y conservación en México. Ediciones técnico Científicas, S.A. de CU-UNAM, 2ª edición, México, D.F. pp. 7-34, 269-276, 1994.
8. Granados, D. Y López, G. Agroecología, U.A. de Chapingo, Texcoco, pp. 37-166, 1996.
9. Harlan, J.R. Las plantas y animales que alimentan al hombre. Inv. y Ciencia no. 2, 64-75, 1976.
10. Sundey, G Abd Dickson, B. Proximate composition and functional properties of raw and processed full-fat fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) seed flour. J. Food

Chem.59,321-325, 1992.

11. Al-khalifa, A. Phitochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils, J. Agric. Food Chem. 44,964-966, 1996.
12. Curtis H.W., Joseph S.C. and James B.W., Antinutritional factors in Cucurbita seed meals, J. Agric. Food Chem. 34,434-436, 1989.
13. Mitchell H. Nutrición y dieta. Interamericana, decimosexta edición, pp. 129-130, México, D.F., 1978.
14. Krause M. Nutrición y dietoterapia. Interamericana – Mc Graw – Hill, Octava edición, México, D.F., pp. 57-69, 1995.
15. Russell C. El libro de la salud, CECSA, 3ª edición, México D.F., pp. 197-203, 1984.
16. Mora R. Soporte Nutricional Especial, Panamericana, 1ª reimpresión, pp. 56-57, 1992.
17. Chefiel J.D., Proteínas alimentarias, Acirbia, 1ª edición, Zaragoza, pp. 32-37, 59-60, 107-120, 1989.
18. Swern, D. Bailey's industrial oil and fat products. John Wiley and Sons 4th edition, vol. I New York pp. 186-189, 192-196, 217-221, 242-245, 1979.
19. Jenkins, G.L., Dumez, A.G., Christian, J.E., Hager, G.P., Química Farmaceutica Cuantitativa, Atlante S.A., 1ª edición, pp. 240-241, México D.F., 1951.
20. Egan H., Kirk R.S., Sawyer R., Análisis Químico de Alimentos de Pearson, Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., pp. 519-537, México D.F., 1991.

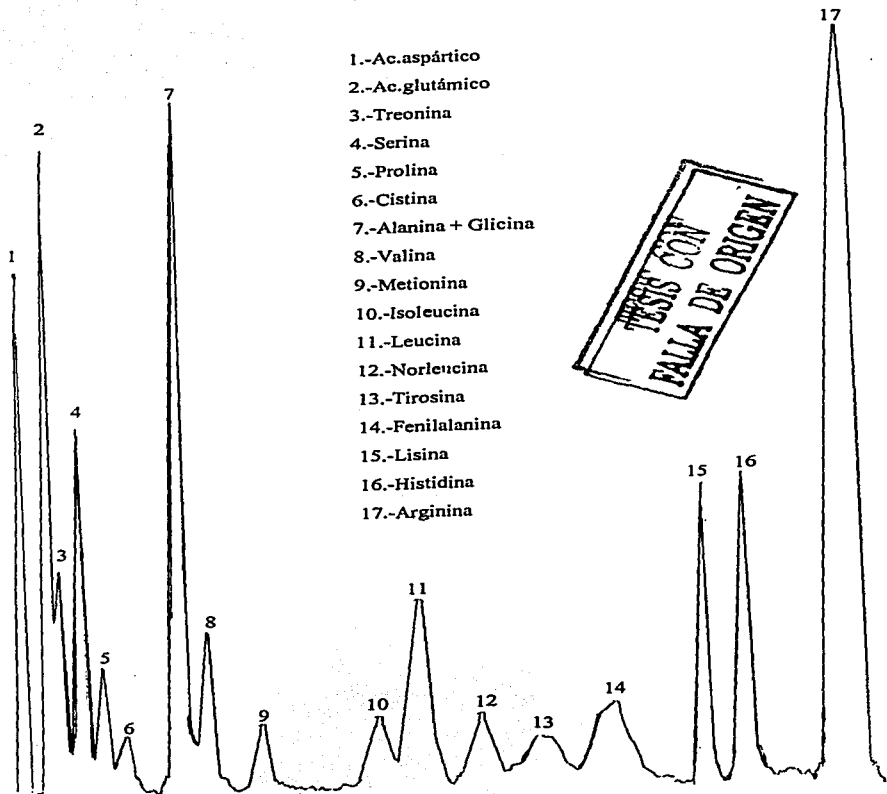
21. FAO/OMS, Las grasas y aceites en la nutrición humana, FAO, Colección de Alimentos y Nutrición No. 20, Roma, pp. 9-40, 1980.
22. Moreno, E. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. pág. 250-252, 1984.
23. Bateman, J. Nutrición animal (Manual de métodos analíticos). Herrero Hnos.,S.A. México D.F., pp. 110-112, 170-172.
24. Heldrich, K. (Editor) Official methods of analysis of AOAC, Published by AOAC Inc. 15th edition, vol. I, pp. 40-62,69,83 and vol. II, 1095-1098, Arlington, 1990.
25. Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo A. True protein content and non-protein aminoacid in legume seeds. Nut. Rept. Int. 37,545-553, 1988.
26. Lucas, B. Estudio químico y toxicológico de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de maestría, ENCB, IPN, México, D.F., 1985.
27. Akoh, C. and Min, D. Food lipid (Chemistry, nutrition and biotechnology), Marcel Dekker, N.Y., pp. 115-136, 1998.
28. Church, D.C., Pand, W.G. Basic animal nutrition and feeding and B Books, Portland, pp.84-97, 1976
29. Lucas, B. and Sotelo, A. Effets of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins. Anal. Biochem. 109,192-197, 1980.
30. Lucas, B. and Sotelo, A. Aminoacids determination in pure proteins, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. Anal. Biochem. 123:349-356, 1982.
31. Pellet, P. and Young, V. Nutrition evaluation of protein food. The United Nations University, Tokyo, pp. 26-75, 1980.

32. Robinson, S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, pp. 107-141, 1991.
33. Haltin, E. and Tursell, K. alkaloid-screening of swedish plants. *Phytochem.* 4:176-195, 1962.
34. Van Etten, C. Mc.Grew, C. and Daxenblicher, M. Glucosinolate determination in cruciferaus seeds and meal by measuring of enzymatically release glucosa. *J. Agric. Food. Chem.* 22:483-487, 1974.
35. Lucas, B. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nut. Rept. Int.* 29:711-719, 1989.
36. Robinson, S.D. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Edit. Acribia, México, D.F. pp. 109-116, 120-125, 128-134, 1991.
37. Russell C. El libro de la Salud, Edit. CECSA, 3ª edición, México, D.F., 1984.
38. Berkow, R. El manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. Doyma. 8ª ed. pp. 1777-1780, 1984.
39. Williams, S. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. AOAC, 14a ed. pp. 16, 60,249, 1984.
40. Official Methods of Análisis of AOAC International. 16a ed. Virginia, Vol. II, Cap. 41, 1984.
41. Haug, W., Lantsch, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal products. *J. Sci. Food Agric.* 34, pp. 1423-1426, 1983.
42. Jaffe, W.G., Levy, A., González, D.i. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem.* 13:2685-2693, 1974.

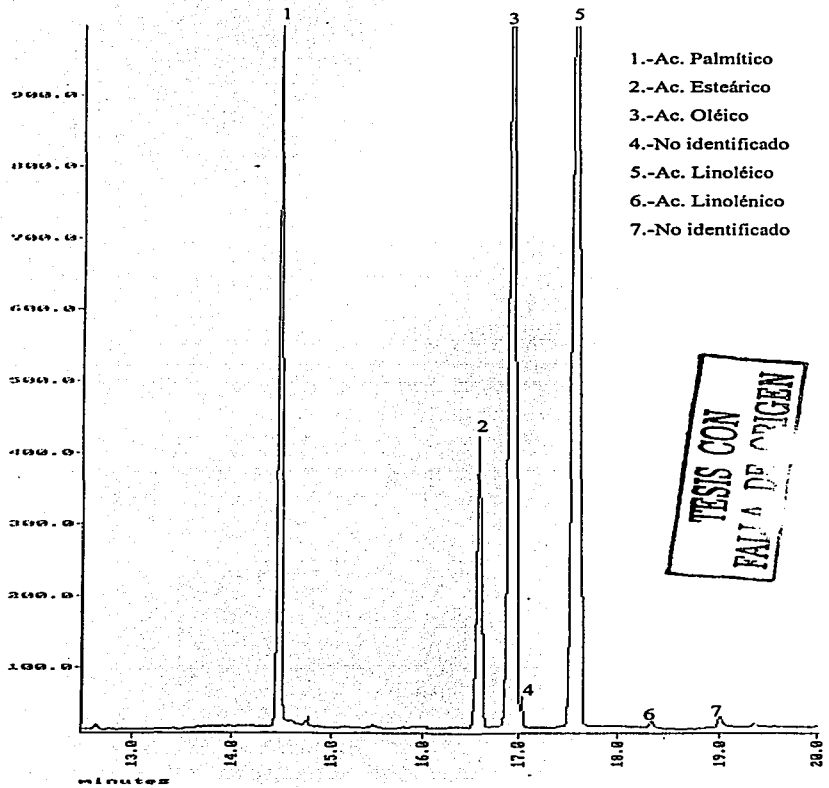
43. Morales de León, J., Babinsky, V., Bourgues, H., Camacho, M.E., Tablas de Composición de Alimentos Mexicanos. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F., pp. 9,17,37,39, 2000.
44. Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E., Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51:376-382, 1974.
45. International for Standardization Organization. ISO 9648:1988. Determination of tannin content in sorghum. First edition. pp. 12-15. Suiza, 1988.
46. Cataldo D.A., Harron M., Schrader L.E., and Youngs V.L. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6,71-80, 1975.
47. Jaffé, W.G., Leney, A. And González, D.F., Isolation and Partial Characterization of beans phytohemagglutinins. *Phytochemistry* 13, 2685 – 2693, 1974.
48. Pellet P., Young V., Nutritional Evaluation of Protein Foods. The United Nations University. pp. 26-38, 1980.
49. Muller, H.G. and Tobin, G. Nutrición y Ciencia de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. pp.73-77. Zaragoza, 1986.

• Anexo 1

Aminograma de la fracción proteica de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*).



Cromatograma del perfil de ácidos grasos del extracto lipídico de la almendra de calabaza (*C. argyrosperma*)



- 1.-Ac. Palmítico
- 2.-Ac. Estearico
- 3.-Ac. Oléico
- 4.-No identificado
- 5.-Ac. Linoléico
- 6.-Ac. Linolénico
- 7.-No identificado

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN